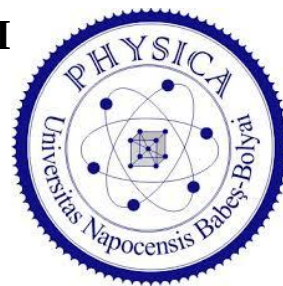




UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI

Facultatea de Fizică

Școala Doctorală de Fizică



TEZĂ DE DOCTORAT REZUMAT

Metode avansate de caracterizare a unor materiale biologice

Ramona CRAINIC

Conducător științific

Prof. Dr. Radu FECHETE

Cluj-Napoca

2025

Cuprins

Cuprins	i
INTRODUCERE	1
CAPITOLUL 1 Materiale biologice	2
1.1 Biomateriale obținute prin <i>electrospinning</i>	2
1.1.1 Principiile de producere a fibrelor prin <i>electrospinning</i>	2
1.1.2 Aplicații ale fibrelor produse prin <i>electrospinning</i>	3
1.2 Biosolide	4
1.2.1 Componentele principale ale unui biosolid utilizat ca și fertilizator	4
1.2.2 Producerea fertilizanților organo-minerali pe baza de biosolide	5
CAPITOLUL 2 METODE AVANSATE DE CARACTERIZARE A BIOMATERIALELOR	7
2.1 Rezonanța magnetică nucleară	7
2.1.1 Principiile rezonanței magnetice nucleare	7
2.1.2 Ecuațiile Bloch și timpii de relaxare spin-rețea, T_1 și spin-spin, T_2	7
2.1.3 Secvența de impulsuri CPMG pentru măsurarea timpului de relaxare spin-spin, T_2	8
2.1.4 Transformata Laplace	8
2.2 Spectroscopia FT-IR	9
2.3 Spectroscopia UV-VIS	10
2.4 Difrakția de raze X	11
2.5 Imagistica prin scanare electronică de baleiaj, SEM	11
CAPITOLUL 3 CARACTERIZAREA FERTILIZANȚILOR ORGANO-MINERALI PE BAZĂ DE BIOSOLIDE	13
3.1 Rezonanța magnetică nucleară uni-dimensională folosită pentru caracterizarea fertilizanților organo-minerali	13
3.1.1 Distribuțiile 1D ale timpilor de relaxare spin-rețea, T_1	13
3.1.2 Distribuțiile 1D ale timpilor de relaxare spin-spin, T_2	13
3.1.3 Distribuțiile 1D ale cuplajului rezidual dipolar	14
3.1.4 Spectre RMN a ^1H și ^{13}C sub MAS	15
3.2 Caracterizarea fertilizanților organo-mineral prin spectroscopie FT-IR	16

3.3 Caracterizarea fertilizanților organo-mineral prin SEM, EDX și DRX	17
CAPITOLUL 4 CONSTRUIREA DISPOZITIVULUI DE <i>ELECTROSPINNING</i>	19
4.1 Elementele componente	19
4.2 Construirea dispozitivului	20
CAPITOLUL 5 Producerea de nanofibre prin <i>electrospinning</i>	21
5.1 Materiale și metode de producerea a nanofibrelor prin <i>electrospinning</i>	21
5.1.1 Materiale	21
5.2 Producerea de nanofibre pe bază de chitosan	22
5.3 Producerea de nanofibre pe bază de PVA	23
CAPITOLUL 6 CARACTERIZAREA PROPRIETĂȚILOR MATERIALELOR BRUTE UTILIZATE PENTRU PRODUCEREA DE NANOFIBRE PRIN <i>ELECTROSPINNING</i>	25
6.1 Relaxometrie RMN a ^1H	25
6.2 Spectroscopie FT-IR	25
6.3 Difrakție de raze X	26
CAPITOLUL 7 CARACTERIZAREA SOLUȚIILOR PENTRU PRODUCEREA DE NANOFIBRE PRIN <i>ELECTROSPINNING</i>	27
7.1 Efectul denaturării colagenului în soluții de acid acetic cu diferite concentrații.....	27
7.2 Spectroscopia RMN a ^1H în câmpuri înalte	28
7.3 Distribuțiile timpilor de relaxare T_2	29
7.4 Spectroscopia FT-IR	30
CAPITOLUL 8 CARACTERIZAREA PROPRIETĂȚILOR NANOFIBRELOR PRODUSE PRIN <i>ELECTROSPINNING</i>	31
8.1 Metode moderne de RMN pentru caracterizarea nanofibrelor	31
8.1.1 Relaxometrie RMN a ^1H	31
8.1.2 Mape de schimb EXSY T_2 - T_2	31
8.2 Caracterizarea structurală a nanofibrelor prin spectroscopie FT-IR.....	33
8.3 Caracterizarea SEM.....	33
CAPITOLUL 9 REȚELE NEURONALE ARTIFICIALE FOLOSITE PENTRU CARACTERIZAREA NANOFIBRELOR PRODUSE PRIN <i>ELECTROSPINNING</i>.....	36

9.1 Caracterizarea gradului de ordine locală a nanofibrelor folosind rețele neuronale artificiale..	36
9.2 Analiza statistică în componente principale și utilizarea rețelelor neuronale artificiale	37
CONCLUZII FINALE	40
BIBLIOGRAFIE.....	42
LISTA PUBLICATIILOR DIN DOMENIUL TEZEI.....	47
Lucrări publicate în reviste cotate ISI	47
Lucrări prezentate la conferințe internationale.....	47

INTRODUCERE

Ingineria tisulară modernă (ingineria de producere a țesuturilor) utilizează tratamente celulare regenerative și biomateriale avansate pentru a promova recuperarea țesuturilor din jurul unui porțiuni specifice care prezintă malformație și care este astfel vizată pentru recuperare sau regenerare. În acest sens, nanofibrele electrofilate sunt aplicate pe scară largă în multiple aplicații biomedicale, structuri care susțin dezvoltarea și regenerarea țesuturilor în procesele de inginerie tisulară, în vindecarea rănilor, administrarea de medicamente, filtrare, ca membrană de afinitate în procesele de separare și purificare foarte specifice, în imobilizarea enzimelor, în implanturi de grefă vasculară cu diametru mic, biotehnologie, în ingineria mediului, în stocarea și generarea energiei dar și în diverse alte cercetări. Proprietățile unice ale acestor nanofibre dar și costurile reduse de producere reprezintă un avantaj, iar nanofibrele obținute prin *electrospinning* devin o resursă importantă în cercetare și în industrie, oferind alternative inovatoare pentru viitor. Biosolidele joacă un rol semnificativ în reducerea poluării și refacerea terenurilor degradate.

Obiectivul major al tezei de doctorat este acela de a dezvolta un protocol multivalent utilizat pentru caracterizarea complexă, utilizând metode avansate, a unor tipuri diferite de biomateriale. Acest protocol implică stadii multiple care încep cu i) proiectarea și construcția unui dispozitiv de *electrospinning* (electrofilare) pentru producerea probelor; ii) producerea locală (în cadrul laboratorului de Fizică aplicată a Departamentului de Fizică și Chimie a Universității Tehnice din Cluj-Napoca) de noi materiale de tipul folii de nanofibre (bio și nonbio) și de fertilizatori (prin cooperare cu Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Mașini și Instalații destinate Agriculturii și industriei alimentare-INMA București- Sucursala Cluj-Napoca); iii) alegerea celor mai potrivite metode și tehnici de caracterizare a biomaterialelor cum sunt Rezonanța Magnetică Nucleară (cu tehnicile de relaxometrie în câmpuri joase și spectroscopie a ^1H și ^{13}C în câmpuri înalte); iv) caracterizarea complexă a probelor de folii de nanofibre și a fertilizatorilor organo-minerali obținuți în cadrul programului experimental al tezei de doctorat; v) aplicare unui nivel primar de analiză a datelor măsurate cum este transformata Fourier 1D și transformata Laplace 1D și 2D; vi) aplicarea unui nivel secundar de analiză cum sunt procedurile de deconvoluție și cuantificare a conținutului elementelor componente; vii) analiza statistică în componente principale pentru determinarea celor mai relevanți parametri și corelații ale acestora, utilizată pentru clasificarea probelor și viii) utilizarea tehnicilor moderne care presupun folosirea inteligenței artificiale, în particular utilizarea rețelelor neuronale artificiale și instrumente de învățare automată (machine learning) pentru prezicerea proprietăților biomaterialelor.

CAPITOLUL 1 Materiale biologice

1.1 Biomateriale obținute prin *electrospinning*

Biomaterialele sunt materiale naturale sau sintetice special concepute pentru a interacționa cu sistemele biologice. Cea mai comună abordare de clasificare a biomaterialelor se bazează pe tipul de materiale utilizate. Astfel, acestea pot fi clasificate în: metale, ceramici, polimeri și substanțe compozite. De asemenea, în funcție de sursa lor, se pot clasifica ca fiind naturale sau sintetice. Un atribut esențial al unui biomaterial este biocompatibilitatea. Astfel, biocompatibilitatea biomaterialelor, se referă la performanța oricărui material plasat într-un mediu biologic specific de a obține un răspuns adecvat din partea gazdei [1]. Biomaterialele sunt materiale care sunt folosite tot mai des în știința medicală în ultimele decenii. În corpul uman, o serie de țesuturi ale corpului, cum ar fi dinții, ligamentele, tendoanele oaselor și altele au fost înlocuite cu succes de aceste biomateriale. În momentul de față, aplicații din ce în ce mai diverse ale biomaterialelor sunt prezise și așteptate de a fi puse în practică deci urmează să fie tot mai studiate. O provocare importantă în utilizarea acestor biomateriale este atenuarea respingerii imune. Astfel, standardele actuale ale implanturilor realizate pentru întreaga viață și înlocuirea osoasă implică biocompatibilitate totală a biomaterialului utilizat față de caracteristicile biologice și mecanice ale țesutului înlocuit. Până acum au fost descoperite o serie semnificativă de biomateriale care datorită biocompatibilității și biodegradabilității lor sunt utilizate în mod frecvent în bioterapie și știința medicală. Aceste biomateriale pot fi grupate în două categorii și anume polimeri naturali sau sintetici, care au căpătat astfel o atenție destul de importantă [2].

1.1.1 Principiile de producere a fibrelor prin *electrospinning*

Procesul de *electrospinning* (sau electrofilare) este o tehnologie utilizată pe scară largă pentru producerea de fibră electrostatică, care utilizează forțe electrice pentru a produce fibre polimerice cu diametre cuprinse între 2 nm și câțiva micrometri folosind soluții polimerice atât din polimeri naturali, cât și din polimeri sintetici [3]. Acest proces de electrospinning este o tehnică veche, care a fost observată pentru prima dată în 1897 de către Rayleigh și studiat în detaliu de Zeleny în 1914 [4]. Lucrarea lui Taylor din 1969 despre avioanele cu propulsie electrică a pus bazele pentru electrofilare [5]. *Electrospinning*-ul este o tehnica de filare care folosește forțe electrostatice pentru a produce fibre fine obținute din soluții polimerice. Pentru a produce aceste fibre este necesară o tensiune electrică (kV) pentru a genera electrofilare [6]. Un sistem de *electrospinning* este format din 3 componente majore (vezi Figura 1.1): o sursa de înaltă tensiune, seringă și o placă de colectare împământată (sau un tambur rotativ) care utilizează o sursă de înaltă tensiune pentru a transmite sarcina cu o anumită polaritate în soluția de polimer care este accelerat

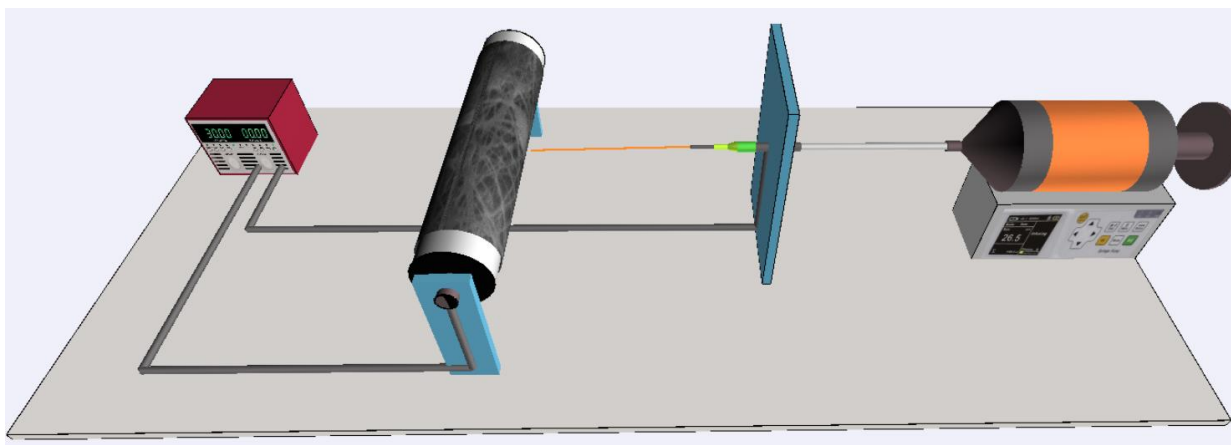


Fig. 1.1. Schema de principiu a unui dispozitiv de *electrospinning* (electrofilare) care constă dintr-o seringă (rezervor a soluției de electrofilare), acționată de un injectomat (pompă), un tub flexibil care duce la un ac metalic fixat pe un suport, un tambur (acoperit sau confecționat dintr-un material conductor electric) care se rotește cu viteză variabilă fiind acționat de un motor și o sursă de înaltă tensiune reglabilă cu borna pozitivă conectată la acul metalic și cu borna negativă conectată la tamburul rotitor (o simulare a procesului de *electrospinning* poate fi urmărită la <https://nmr4.utcluj.ro/Ramo/Electrospinning/>).

către un colector având polaritate electrică opusă. Majoritatea polimerilor sunt dizolvați cu ajutorul unor solvenți înainte de procesul de electrofilare. Fluidul polimeric este apoi introdus în seringă pentru electrofilare. Deoarece solventul sau polimerul folosit pot emite mirosuri neplăcute sau chiar dăunătoare, se recomandă ca aceste procese să fie făcute în camere cu sistem de ventilație [7]. Datorită câmpului electric aplicat se formează Conul Taylor, un jet de soluție încărcat electric care este *aruncat* din vârful acului. În timpul acest proces, solventul se evaporă iar polimerul ajunge pe placa de colectare sub formă de fibră [8]. Astfel, procesul de *electrospinning* oferă o tehnică simplificată pentru formarea fibrelor.

1.1.2 Aplicații ale fibrelor produse prin *electrospinning*

Tot mai recent au început să se analizeze diverse aplicații ale fibrelor produse prin *electrospinning*. Nanofibrele electrofilate sunt aplicate pe scară largă în aplicații biomedicale, structuri care susțin dezvoltarea și regenerarea țesuturilor în procesele de inginerie tisulară (ingineria de producere a țesuturilor), în vindecarea rănilor, administrarea de medicamente, filtrare, ca membrană de afinitate în procesele de separare și purificare foarte specifice, în imobilizarea enzimelor, în implanturi de grefă vasculară cu diametru mic, biotehnologie, în ingineria mediului, în stocarea și generarea energiei dar și în diverse alte cercetări care sunt în desfășurare [9-11]. *Electrospinning*-ul este o platformă de producție utilizată pe scară largă pentru ingineria țesuturilor, unde, se pot produce structuri care imită îndeaproape matricea extracelulară. Ingineria tisulară utilizează tratamente celulare regenerative (metode fără schele) și biomateriale avansate (metode bazate pe schele) pentru a promova recuperarea țesuturilor din jurul unui porțiuni specifice care prezintă un defect (vătămare) și care este vizată pentru recuperare/regenerare [12].

1.2 Biosolide

Biosolidele sunt solide organice obținute prin tratarea nămolului obținut de la stațiile de epurare și tratare a apelor uzate. În timpul epurării apelor uzate, lichidele sunt separate de solide, iar solidele rezultate pot să conțină materie organică și nutrienți. Dacă aceste solide ar fi să fie folosite pentru a obține îngrășăminte organo-minerale performante atunci, datorită conținutul redus de nutrienți al acestor biosolide este necesară adăugarea de îngrășăminte și compuși minerali în rețeta de producere. Procesarea acestora implică acțiuni termo-mecanice și extrudare reactivă, care, printr-o amestecare eficientă la nivel molecular, facilitează dezvoltarea reacțiilor chimice între componente. Astfel, se obține o structură omogenă, atât fizic cât și chimic, a granulelor [13, 14]. Biosolidele utilizate în agricultură sunt solide organice obținute prin *digestia* și stabilizarea nămolurilor rezultate din epurarea apelor uzate pentru a reduce concentrațiile de agenți patogeni și substanțe chimice toxice sub nivelurile stabilite, astfel putând fi utilizate în siguranță ca îngrășăminte fără a afecta astfel sănătatea plantelor, a solului și apelor subterane și astfel, în mod indirect, fără a afecta sănătatea consumatorilor de produse agricole sau animale [15-17]. Datorită creșterii populației globale, urbanizării și industrializării, volumul apelor uzate și, ca urmare, cantitatea de nămol brut de epurare și deci de biosolide crește continuu. Pe de altă parte, creșterea populației va duce la creșterea cererii de producție agricolă și alimentară. Gradul de satisfacere a acestei cereri depinde, în principal, de cantitatea de îngrășământ folosită de fermieri pe terenurile lor agricole. În aceste circumstanțe, utilizarea biosolidelor ca îngrășământ pare a fi o opțiune foarte bună [18].

1.2.1 Componentele principale ale unui biosolid utilizat ca și fertilizator

De obicei, biosolidele conțin concentrații mari de azot (N), fosfor (P), potasiu (K) și sulf (S) și mai mulți micro-nutrienți, inclusiv cupru (Cu), zinc (Zn), calciu (Ca), magneziu, bor (B), molibden (Mo) și mangan (Mn). De exemplu, în Australia rata de aplicare a biosolidelor este determinată de azotul total și de așa numitul NLBAR. Cu toate acestea, o preocupare legată de NLBAR este raportul tipic scăzut N:P (azot/fosfor) în biosolide. De exemplu în ceea ce privește cerințele de îngrășăminte pentru culturile agricole, se urmărește ca la aplicarea de biosolide pe bază de N să nu ducă la un exces de P. Atunci când biosolidele sunt aplicate în mod obișnuit, acest lucru poate duce la acumularea progresivă a nivelurilor de P din sol, crescând riscul transportului fosforului către cursurile de apă prin eroziune și scurgere [19, 20].

Îngrășămintele organo-minerale pe bază de biosolide studiate în cadrul programului experimental au fost produse local de INMA București – Filiala Cluj-Napoca (Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Mașini și instalații Proiectate Agriculturii și industriei

Alimentare). În rețetele utilizate unele componente au doar rol de îngrășământ iar altele, care sunt esențiale pentru asigurarea matricei și care face posibilă prelucrarea prin extrudare reactivă, au și rol de îngrășământ. Biosolidul rezultat din compostarea nămolului din apele uzate este o componentă esențială care furnizează materie organică și parțial macro și micro-nutrienți. Biosolidul utilizat în rețetă a fost achiziționat de la SEdC Mioveni, România. Conținutul de materie organică (aproximativ 43 %) este de aproximativ dublu față de conținutul de carbon organic. Acest procent de materie organică, datorită structurii ei inițiale sau datorită aplicării unor cantități mari de îngrășăminte minerale, este foarte important pentru regenerarea solurilor, în special a celor sărace în această materie organică [21-23].

Pentru probele caracterizate în prezentul studiu aproximativ 50 % din fracția solidă a biosolidului este materie organică și are un efect pozitiv semnificativ asupra proprietăților fizice, chimice și biologice ale solului agricol [17, 21]. Printre altele (vezi Tabelul 1.1), componentele introduse în cele trei versiuni ale formulei (V1, V2 și V3) în cantitate relativ mare au fost: amidonul, hidrolizatul proteic și melasa. Amidonul de porumb din comerț a fost obținut de la SC Roquette SA Calafat și a avut un conținut de umiditate de 12.01 % și o densitate de 0.561 g/cm³. Hidrolizatul proteic a fost obținut la Sucursala Cluj Napoca a INMA București.

Tabelul 1.1. Compoziția variantelor de fabricație (V1, V2 și V3) ale îngrășămintelor organo-minerale pe bază de biosolide [21].

Crt. Nr.	Material brut	Varianta V1 [%]	Varianta V2 [%]	Varianta V3 [%]
1	Biosolid uscat (umiditate max. 20%)	30.00	30.00	30.00
2	Fosfat de mono-amoniu (MAP)	24.50	0.00	25.00
3	Fertilizatori minerali (N/P 20:20)	0.00	24.00	0.00
4	Nitrat de potasiu (KNO ₃)	22.20	23.10	23.00
5	Amidon	7.98	7.47	7.50
6	Uree	5.30	6.30	6.20
7	Proteine hidrolizate (soluție 11 %)	4.00	4.00	4.00
8	Sulfat de magneziu (MgSO ₄)	3.30	2.82	3.56
9	Melasă din sfeclă de zahăr	2.23	1.89	0.00
10	Sulfat de mangan (MnSO ₄)	0.22	0.19	0.24
11	Sulfat de fier (FeSO ₄)	0.11	0.09	0.11
12	Sulfat de zinc (ZnSO ₄)	0.08	0.07	0.09
13	Sulfat de cupru (CuSO ₄)	0.05	0.04	0.06
14	Sulfat de cobalt (CoSO ₄)	0.03	0.03	0.03
15	Acid ortofosforic (H ₂ PO ₄)	0.00	0.00	0.21

1.2.2 Producerea fertilizanților organo-minerali pe baza de biosolide

Conform reglementărilor Uniunii Europene, îngrășământul organo-mineral este definit ca îngrășământ obținut prin amestecarea, reacția chimică, granularea sau dizolvarea în apă a

îngrășămintelor anorganice având un conținut declarat de unul sau mai mulți nutrienți primari cu îngrășăminte organice, sau amelioratorul de sol [18]. Conținutul scăzut de nutrienți din biosolide înseamnă că pentru producerea de îngrășăminte organo-minerale de înaltă performanță este necesar să se introducă în formula lor de fabricație, pe lângă biosolide, și compuși minerali [17, 24]. Utilizarea îngrășămintelor organo-minerale în agricultură este în creștere în mare parte datorită unor avantaje față de aplicarea unică de îngrășăminte minerale sau de aditivi organici [25]. Combinația de îngrășăminte organice și minerale îmbunătățește interacțiunea dintre minerale și plante prin reducerea absorbției minerale a fosforului, creșterea disponibilității fosforului din plante, creșterea activității biologice a solului și activarea activității rădăcinilor plantelor tinere [26-28]. Dintre diferitele forme fizice de prezentare a îngrășămintelor organo-minerale, cea mai potrivită este cea granulară. Îngrășămintele organo-minerale granulare au un conținut scăzut de apă și alte substanțe volatile, necesită mai puțin spațiu de depozitare, poluează mai puțin mediul prin eliminarea posibilității de formare a prafului, permit mecanizarea aplicării pe sol și astfel precizia împrăstierii [29].

Procesul de producere a îngrășământului organo-mineral pe bază de biosolid granular presupune mai multe etape. Prima etapă este pregătirea materiilor prime care constă în gruparea și amestecarea acestora în două categorii: i) un amestec de componente solide (biosolid uscat, fosfat mono-amoniu sau îngrășământ mineral N/P 20:20, azotat de potasiu și amidon) și ii) un amestec de componente lichide (hidrolizat proteic în care se dizolvă ureea, melasa și microelementele sub formă de sulfat) [13].



Fig. 1.2. a) Dispozitiv de producere a fertilizatorilor organo-minerali pe bază de biosolide localizat la INMA București Filiala Cluj-Napoca și b) fertilizatorii organo-minerali pe bază de biosolide (V1, V2, V3) produși de INMA București Filiala Cluj-Napoca [13, 14].

CAPITOLUL 2 METODE AVANSATE DE CARACTERIZARE A BIOMATERIALELOR

2.1 Rezonanța magnetică nucleară

2.1.1 Principiile rezonanței magnetice nucleare

Rezonanța Magnetică Nucleară (pe scurt RMN) este o tehnică extrem de puternică pentru analiza materialelor de tipuri diverse. Nu există o alta metodă care să se poate mândri cu o aplicabilitate atât de mare în atât de multe domenii, cum sunt: studiul chimiei organice și anorganice, al polimerilor, catalizatorilor și membranelor, al materialelor precum ceramicile, cimentul, sticlele și zeoliții, al supraconductorilor, vopselelor și lemnului, precum și al biomaterialelor – incluzând creierul, țesuturile moi și dure, celulele, proteinele, sângele și plasma. Acest domeniu de investigație acoperă, de asemenea, procesarea alimentelor, plantelor și a solului, geologia, explorările petroliere și chiar studiul gheții antarctice.

2.1.2 Ecuațiile Bloch și timpii de relaxare spin-rețea, T_1 și spin-spin, T_2

În Rezonanța Magnetică Nucleară, evoluția magnetizării nucleare $\vec{M}(t)$ sub influența unui câmp magnetic extern $\vec{B}_0(t)$ este reprezentată, într-o manieră empirică, de către Ecuațiile Bloch. Astfel, se poate considera că magnetizarea nucleară macroscopică (pentru un ansamblu statistic, relevant, de spini) este sursa semnalului RMN, $S(t)$, din care se *colectează* informațiile prin analize specifice. Dacă presupunem că sistemul investigat este considerat ca o "cutie neagră" caracterizată de timpii de relaxare transversală (T_2) și longitudinală (T_1), magnetizarea la echilibru (M_0) și răspunsul sistemului de spini aflați în interacțiune cu câmpurile magnetice externe (sau interne). Astfel se poate utiliza ecuația lui Bloch generală, care se scrie sub următoarea formă:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B}) - \frac{M_x \cdot \vec{i} + M_y \cdot \vec{j}}{T_2} - \frac{(M_z - M_\infty) \cdot \vec{k}}{T_1}, \quad (2.1)$$

sau, dacă proiectăm această ecuație de-a lungul celor trei coordonate (Ox, Oy și Oz) obținem setul de trei ecuații Bloch:

$$\begin{cases} \frac{dM_x}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_y - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_z - \frac{(M_z - M_\infty)}{T_1} \end{cases}, \quad (2.2)$$

unde magnetizarea nucleară totală este calculată ca fiind $\vec{M}(t) = \sum_{i=1}^N \vec{\mu}_i$. N este numărul de nuclee din proba de măsurat iar $\vec{\mu}_i$ este momentul magnetic al nucleului i , unde i parcurge toate nucleele [30, 31].

2.1.3 Secvența de impulsuri CPMG pentru măsurarea timpului de relaxare spin-spin, T_2

Timpul de relaxare longitudinal, T_1 , este cel mai des măsurat prin tehnica numită *inversion recovery* (recuperarea/remagnetizarea după inversie). Un prim impuls de radiofrecvență de 180_y° are ca efect rotirea magnetizării totale (aflată inițial pe direcția Oz) cu 180° și care după impuls se orientează în lungul direcției $-Oz$. După evoluția sistemului de spini pe durata unui interval de timp τ , o parte din spinii nucleari s-au relaxat.

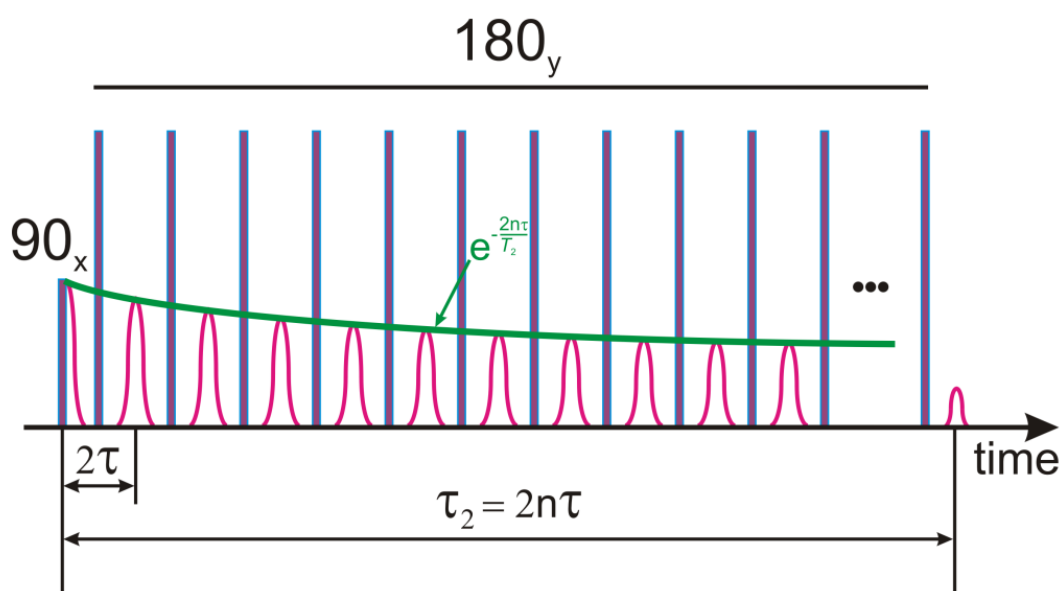


Fig. 2.1. Secvența de impulsuri de radiofrecvență CPMG (Carr-Purcel-Meiboom-Gill) și scăderea exponențială a trenului de ecouri [30, reproducere cu permisiune].

2.1.4 Transformata Laplace

Evaluarea distribuțiilor timpilor de relaxare spin-rețea (longitudinală), T_1 și spin-spin (transversală), T_2 poate fi folosită pentru a identifica și studia diferitele specii moleculare în funcție de dinamica acestora. În ultima perioadă s-au dezvoltat noi metode de rezonanță magnetică nucleară care permit unui sistem de spini să evolueze sub influența a diferitelor mecanisme de relaxare, fapt care poate duce la obținerea proprietăților macroscopice ale acestor specii moleculare. Aceste metode se bazează pe analiza datelor măsurate prin utilizarea transformatei Laplace inversă, care din acest punct de vedere este asemănătoare cu metodele spectroscopice RMN multidimensionale clasice [30, 32-36].

În general, transformata Laplace reprezintă o metodă practică de soluționare a anumitor tipuri de probleme care implică diferite mecanisme de relaxare atunci când condițiile inițiale sunt date. Astfel, evoluția magnetizării unui sistem de spini este considerată ca o sumă de căderi descrise de mai multe funcții exponențiale având constante de timp (T_2) diferite. Fiecare dintre aceste căderi este caracterizată de câte o anumită pondere (sau probabilitate) din magnetizarea totală $A(T_2)$,

$$M(t) = \sum_{i=1}^N A(T_{2,i}) e^{\frac{-t}{T_{2,i}}}, \quad (2.3)$$

În general, această ecuație se poate scrie sub forma matematică a transformatei Laplace [30, 32-36]:

$$F(s) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-st} dt, \quad (2.4)$$

unde pentru $s = j\omega$ (cu $j^2 = -1$, numărul imaginar) se obține transformata Fourier. Astfel că se poate spune că, transformata Fourier este transformata Laplace evaluată doar pe axa imaginară. Scopul utilizării transformatei Laplace inversă este acela de a determina, din datele măsurate, funcțiile de distribuție ale timpilor de relaxare $A(T_2)$ unidimensionale. Transformata Laplace poate fi aplicată cu succes și pentru a identifica funcții de corelație multidimensionale (ca de exemplu mape parametrice $T_2 - T_2$ și $T_1 - T_2$).

2.2 Spectroscopia FT-IR

Spectroscopia în infraroșu este una dintre metodele moderne (alături de spectroscopia RMN și spectrometria de masă) care permite, prin analiza spectrală identificarea tipurilor de molecule care sunt prezente într-o probă dar și concentrația acestora. În lume, sunt mai multe tipuri de spectrometre cu infraroșu, dar cel mai utilizat este cel de tipul FT-IR. Termenul de FT-IR provine de la cuvintele *Fourier Transform Infrared*. În acest caz, termenul potrivit folosit pentru a descrie lumina este ca formă de radiație electromagnetică. Astfel se consideră că lumina, ca undă electromagnetică, este compusă din oscilații electrice și magnetice reprezentate de către vectorul în câmp electric și vectorul în câmp magnetic. Distanța parcursă de o undă în timpul unui ciclu (unei perioade) se numește lungimea de undă, pentru care se folosește litera greacă lambda (λ). O altă proprietate importantă a unei unde electromagnetice (luminoase sau mai ales în domeniul infraroșu) este numărul de undă, care este notat prin litera $\tilde{\nu}$. Numărul de undă măsoară numărul de cicluri prin care trece o undă pe unitatea de lungime (1 m). Aceste numerele de undă sunt măsurate în unități de cicluri pe centimetru, care sunt frecvent abreviate ca cm^{-1} și pot fi pronunțate

ca *centimetri inverși*, *centimetri reciproci* sau chiar *număr de undă*. Astfel, de exemplu, dacă un spectru are un *peak* la 3000 cm^{-1} , acesta înseamnă că proba a absorbit lumină infraroșie care a suferit 3000 de cicluri pe centimetru. Cele mai multe spectre măsurate în domeniul infraroșu sunt reprezentate grafic, pe axa x de la stânga la dreapta de la 4000 la 400 cm^{-1} . Graficele spectrelor FT-IR ar trebui să urmeze întotdeauna această convenție [37-42].

Spectrul de absorbanță al unei probe se calculează din următoarea ecuație:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right), \quad (2.5)$$

unde A este absorbanța, I_0 este intensitate în spectrul de fundal iar I este intensitatea în spectrul eșantionului (proba de măsurat).

Absorbanța este legată de concentrația de molecule dintr-o probă prin intermediul unei ecuații numită *Legea lui Beer* (sau *Beer-Lambert*):

$$A = \varepsilon \ell c. \quad (2.6)$$

unde, ε este coeficientul de absorbție, ℓ este lungimea traseului iar c este concentrația soluției.

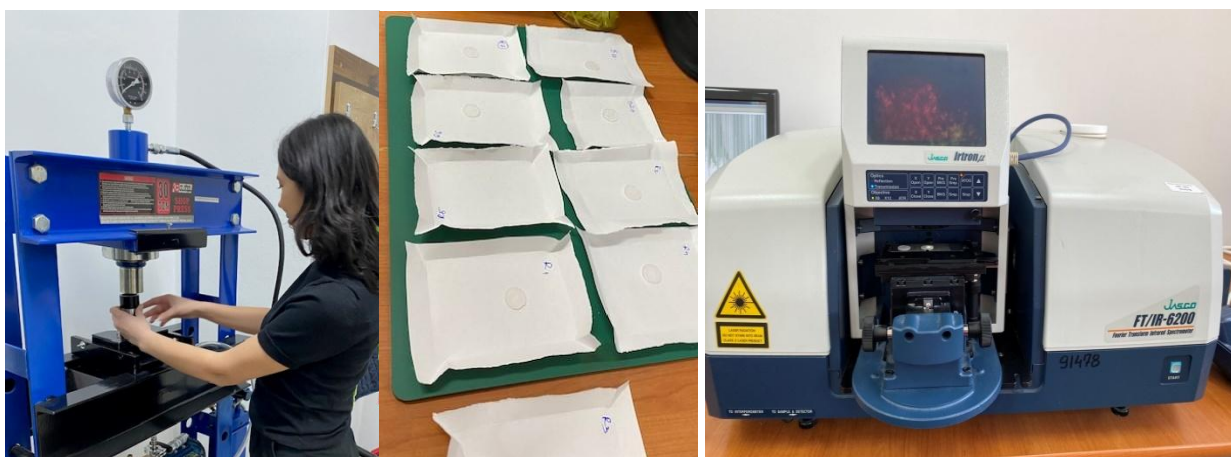


Fig. 2.2. a) Prepararea probelor pentru măsurătorile de spectroscopie FT-IR și b) Spectrometrul FT-IR Jasco 6200 utilizat în cadrul studiilor experimentale.

2.3 Spectroscopia UV-VIS

Printre alte tehnici, cum ar fi determinarea punctului de topire, a indicelui de refracție și a densității, spectroscopia optică în domeniul radiației ultraviolete și lumină vizibilă (UV-VIS) este aplicată pe scară largă în aproape toate locurile de muncă în cercetare, producție și controlul calității pentru clasificarea și studiul substanțelor. Spectroscopia UV-VIS se bazează pe absorbția luminii de către o probă de interes. În funcție de cantitatea (fluxul) de lumină și lungimea de undă absorbită de un eșantion, se pot obține informații valoroase, cum ar fi puritatea probei sau elementele componente. Cu atât mai mult, cantitatea de radiație absorbită este legată de masa probei, iar prin urmare, analiza cantitativă este posibilă prin spectroscopie optică. Spectroscopia optică se bazează astfel pe interacțiunea luminii cu materia [43].

2.4 Difrakția de raze X

Cristalografia bazată pe difrakția de raze X incidente pe probe de obicei de pulbere este o metodă bine stabilită și utilizată pe scară largă în domeniul caracterizării materialelor pentru a putea obține informații despre structura atomică a diferitelor substanțe aflate într-o varietate de stări. Au existat numeroase progrese în acest domeniu, de la descoperirea difrakției de raze X din cristale în 1912 de către Max von Laue și în 1913 de W.L. Bragg și W.H. Bragg. Originea metodelor cristalografice poate fi urmărită până la primele studii ale aspectului exterior ale mineralelor naturale. De atunci o mare cantitate de date au fost sistematizate prin aplicarea geometriei (diverse proiecții) și teoria grupurilor. Astfel, cristalografia devine o metodă valoroasă pentru studiul modului în care cristalele pot fi construite din unități mici prin repetarea corespunzătoare, la infinit, a unităților structurale identice (celulele elementare) în spațiu [44].

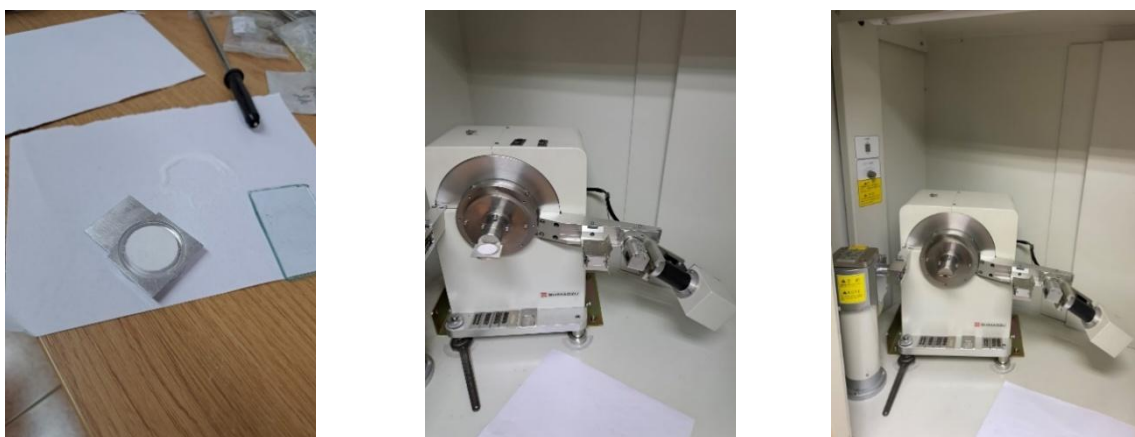


Fig. 2.7. a) Prepararea probelor pentru DRX; b) și c) Difractometrul de raze X 6000 SHIMADZU.

2.5 Imagistica prin scanare electronică de baleiaj, SEM

Microscopul electronic cu scanare (SEM) s-a demonstrat a fi unul dintre cele mai versatile instrumente disponibile pentru analiza morfologiei și examinarea microstructurii și caracteristicile compoziției chimice. Tehnicile SEM oferă informații despre topografie și alcătuirea suprafețelor prin colectarea și prelucrarea semnalelor care sunt generate de o sondă (fascicul) de electroni ascuțită (focalizat) într-un anumit volum de interacțiune. Principalele avantaje pot fi rezumate după cum urmează: 1) în primul rând, SEM oferă o vizualizarea *impunătoare* a structurilor („*image to imagination*”). Aceasta se datorează capacității de a produce imagini cu plasticitate ridicată și aproape stereoscopice (cu valente 3D) ca aspect, și, în funcție de condițiile imagistice, o adâncime mare de focalizare chiar și pentru mostre cu relief pronunțat; 2) în al doilea rând, există o gamă uriașă de mărimi reglabile de la mărirea lupei de citire (aproximativ de 10 ori), de exemplu, pentru cartografierea de ansamblu a zonelor mari de eșantionare sau pentru identifica regiunile de interes și posibilitatea de a mări intervalul până la câțiva nanometri, în funcție de instrument

(standard vs. rezoluție înaltă) și proprietățile probei; 3) în al treilea rând, există puterea analitică de a obține informații despre compoziția materialului prin selectarea semnalelor provenite din interacțiuni specifice, așa cum sunt, de exemplu, cuantele de raze X caracteristice sau electroni retrodifuzati (împrăștiați în spate).



Fig. 2.3. a) Prepararea probelor pentru analiza SEM b) Microscopul SEM JEOL JSM 5600LV cu scanare prin baleiaj.

Este necesar să se cunoască câteva principii de bază specifice interferenței luminii opticii pentru a înțelege fundamentele microscopiei electronice. Când centrul a doi *peak*-uri primari sunt separate de o distanță egală cu raza discului Airy, atunci două obiecte pot fi distinse unele de altele, iar sistemul poate fi descris matematic prin ecuația lui Abbe:

$$d = 0.612 \lambda / n \sin \alpha, \quad (2.7)$$

unde d este rezoluția, λ este lungimea de undă a radiației caracteristice, n este indicele de refracție a mediului între sursa punctuală și lentilă iar α este jumătate din unghiul conului de lumină din planul specimenului acceptat de obiectiv (unghiul de jumătate de deschidere în radiani). Termenul $n \times \sin(\alpha)$ este adesea numit deschidere (apertură) numerică.

Înlocuirea sursei de iluminare și a lentilei condensatorului cu fascicul de electroni și bobine electromagnetice din microscopie duce la apariția de transmisie electronică. Microscopul cu transmisie electronică (TEM) a fost construit pentru prima dată în anul 1930 iar fasciculul de electroni a fost focalizat de către o lentilă de condensare electromagnetică. Față de TEM, SEM utilizează un fascicul de electroni focalizat pentru a scana suprafața specimenului sistematic, producând un număr mare de semnale (electroni secundari și radiație electromagnetică caracteristică). Aceste semnale electronice sunt în cele din urmă convertite într-un semnal vizual afișat pe ecran ca imagine [45].

CAPITOLUL 3 CARACTERIZAREA FERTILIZANȚILOR ORGANO-MINERALI PE BAZĂ DE BIOSOLIDE

3.1 Rezonanța magnetică nucleară uni-dimensională folosită pentru caracterizarea fertilizanților organo-minerali

Rezonanța magnetică nucleară este o metodă puternică pentru caracterizarea materialelor în special acelora de proveniență organică cum sunt fertilizatorul organo-mineral pe bază de biosolide. Tipurile de fertilizatori pe bază de biosolide produse în cadrul programului experimental al tezei se încadrează foarte bine în această categorie. Una din abilitățile rezonanței magnetice nucleare, este aceea că se pot folosi mai multe tipuri de secvențe de impulsuri, pentru a măsura diferiți parametri RMN specifici probelor de studiat. Una dintre aceste secvențe de impulsuri RMN se numește *saturation recovery*, și este folosită pentru determinarea distribuțiilor timpilor de relaxare spin- rețea, T_1 [46, 47].

3.1.1 Distribuțiile 1D ale timpilor de relaxare spin-rețea, T_1

O altă valență a rezonanței magnetice nucleare, este aceea, că spre deosebire de multe alte metode de caracterizare, poate să ne ofere distribuții ale parametrilor măsurați și nu doar o valoare care să caracterizeze global probele măsurate [48, 49]]. În figura 3.1 sunt prezentate distribuțiile timpilor de relaxare T_1 pentru cei trei fertilizatori V1, V2 și V3 produși, și ale căror elemente componente sunt prezentate în Tabelul 1.1. Se pot observa asemănări destul de mari ale curbelor de distribuție a lui T_1 pentru fertilizatori V2 și V3, în schimb proba V1 prezintă o distribuție a timpilor de relaxare T_1 diferită.

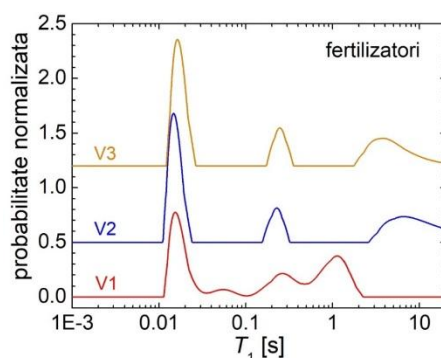


Fig. 3.1. Distribuțiile timpilor de relaxare longitudinală a lui T_1 pentru cele trei tipuri de biosolide [21].

3.1.2 Distribuțiile 1D ale timpilor de relaxare spin-spin, T_2

În figura 3.2. sunt prezentate distribuțiile timpului de relaxare spin - spin măsurate pentru fertilizatorii obținuți cu rețetele de preparare V1, V2 și V3. Se observă câteva variații specifice și o diferență față de distribuțiile obținute pentru timpii de relaxare T_1 . În mare, acești *peak*-uri pot să fie asociați cu componente cu dinamică diferită și care conțin hidrogen. Astfel, la valori mici

ale lui T_2 s-ar putea găsi componente ale acestor fertilizatori care conțin hidrogen și care sunt rigide (au o mobilitate redusă).

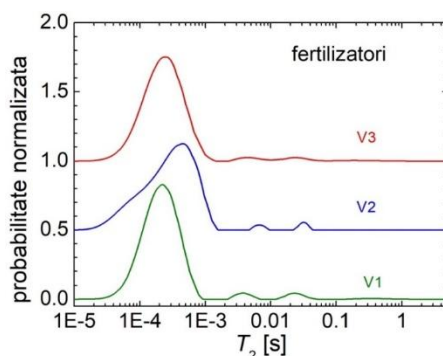


Fig. 3.2. Distribuțiile timpilor de relaxare transversali T_2 pentru cele trei tipuri de biosolide [21].

3.1.3 Distribuțiile 1D ale cuplajului rezidual dipolar

O metodă avansată în rezonanță magnetică nucleară este aceea a folosirii semnalului provenit de la coerențe de mai multe cuante. Cel mai des utilizate sunt coerențele de două cuante. Acestea presupun ca cel puțin doi spini nucleari ai hidrogenului (pentru că acesta este spin-ul măsurat prin rezonanță magnetică nucleară, folosind spectrometru de tip Bruker Minispec) să fie cuplați. Astfel măsurătorile de două cuante acționează ca un filtru pentru spinii izolați iar doar spinii cuplați, și care cel mai probabil se găsesc în componente rigide, să inducă un semnal RMN în bobina de recepție.

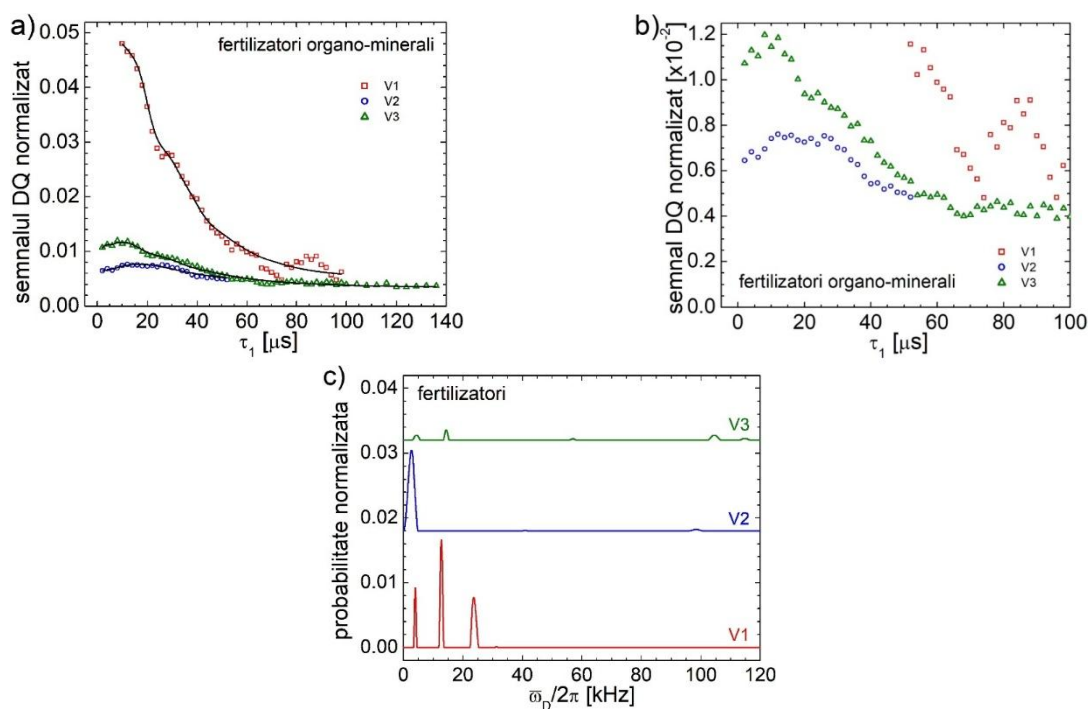


Fig. 3.3. Curbele de creștere și scădere de două cuante măsurate pentru fertilizatorii V1, V2 și V3 prezentate a) la scară normală și b) mărite și c) Distribuțiile cuplajelor reziduale dipolare, $\bar{\omega}_D$ măsurate pentru cele trei tipuri de biosolide din curbele de două cuante prezentate în a) [21].

3.1.4 Spectre RMN a ^1H și ^{13}C sub MAS

Spectrele ^1H și ^{13}C RMN măsurate pentru îngrășămintele organo-minerale V1, V2 și V3 înregistrate în condiții MAS sunt prezentate în figurile 3.5 și 3.6. Ca și caracteristică generală se pot observa asemănările dintre spectrele măsurate, indicând o structură moleculară similară. Acestea constau dintr-un *peak* mic, larg, centrat la ~ 15.27 ppm. Amplitudinea acestui *peak* măsurată pentru fertilizatorul V2 este mult mai mică, în comparație cu amplitudinea, *peak*-urilor măsurate pentru V1 și V3. Apoi se poate observa un *peak* relativ îngust, centrat la ~ 6.89 ppm, cu o *coadă* lungă extinsă până la aproximativ 15 ppm. Un umăr mic apare pentru toate cele trei spectre la aproximativ 1.93 ppm.

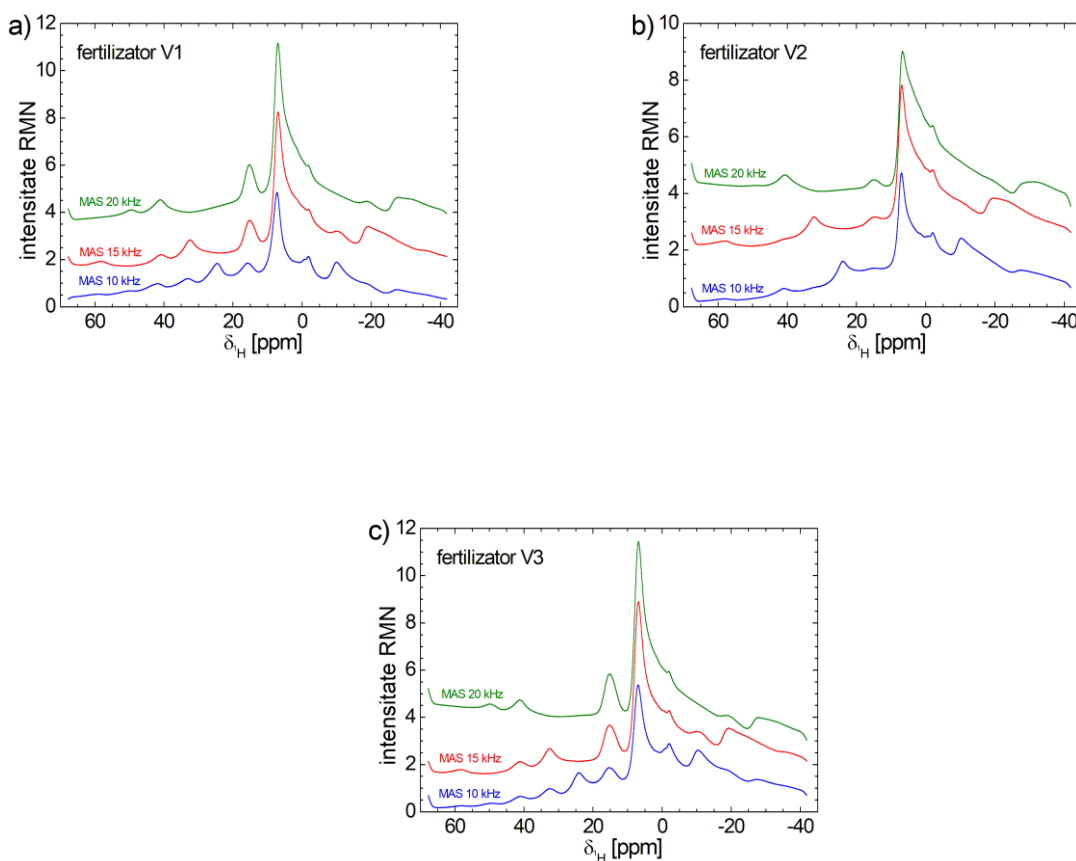


Fig. 3.4. Spectrele RMN ale ^1H măsurate pentru fertilizatorii a) V1, b) V2 și c) V3 sub MAS la frecvențele 10, 15 și 20 kHz [21].

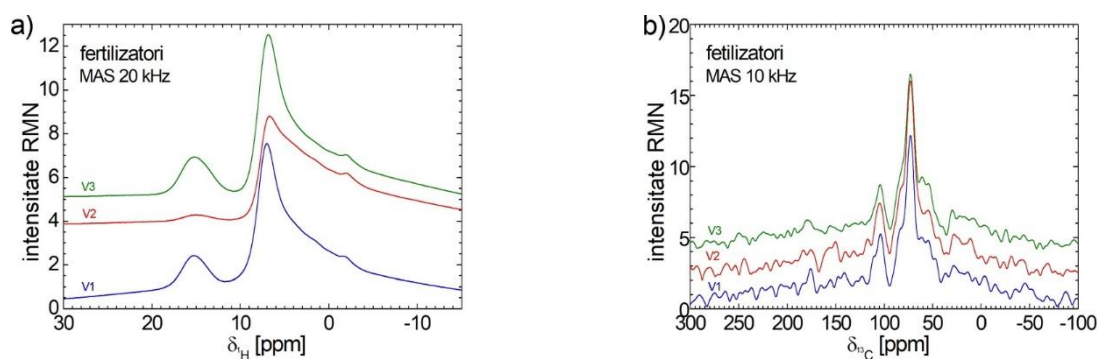


Fig. 3.5. Spectrele RMN a (a) ^1H măsurate sub MAS la 20 kHz și (b) a ^{13}C măsurate sub MAS la 10 kHz pentru fertilizatorii organo-minerali V1, V2 și V3 [21].

3.2 Caracterizarea fertilizanților organo-mineral prin spectroscopie FT-IR

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) este o metodă modernă capabilă să identifice structura probelor simple sau, dacă proba măsurată este mai complexă, să ofere informații detaliate despre tipul de legături chimice. În figura 3.7 sunt prezentate spectrele FT-IR măsurate pentru cele trei îngrășăminte produse prin colaborare în cadrul acestei teze. Se poate observa o asemănare mare între aceste spectre, dar există și diferențe specifice majore între ele. Astfel, pentru analiza spectrelor FT-IR, accentul este pus pe două domenii de interes. Prima zonă se află în intervalul de la aproximativ 2600 la 3800 cm^{-1} , unde se află un *peak* larg asociat cu apa, și prezintă unele maxime mici la aproximativ $2737\text{--}2741\text{ cm}^{-1}$ (asociat cu vibrațiile de întindere a legăturii N-H din (NH_3^+)), $2873\text{--}320\text{ cm}^{-1}$ (asociat cu vibrațiile simetrice ν_s din CH_3 , și cu cele de întindere a legăturilor din C-H, N-H), $2933\text{--}2945\text{ cm}^{-1}$ (asociat cu benzi de întindere C-H, și cu vibrațiile asimetrice ν_{as} din CH_2), $3124\text{--}3127\text{ cm}^{-1}$ și $3241\text{--}3244$ (asociat cu întinderea simetrică a O-H aparținând apei care se găsește intrinsec în probele măsurate sau poate fi absorbită higroscopic ca umiditate din aer) [50, 51].

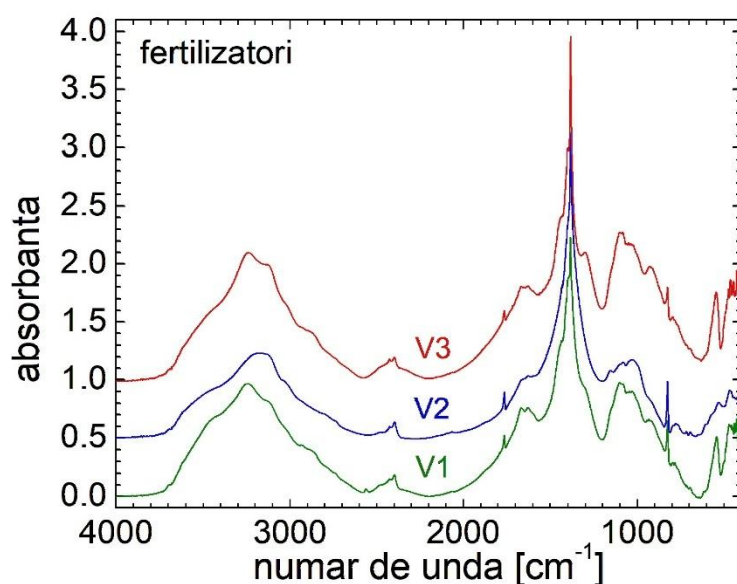


Fig. 3.6. a) Spectrele FT-IR ale probelor V1, V2 și V3 și b) Prepararea probelor pentru măsurătorile de FT-IR [21].

3.3 Caracterizarea fertilizanților organo-mineral prin SEM, EDX și DRX

Dacă analiza FT-IR poate identifica structuri la nivel molecular (prin legături chimice), microscopia electronică cu scanare (SEM) și modelele obținute din difracția de raze X (DRX) pot oferi informații despre organizarea structurală la nivel de la nano la micrometric [56]. Astfel, imaginile SEM-EDX (spectroscopie dispersivă de energie localizată prin SEM) sunt prezentate în figura 3.8 pentru toate cele trei tipuri de îngrășăminte V1 (sus), V2 (mijloc) și V3 (jos). În coloana din stânga este prezentată o hartă (*mapă*) colorată care se suprapune cu imaginile SEM ale unei suprafețe de dimensiune submilimetrică a fiecărui tip de îngrășămintă. Pixelii colorați indică prezența unor elemente particulare și pot fi asociați după cum urmează: i) roșu cu fierul (Fe); ii) albastru deschis cu potasiul (K-kaliu); iii) portocaliul cu sulf (S); iv) roșu deschis cu fosforul (P); v) roz cu siliciul (Si); vi) albastru închis cu aluminiu (Al); vii) galben cu oxigenul (O); viii) verde cu azotul (N); ix) albastru cu carbon (C). Spectrele EDX înregistrate pentru imaginile SEM din stânga sunt prezentate în coloana din dreapta.

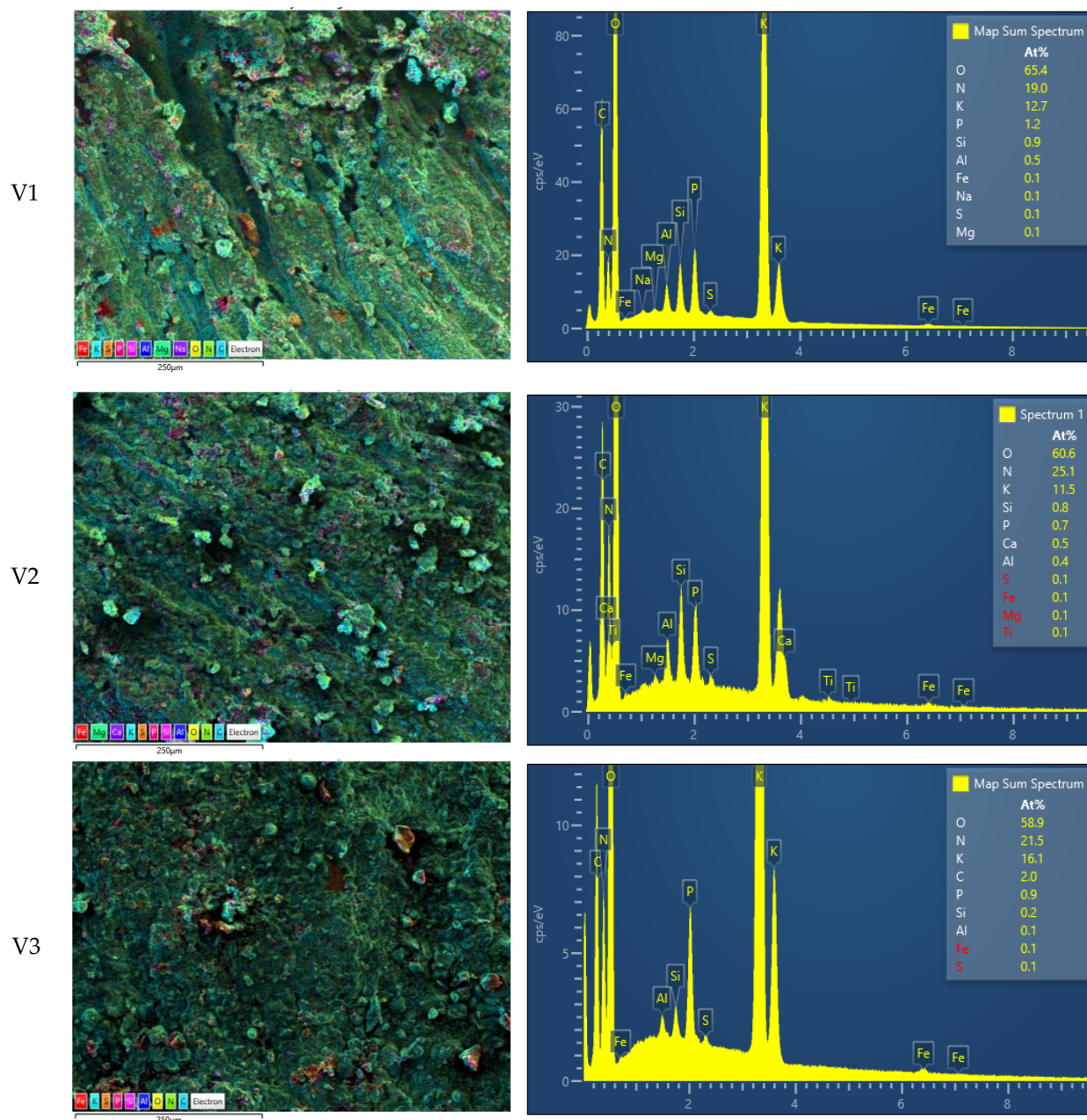


Fig. 3.7. SEM – EDX ale celor mai abundente elemente din îngrășămintele V1, V2 și V3 (stânga) și spectre EDX măsurate din hărțile EDX (dreapta) [21].

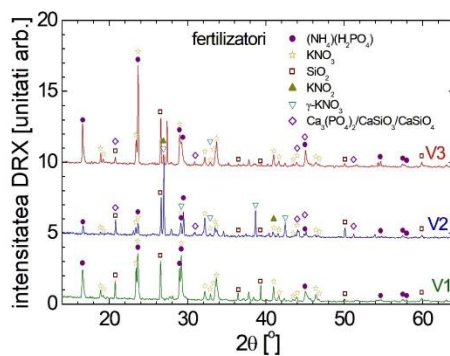


Fig. 3.8. Difractograma de raze-X măsurate pentru probe de fertilizatori V1, V2 și V3 [21].

CAPITOLUL 4 CONSTRUIREA DISPOZITIVULUI DE *ELECTROSPINNING*

4.1 Elementele componente

Aparatul de *electrospinning* (electrofilare) a fost conceput și realizat la o scară mică în cadrul programului experimental al acestei teze de doctorat, pentru a putea produce mostre din diferite tipuri de soluții dar și pentru a putea optimiza parametrii procesului, oferind astfel posibilitatea de a obține diferite tipuri de nanofibre. Elementele componente ale aparatului de *electrospinning* includ o serie de componente esențiale, fiecare având un rol important în producerea și colectarea fibrelor. Proiectarea unor elemente componente ale aparatului de *electrospinning* a fost realizată cu ajutorul programului de proiectare SolidWorks și apoi care au fost printate la o imprimantă 3D localizată în cadrul laboratorului de Rezonanță Magnetică Nucleară și Fizica Senzorilor a Univ. Tehnice din Cluj-Napoca. Camera de protecție a fost elementul cel mai complex și a fost conceput pentru siguranța utilizatorului și pentru menținerea unui mediu cat mai stabil din punctul de vedere al temperaturii și umidității. În Figura 4.1 se poate vedea varianta finală a aparatului de *electrospinning* realizat în laborator. Acest dispozitiv are două niveluri, nivelul inferior cuprinde partea electrică și pompa de injecție, iar nivelul superior cuprinde acul metalic cu ajutorul căruia soluția este eliberată și colectată de tamburul rotitor precum și suportul pentru acul metalic, tamburul rotitor și motorul.



Fig. 4.1. Aparatul de *electrospinning*.

4.2 Construirea dispozitivului

Construirea aparatului de *electrospinning* a avut loc în mai multe etape. În prima fază s-a montat camera de protecție formată din cele două niveluri. La primul nivel au fost amplasate toate elementele electrice (sursa de înaltă tensiune și sursa de alimentare a motorului) dar și pompa de injecție (injectomatul medical). Toate aceste elemente sunt protejate de zona de producerea a fibrelor. În zona de producere a fibrelor a fost necesar ca nivelul superior să fie etanș datorită vaporilor toxici care se formează.

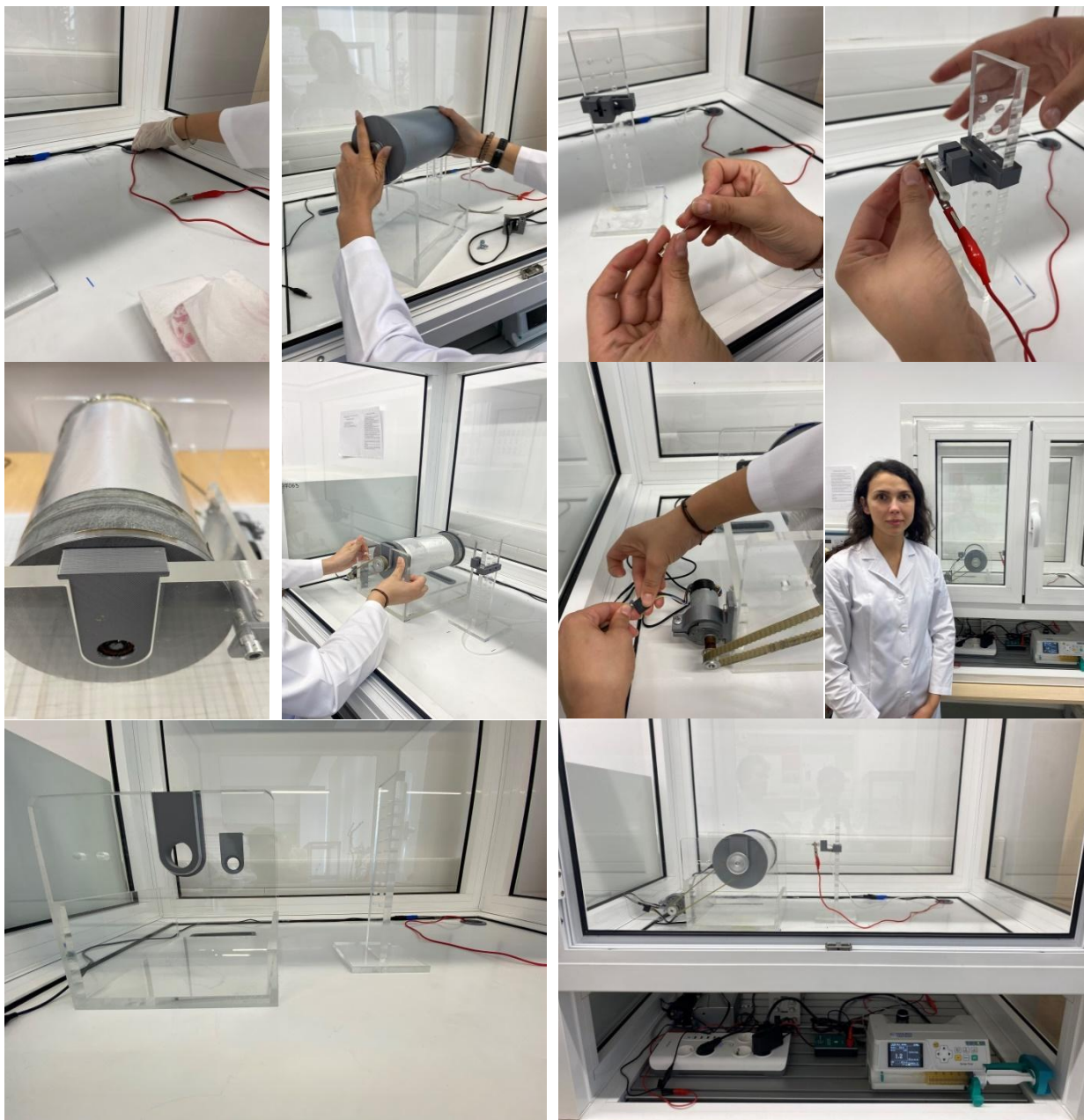


Fig. 4.2. Etapele procesului de construire a dispozitivului de *electrospinning*.

CAPITOLUL 5 Producerea de nanofibre prin *electrospinning*

5.1 Materiale și metode de producerea a nanofibrelor prin *electrospinning*

5.1.1 Materiale

Materialele brute folosite pentru producerea de nanofibre prin *electrospinning* sunt prezentate în Figura 5.1 și au fost achiziționate de la producători diferiți. Astfel, colagenul peptidic, provenit de la animalele terestre, a fost produs de Arkure Health Care (India, Rohtak).



Fig. 5.1. Materiale brute folosite pentru producerea de nanofibre prin *electrospinning* .

5.2 Producerea de nanofibre pe bază de chitosan

Producerea nanofibrelor de chitosan prin procesul de *electrospinning* implică transformarea soluției de chitosan într-un material fibros la scară nano-metrică. Pentru producerea acestor fibre pe bază de chitosan, deoarece chitosanul nu se dizolvă în apă pură, a fost necesară introducerea unor solvenți precum acidul acetic sau acidul formic pentru formarea soluției. Acidul a fost diluat în apă distilată având diferite procentaje. Nanofibrele produse din soluția pe baza de chitosan au fost colectate pe folia de aluminiu de pe tamburul rotitor (vezi Fig. 5.5) iar apoi desprinse cu grijă. În Figura 5.2 b) se pot observa câteva dintre nanofibrele obținute în urma procesului de *electrospinning*.



Fig. 5.2. Obținerea nanofibrelor pe baza de chitosan.

Pentru a simplifica dezlipirea foliei de nanofibre depusă pe folia de aluminiu s-a folosit, suplimentar, un tifon înfășurat doar pe o porțiune a tamburului rotitor. Vizual, folia produsă are o culoare ușor gălbuie și translucidă, iar la atingere folia de chitosan formată are o textură netedă, flexibilă având și o suprafață extrem de fină. Această folie are o structură care poate imita textura și proprietățile mecanice ale țesuturilor biologice. Deoarece chitosanul are o rezistență mecanică mai bună decât alți polimeri naturali, soluția de chitosan a fost folosită în mai multe combinații pentru a îmbunătăți proprietățile altor polimeri naturali precum gelatina sau colagenul.

5.3 Producerea de nanofibre pe bază de PVA

Introducerea unui material sintetic în procesul de *electrospinning* poate ajuta la formarea unor nanofibre cu o structură mecanică mult mai bună [53]. În prima etapă s-a dorit introducerea unui material sintetic precum PVA-ul (polivinil alcool). Pregătirea soluției pentru *electrospinning* este similară cu metoda folosită la formarea soluțiilor pe baza de polimeri naturali. Solventul folosit în acest proces a fost tot acidul acetic în concentrație de 90%, dar dizolvarea polimerului nu s-a putut face la temperatura de 40° C, așa că temperatura a fost crescută la 60° C. Temperatura de 60° C a fost utilizată la toate variantele produse pe bază de PVA, iar în total au fost produse 3 variante pe baza de PVA cu concentrații diferite (100 %, 50 % și 10 %).

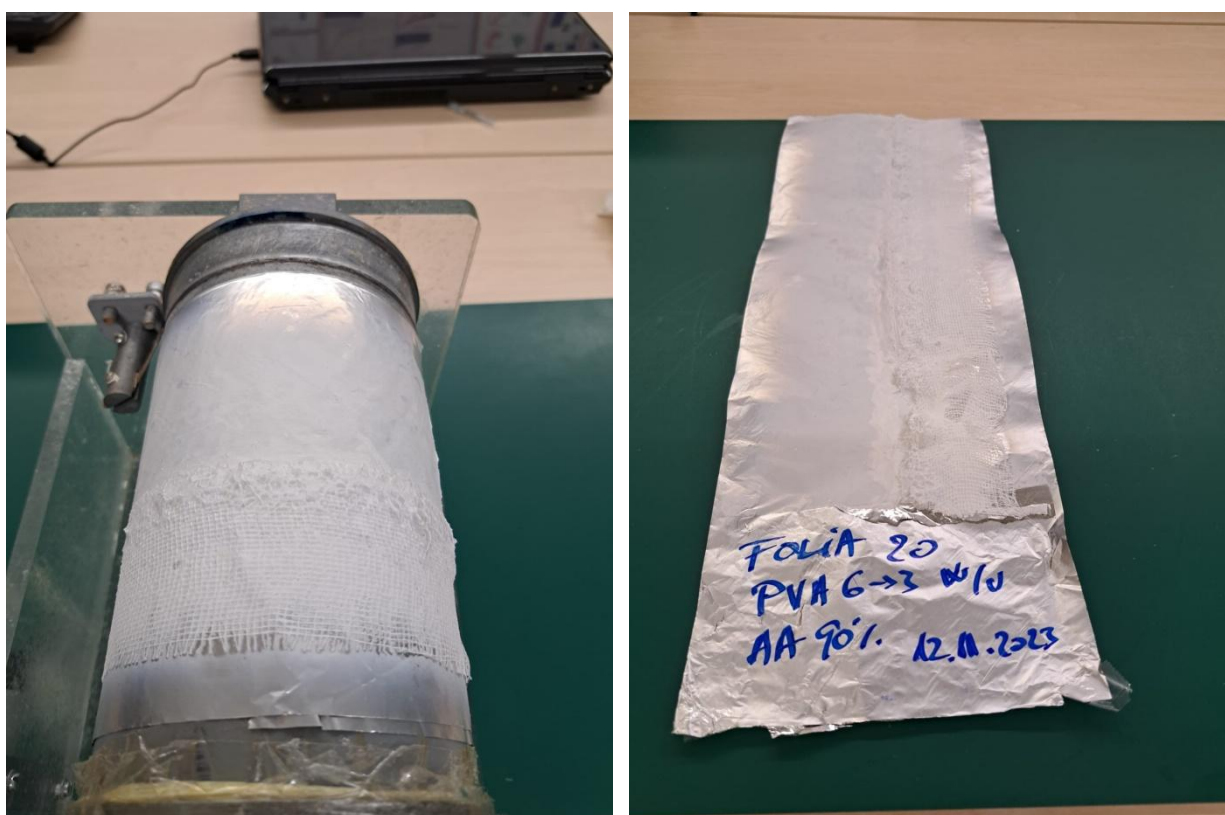


Fig. 5.3. Obținerea nanofibrelor pe bază de PVA.

Soluția de PVA a fost amestecată cu soluție de chitosan (50 % și 90 %). Soluția de PVA nu are o vâscozitate foarte ridicată dar amestecată cu soluția de chitosan, vâscozitatea a crescut relativ mult. Parametrii folosiți pentru producerea fibrelor pe baza de PVA și chitosan au fost diferiți. Textura fibrelor rezultate pe baza de PVA prezintă o rețea de fibre foarte subțiri, fină la atingere. Aceste fibre sunt foarte rezistente la rupere și au o elasticitate mai mare decât fibrele obținute din polimeri naturali [53]. Folia rezultată are culoare alba după cum se poate vedea și în Figura 5.3, iar dezlipirea foliei de pe tambur nu a implicat dificultăți.

Tabelul 5.1. Nomenclatura soluțiilor folosite pentru producerea foliilor de bio-nanofibrelor prin *electrospinning*.

Nomenclatura soluțiilor folosite pentru <i>electrospinning</i> și producerea foliilor	Soluția 1		Soluția 2		Soluția 1 /Soluția 2
	Polimerul 1 [%]	Solventul 1 [%]	Polimerul 2 [%]	Solventul 2 [%]	
Ch6AA60	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 60 %	-	-	100/0
Ch6AA90	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	-	-	100/0
Col6AA05	Colagen 6% w/v	Acid Acetic 05 %	-	-	100/0
Ch6AA90(90):Col6AA05(10)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	Colagen 6% w/v	Acid Acetic 05 %	90/10
Ch6AA90(50):Col6AA05(50)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	Colagen 6% w/v	Acid Acetic 05 %	Stra1/stra2
FG6H ₂ O100	Gelatină din pește 6% w/v	H ₂ O 100 %	-	-	100/0
Ch6AA90(90):FG6H ₂ O(10)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	Gelatină din pește 6% w/v	H ₂ O 100 %	90/10
Ch6AA90(50):FG6H ₂ O(50)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	Gelatină din pește 6% w/v	H ₂ O 100 %	50/50
PVA6AA90	PVA 6% w/v	Acid Acetic 90 %	-	-	100/0
Ch6AA90(90):PVA6AA90(10)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	PVA 6% w/v	Acid Acetic 90 %	90/10
Ch6AA90(50):PVA6AA90(50)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	PVA 6% w/v	Acid Acetic 90 %	50/50
PEG6AA90	PEG 6% w/v	Acid Acetic 90 %	-	-	100/0
Ch6AA90(90):PEG6AA90(10)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	PEG 6% w/v	Acid Acetic 90 %	90/10
Ch6AA90(50):PEG6AA90(50)	Chitosan 6% w/v	Acid Acetic 90 %	PEG 6% w/v	Acid Acetic 90 %	50/50

CAPITOLUL 6 CARACTERIZAREA PROPRIETĂȚILOR MATERIALELOR BRUTE UTILIZATE PENTRU PRODUCEREA DE NANOFIBRE PRIN *ELECTROSPINNING*

6.1 Relaxometrie RMN a ^1H

Chitosanul se caracterizează printr-o componentă semirigidă caracterizată de un *peak* în distribuția lui T_2 localizată la $T_2 \approx 2.91$ ms și o componentă semi-mobilă cu un timp de relaxare spin-spin la $T_2 \approx 23.18$ ms. Peptida de collagen se caracterizează prin trei componente mai puțin rigide, două componente semi-rigide cu timpii de relaxare localizați la $T_2 \approx 2.31$ și, respectiv, la $T_2 \approx 10.9$ ms și una semi-mobilă cu $T_2 \approx 57.0$ ms. În mod identic, collagenul de pește marin se caracterizează și prin trei componente mai puțin rigide, două componente semirigide cu $T_2 \approx 1.74$ ms și, respectiv, $T_2 \approx 14.8$ ms și una semi-mobilă cu $T_2 \approx 58.6$ ms. Cu excepția unei singure componente (cu T_2 localizat la aproximativ 2 ms), restul componentelor collagenului de pește marin sunt mai mobile în comparație cu componentele corespunzătoare ale peptidei de collagen.

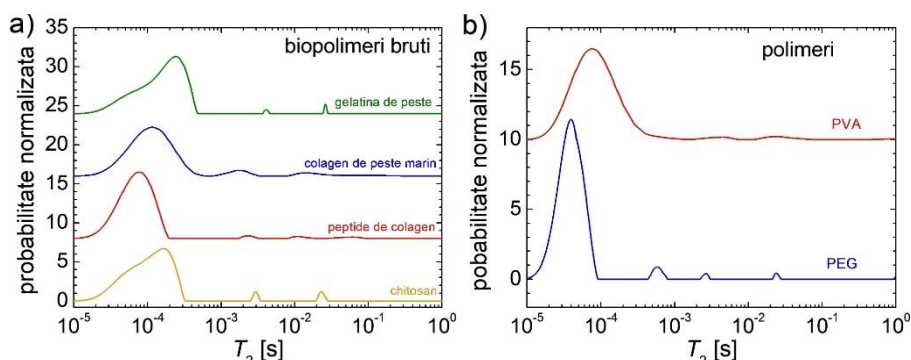


Fig. 6.1. Distribuțiile lui T_2 măsurate prin RMN a ^1H pentru biopolimerii brute a) chitosan - portocaliu, collagen de pește marin - albastru, peptidă de collagen - roșu și gelatină de pește - verde și b) polimeri PEG și PVA utilizați pentru electrofilare [53].

6.2 Spectroscopie FT-IR

În Figura 6.2a cu portocaliu (jos) este prezentat spectrul FT-IR măsurat în cadrul programului experimental pentru chitosan. Aceasta (spectrul FT-IR) prezintă o bandă puternică și largă în regiunea 3297 cm^{-1} care poate fi asociată cu întinderea legăturilor N-H și O-H, dar și cu legăturile de hidrogen intra-moleculare [166] și este localizată în amida A. Această lărgire este evidențiată prin suprapunerea cu un alt *peak* larg situat la aproximativ 3200 cm^{-1} . Un *peak* puternic de absorbție a fost observat la 2924 cm^{-1} care face pereche cu *peak*-ul situat la 2855 cm^{-1} aparținând amidei B și care poate fi atribuit întinderii simetrice și respectiv asimetrice a C-H. Acest dublet se găsește în multe probe organice (vezi și spectrele pe bază de collagen), în special în cele de polizaharide, cum ar fi caragenanii [54], xilanul [55] și glucanii [56].

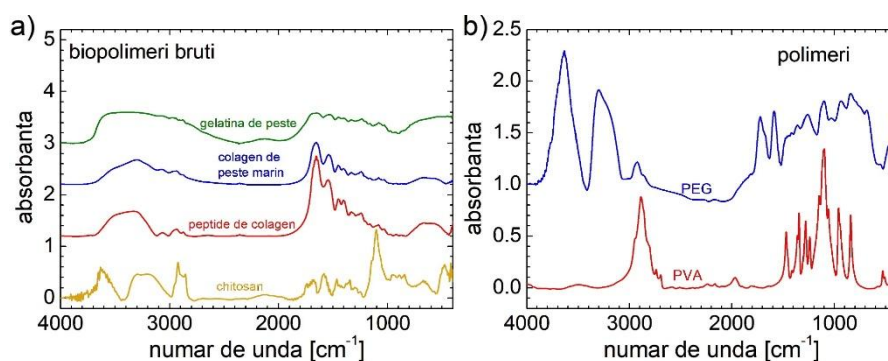


Fig. 6.2. Spectrele FT-IR ale bio-polimerilor brute a) chitosan - portocaliu, collagen de pește marin - albastru, peptidă de collagen - roșu și gelatină de pește - verde) și b) polimerii PEG și PVA utilizați pentru electrofilare [53].

6.3 Difrakție de raze X

Pentru caracterizarea structurală a bio-materialelor brute utilizate pentru producerea de nanofibre electrofilate au fost înregistrate difractogramele DRX [57] și care sunt prezentate comparativ în Figura 6.3. Se pot observa asemănări între difractogramele de raze X înregistrate pentru collagenul de pește marin, peptida de collagen și gelatina de pește care prezintă o structură amorfă cu *peak*-uri largi centrați la $2\theta \approx 20.46^\circ$ pentru collagenul de pește marin, la $2\theta \approx 20.64^\circ$ pentru peptida de collagen și la $2\theta \approx 20.11^\circ$ pentru gelatina de pește. Pentru collagenul de pește marin se poate observa și un *peak* (cel mai mic), ca un umăr stâng. Prin aplicarea unei proceduri de deconvoluție a difractogramei de raze X măsurată pentru proba de collagen se observă că acesta poate fi descompusă (ad-hoc) în trei *peak*-uri largi centrați la $2\theta = 11.82^\circ$, 20.36° , 23.60° , și lărgimi de 4.45° , 7.74° și 27.23° , iar ariile integrale relative de 4.85 %, 31.25 % și, respectiv, 63.91 %.

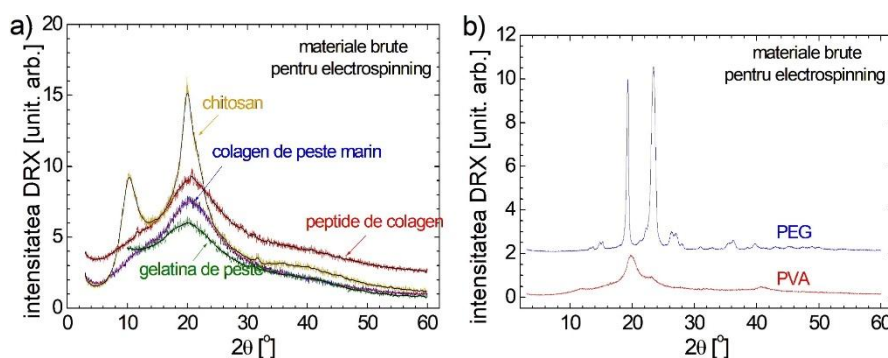


Fig. 6.3. Difractogramele de raze X ale materiilor prime a) chitosan (portocaliu), collagen de pește marin (albastru), peptidă de collagen (roșu) și gelatină de pește (verde) [53] și b) Polimeri PEG și PVA utilizați pentru electrofilare.

CAPITOLUL 7 CARACTERIZAREA SOLUȚIILOR PENTRU PRODUCEREA DE NANOFIBRE PRIN *ELECTROSPINNING*

7.1 Efectul denaturării collagenului în soluții de acid acetic cu diferite concentrații

Pentru a evalua efectul de denaturare asupra collagenului de pește marin, în cadrul programului experimental al prezentei teze de doctorat, au fost preparate diferite soluții de solvenți din acid acetic glacial (AA). Concentrația de acid acetic a fost aleasă în intervalul de la 5 % până la 90 %. Collagenul de pește marin a fost dizolvat în fiecare dintre acești reactivi iar pentru soluțiile rezultate au fost măsurate spectrele de RMN a ^1H și FT-IR [58], spectre care sunt prezentate în Figura 7.1. Astfel, în Figura 7 1a, spectrele RMN a ^1H măsurate pentru soluții de 6 % w/v collagen dizolvat în acid acetic cu concentrații de 5 %, 10 %, 20 și 40 %, iar intensitățile RMN sunt prezentate la scară completă (verticală). Spectrele RMN a ^1H au fost măsurate folosind un tomograf RMN în câmpuri înalte (7 T), utilizând o procedură de spectroscopie localizată care permite suprimarea apei (*peak*-ul provenit din rezonanța apei la $\delta_{\text{H}} \approx 4.65$ ppm este suprimat experimental, cu o eficiență ridicată).

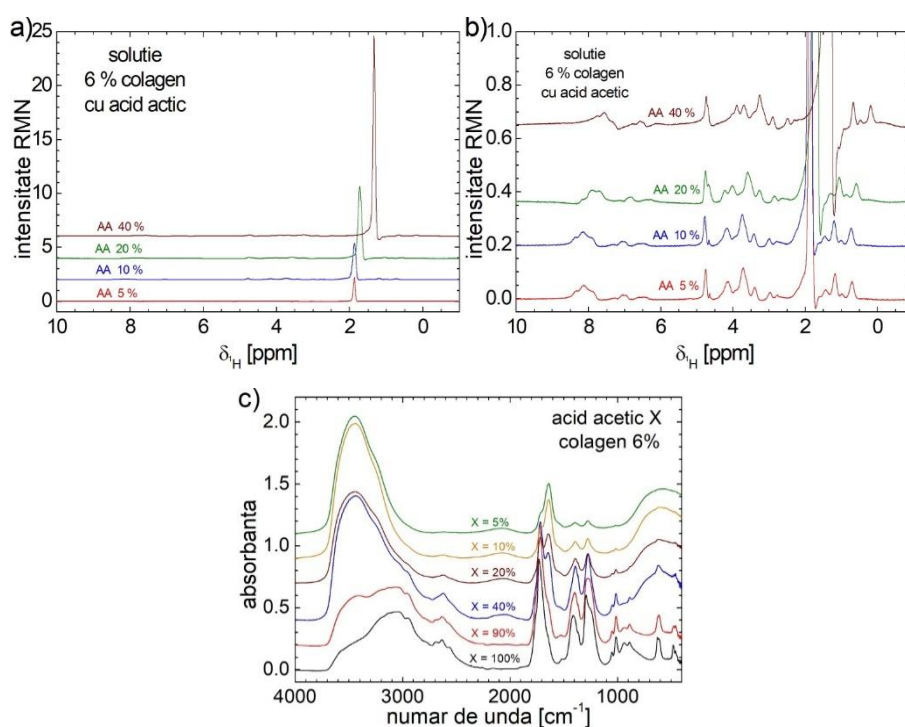


Fig. 7.1. Spectrele RMN ale ^1H măsurate în câmpuri înalte utilizând spectroscopia localizată și filtrarea apei reprezentate la a) intensitatea RMN reală și b) intensitatea RMN mărită și c) spectre FT-IR utilizate pentru determinarea denaturării collagenului în soluții de acid acetic cu diferite concentrații de la 5 % la 100 % [53].

7.2 Spectroscopia RMN a ^1H în câmpuri înalte

În subcapitolul anterior s-a arătat că o concentrație prea mare de acid acetic poate duce la denaturarea collagenului. Acest efect a mai fost discutat pe larg și în referința [53]. S-a constatat că dacă se folosește collagen dizolvat în soluție de acid acetic atunci, o cantitate de 10-20 % acid acetic poate începe să producă denaturarea collagenului fapt care împiedică formarea fibrelor [53]. Cu toate acestea, dacă soluția este combinată cu alta (de exemplu, pe bază de chitosan), atunci se pot obține fibre de dimensiuni nano-metrice. Efectul concentrației de acid acetic asupra collagenului poate fi observat cu ușurință prin compararea spectrelor de RMN a ^1H localizate, măsurate în câmp magnetic înalt. Acestea sunt prezentate în partea de jos a Figurii 7.2a pentru probele etichetate cu Ch6AA90 și Ch6AA60. În intervalul de la $\delta_{^1\text{H}} \approx 4.0$ ppm la $\delta_{^1\text{H}} \approx 6.0$ ppm se pot observa *peak-urii* specifici apei suprimate.

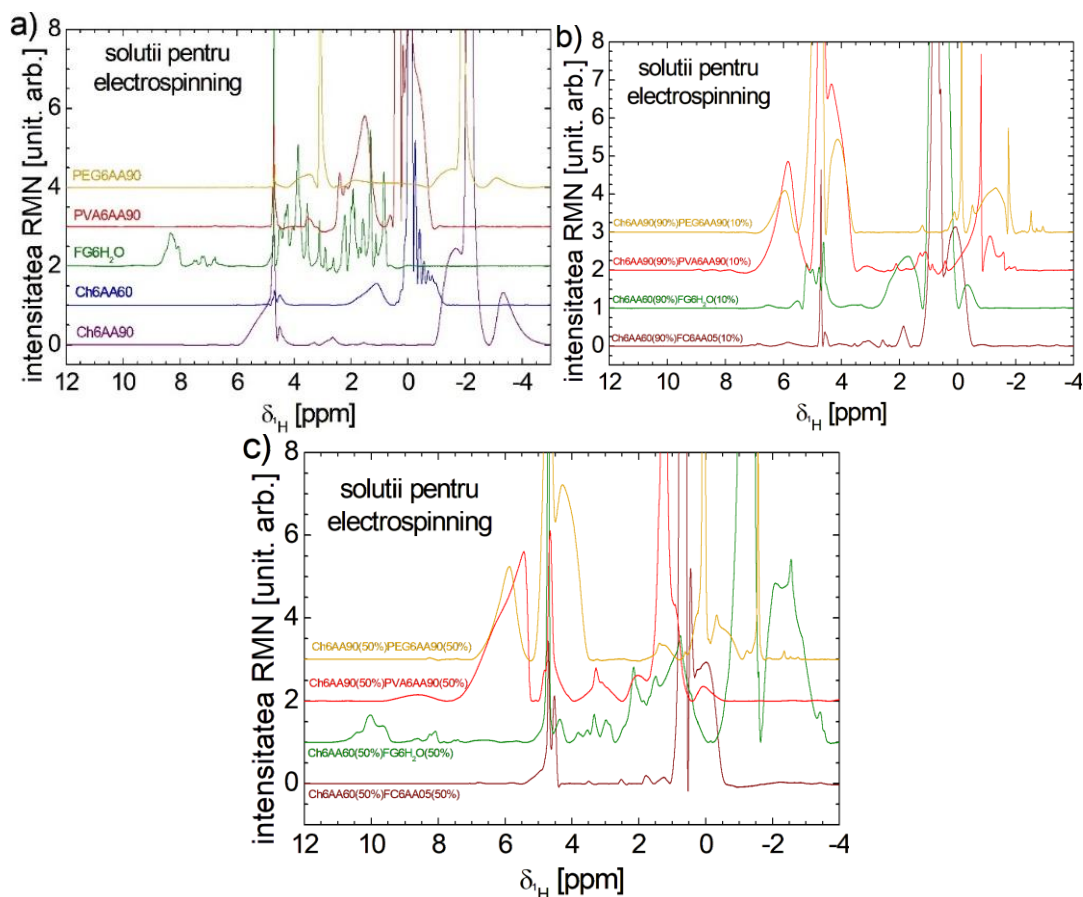


Fig. 7.2. Spectre RMN ale ^1H măsurate în câmpuri înalte pentru a) soluție pură de acid acetic (90% sau 60% și apă distilată) și 6% w/v chitosan, gelatină de pește PVA și PEG; b) 90% soluție 1 de 6% w/v chitosan (AA 90% sau 60%) și 10% din soluția 2 de 6% w/v collagen de pește marin (AA 5%), gelatină de pește (100% apă distilată), PVA (AA 90%) și PEG (AA 90%); c) soluție 1 (50%) din 6% w/v chitosan (AA 90% sau 60%) și 50% din soluție 2 din collagen de pește marin 6% w/v (AA 5%), gelatină de pește (100% apă distilată), PVA (AA 90%) și PEG (AA 90%) [53].

7.3 Distribuțiile timpilor de relaxare T_2

Dinamica bio-polimerilor se schimbă total o dată ce acestea sunt dizolvate în acid acetic sau chiar în apă simplă distilată. Acest lucru este demonstrat de distribuțiile timpilor de relaxare transversală T_2 , măsurate pentru soluțiile preparate pentru electrofilare, așa cum sunt prezentate în Figura 7.3. *Peak*-ul principal (asociat celui mai mare bazin/rezervor de hidrogen) este situat la valori T_2 mai mari, de ordinul sutelor de milisecunde. Distribuțiile lui T_2 sunt înregistrate cu doi timpi de ecou (TE). Astfel, un timp de ecou mic, TE (vezi distribuțiile T_2 prezentate în stânga Figurii 7.3 – a și c) va asigura codarea componentelor caracterizate printr-o mobilitate redusă, dar în același timp nu poate rezolva bine *peak*-uri care apar la valori T_2 mai mari (de obicei mai mari de 100 ms). Acestea sunt rezolvate atunci când parametrul experimental, timpul de ecou, este setat la o valoare mai mare (TE = 0.5 ms – vezi distribuțiile T_2 prezentate în dreapta Figurii 7.3 – b și d și trenul de ecouri CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) cade aproape de linia de bază. Dar, în același timp, un timp de ecou atât de mare acționează ca un filtru, iar componenta mai puțin mobilă este mobilă din semnalul RMN și nu mai apare în distribuțiile lui T_2 .

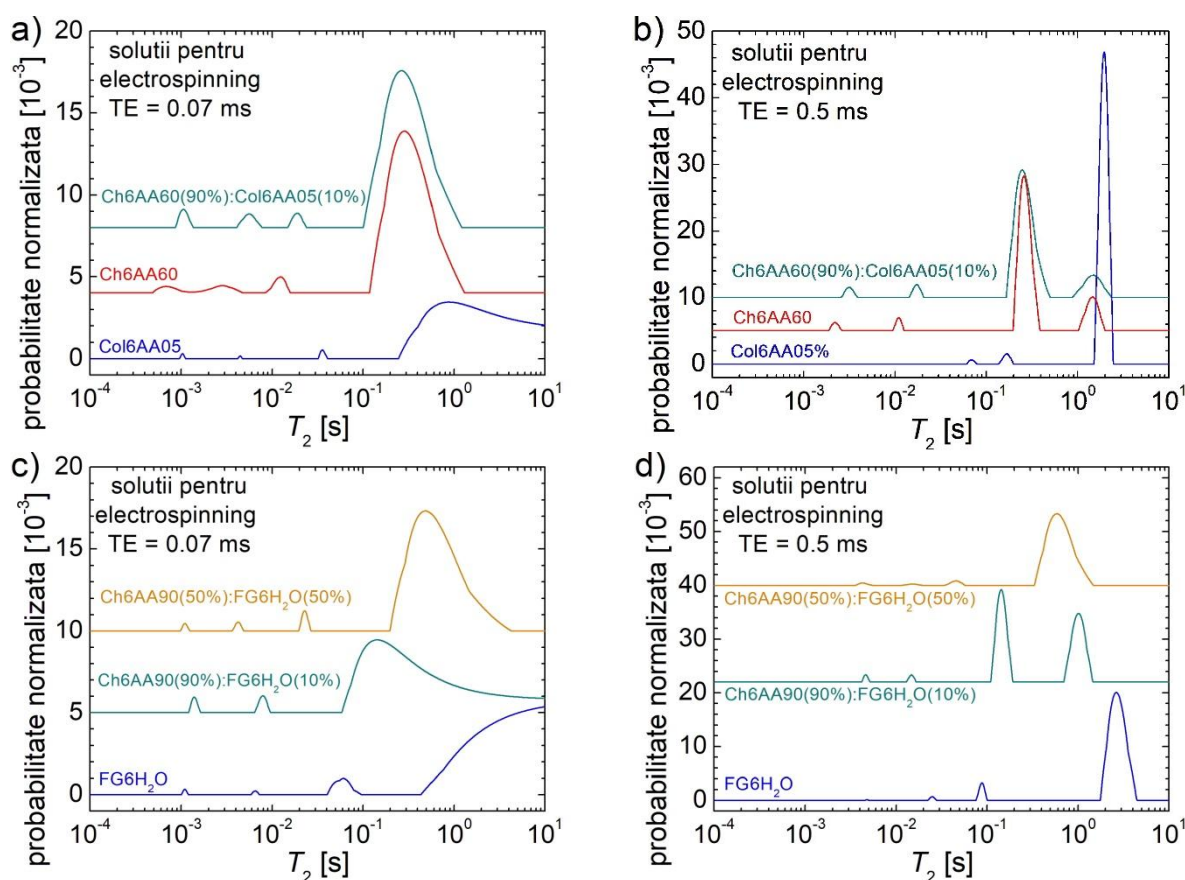


Fig. 7.3. Distribuțiile timpului de relaxare RMN a ^1H T_2 măsurate pentru soluțiile folosite pentru electrospinning bazate pe chitosan și collagen din pește marin (sus) și gelatină din pește (jos) utilizând un timp de apariție a ecoului TE = 70 μs (stânga) și TE = 500 μs (dreapta).

7.4 Spectroscopia FT-IR

Interacțiunea dintre 6 % w/v chitosan în 60 % acid acetic (Ch6AA60) și 6 % w/v collagen în 5 % acid acetic (Col6AA05) nu este atât de complexă cum era de așteptat; fapt rezultat din spectrele FT-IR prezentate în Fig. 7.4a. Aceste spectre (portocaliu și roșu în Fig. 7.4a) sunt în principal superpoziții ale spectrelor înregistrate pentru soluțiile separate (și discutate în mare măsură mai devreme), dar prezintă și câteva caracteristici noi. În acest sens, se poate remarca că *peak*-ul corespunzător apei face parte dintr-o bandă mare cu caracteristicile principale care provin din prezența acidului acetic (vezi spectrul negru din Fig. 7.1c). Comparând spectrul FT-IR înregistrat pentru soluția bi-componentă de Ch6AA60(90%)Col6AA05(10%) (spectrul portocaliu din Fig. 7.4a) cu cel înregistrat pentru soluția bi-componentă de Ch6AA60(50%)Col6AA05(50%) (spectrul roșu din Fig. 7.4a) se poate observa că diferența de conținut de acid acetic, în favoarea primului, duce la o absorbție crescută a benzii largi situate în intervalul $3000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Prezența chitosanului abia se remarcă prin apariția unor dublete extrem de mici situate la aproximativ 2844 cm^{-1} și 2788 cm^{-1} , și mai ales prin mici *serii zgomotoase* de *peak*-uri mici estinși în intervalul $3800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, și în interval de $1475\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$. Cel mai mare efect al chitosanului este de așteptat să apară la aproximativ 1100 cm^{-1} , dar există o suprapunere cu grupul de linii de absorbție aparținând acidului acetic.

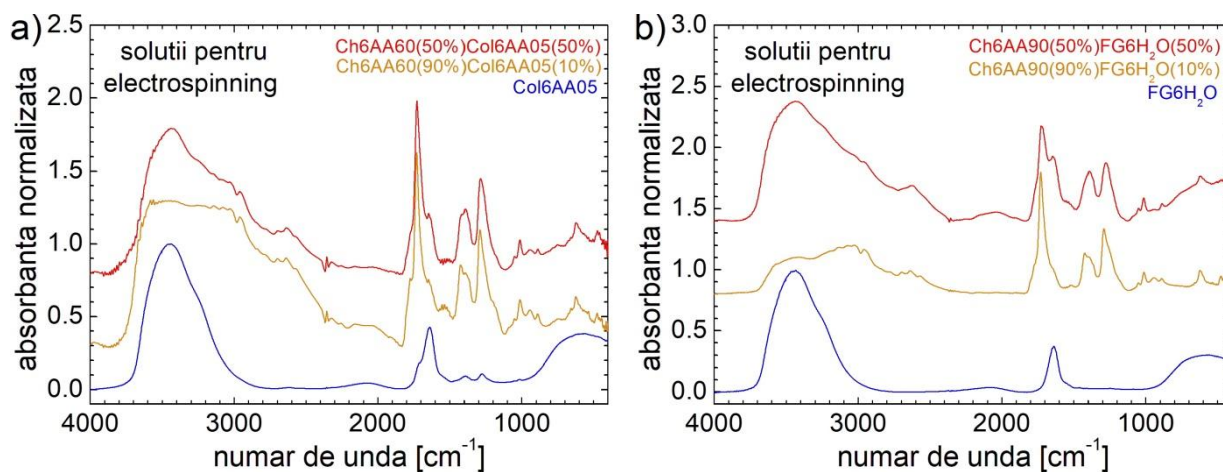


Fig. 7.4. Spectrele FT-IR ale soluțiilor pentru electrospinning preparate pe bază de a) collagen și chitosan și b) gelatină de pește și chitosan.

CAPITOLUL 8 CARACTERIZAREA PROPRIETĂȚILOR NANOFIBRELOR PRODUSE PRIN *ELECTROSPINNING*

8.1 Metode moderne de RMN pentru caracterizarea nanofibrelor

8.1.1 Relaxometrie RMN a ^1H

Distribuțiile lui T_2 măsurate pentru toate foliile de bio-nanofibre electrofilate sunt prezentate comparativ în Fig. 8.1. Comparând aceste distribuții ale lui T_2 cu cele raportate în capitolele anterioare, se poate observa că acestea (Fig. 8.1) sunt mai asemănătoare cu cele măsurate pentru materiile prime (Fig. 6.1). Cea mai mare cantitate de hidrogen se găsește în componentele cu mobilitate extrem de redusă. Aceasta este o caracteristică generală valabilă pentru toate foliile din bio-nanofibre electrofilate și rezultată din prezența *peak*-urilor principale (cu cea mai mare arie integrală) situate la valori T_2 mai mici de 1 ms. Cu o singură excepție, toate distribuțiile lui T_2 sunt caracterizate de un *peak* principal și o serie de alte trei *peak*-uri mici la valori ale lui T_2 mai mari, fapt care indică o mobilitate mai mare. Excepția o constituie folia de bio-nanofibre produsă prin *electrospinning* din FG6H₂O, soluție preparată prin dizolvarea gelatinei de pește în apă distilată. În acest caz se pot observa o serie de doi *peak*-uri principali situați la valori ale lui T_2 mai mici și alte doi *peak*-uri situați la valori ale lui T_2 mai mari.

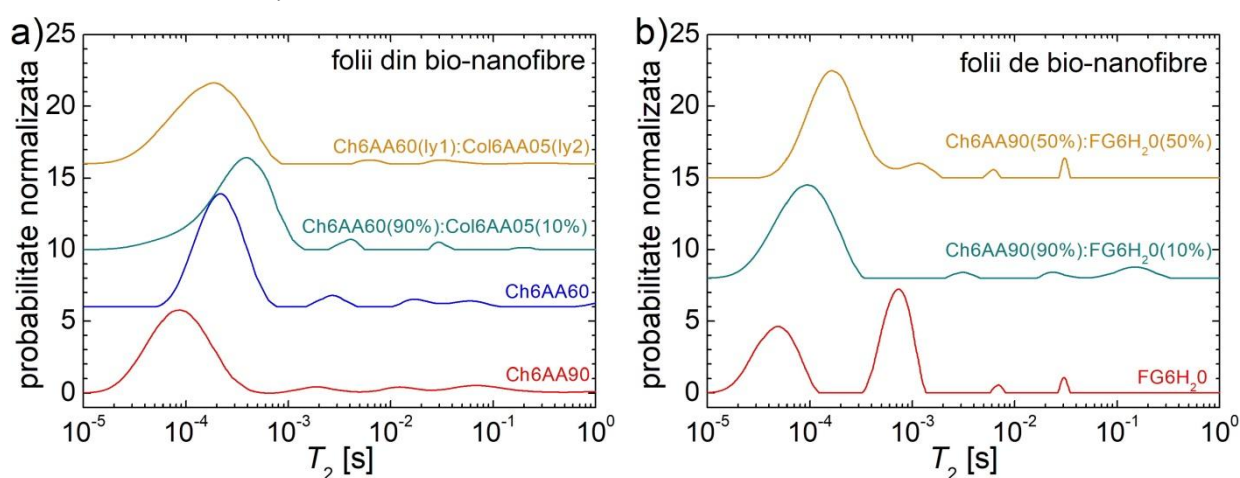


Fig. 8.1 Distribuțiile timpului de relaxare RMN a ^1H , T_2 măsurate pentru foliile de bio-nanofibre obținute prin *electrospinning* din soluții preparate pe bază de a) collagen și chitosan și b) gelatină de pește și chitosan [59].

8.1.2 Mape de schimb EXSY T_2 - T_2

Deși ofertante, distribuțiile uni-dimensionale (1D) ale lui T_2 măsurate prin RMN nu pot oferi o imagine completă a dinamicii rețelei polimerice a foliilor din bio-nanofibre produse prin *electrospinning* care, la nivel molecular, formează structura de bază. Dacă se presupune că solventul (acidul acetic, apă) nu este complet evaporat în timpul procesului de electrofilare, dacă eventuala reticulare (chimică și/sau fizică) nu este permanentă, atunci o măsurătoare RMN a ^1H

bi-dimensional de tipul T_2 - T_2 EXSY (Laplace-Laplace exchange spectroscopy) poate aduce informații valoroase [60, 61].

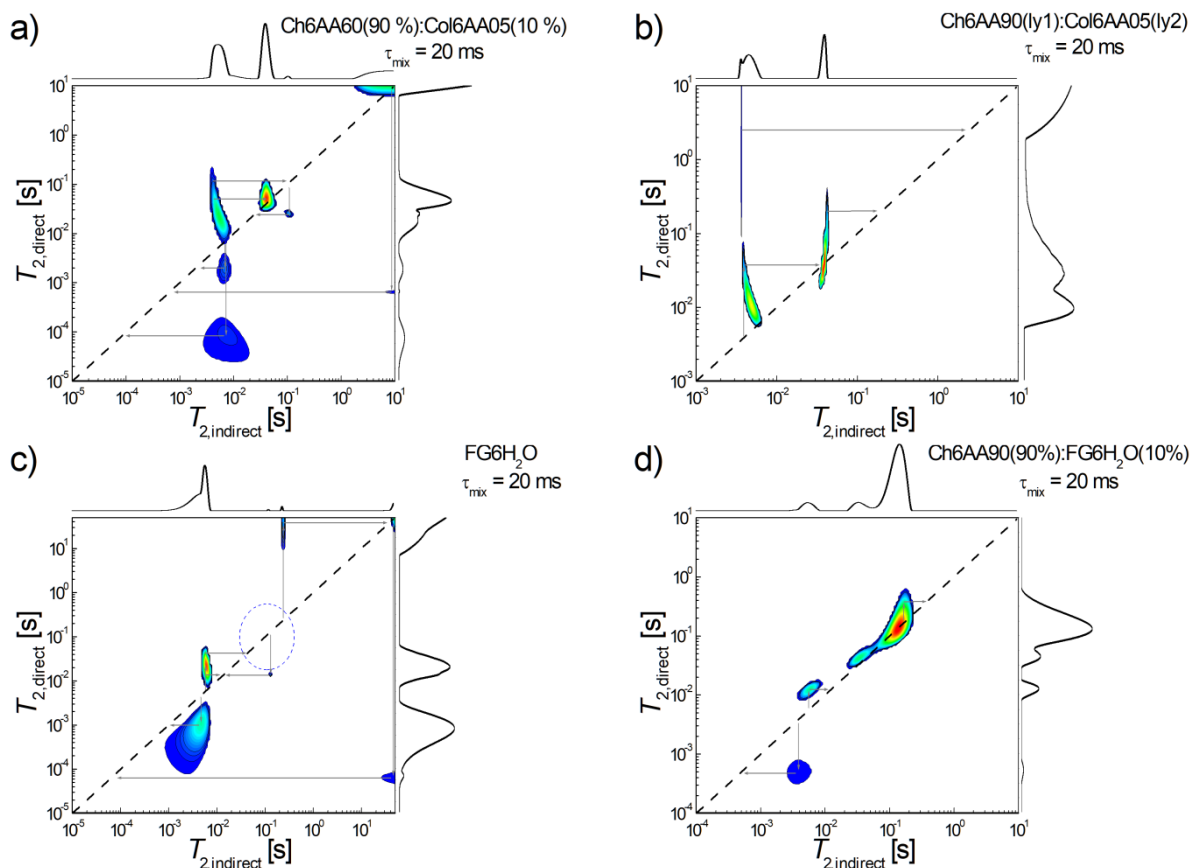


Fig. 8.2. Spectrele RMN ale ^1H bidimensionale de tipul T_2 - T_2 EXSY (spectroscopie Laplace de schimb) măsurate pentru foliile de bio-nanofibre electrofilate din soluții de a) chitosan 6% w/v în acid acetic 60 % (sol-1 90 %) și collagen 6% w/v în acid acetic 5 % (sol-2 10 %); b) chitosan 6 w/v în acid acetic 60 % (strat 1) și collagen de pește marin 6% w/v în acid acetic 5 % (strat 2); c) gelatină de pește 6% w/v în apă distilată și d) chitosan 6% w/v în acid acetic 90 % (sol-1 90 %) și gelatină de pește 6% w/v în apă distilată (sol-2 10 %) [53].

În Fig. 8.2 sunt prezentate patru hărți (mape) T_2 - T_2 EXSY înregistrate pentru două folii electrofilate din bio-nanofibre pe bază de chitosan și collagen de pește marin și două pe bază de gelatină de pește (una și cu chitosan) cu un timp de schimb, $\tau_{\text{mix}} = 20$ ms. În Fig. 8.2 a) este prezentată harta (mapa) RMN a ^1H de tipul T_2 - T_2 EXSY înregistrată pentru Ch6AA90(90%)Col6AA05(10%) care prezintă: i) patru *peak*-uri extra-diagonali clari care descriu procesul de schimb molecular dintr-un rezervor de ^1H caracterizat prin valori ale lui T_2 mari către un rezervor de ^1H caracterizat de valori ale lui T_2 mai mici; și ii) un *peak* extins care descrie un proces de schimb molecular de la un rezervor de ^1H caracterizat de valori mici ale lui T_2 către un rezervor de hidrogen cu valori T_2 mai mari.

8.2 Caracterizarea structurală a nanofibrelor prin spectroscopie FT-IR

Structura moleculară a bio-nanofibrelor produse prin *electrospinning* este diferită de constituenții din soluții, așa cum se poate observa din spectrele FT-IR prezentate în Fig. 8.3. Astfel, Fig. 8.3a prezintă spectrele FT-IR înregistrate pentru foliile din bio-nanofibre pe bază de chitosan/colagen. Efectul concentrației diferite de acid acetic din precursorii foliilor de bio-nanofibre produse în cadrul programului experimental poate fi observat direct prin compararea spectrelor înregistrate pentru Ch6AA90 (roșu - în partea de jos) și Ch6AA60 (albastru - partea de jos). Astfel, în domeniul de caracteristici specifice ($350\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$) se pot observa doar mici diferențe între aceste două probe. La fel, în intervalul $2000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, unde apar *peak*-uri largi, se observă unele diferențe relativ minore. Astfel, se poate observa variația de amplitudine a dubletului situat la aproximativ 2896 și 2950 cm^{-1} . Se mai poate observa faptul că, pentru proba care conținea inițial cea mai mare cantitate de acid acetic, spectrul FT-IR al bio-nanofibrelor electrofilate prezintă un *peak* situat la aproximativ 1724 cm^{-1} care poate fi atribuit acidului acetic (vezi spectrul roșu din Fig. 8.3a și spectrul FT-IR negru din partea de jos a Fig. 7.1c). Un spectru FT-IR similar a fost înregistrat și pentru folia de bio-nanofibre electrofilată obținută dintr-o soluție care conține 10 % Col6AA05.

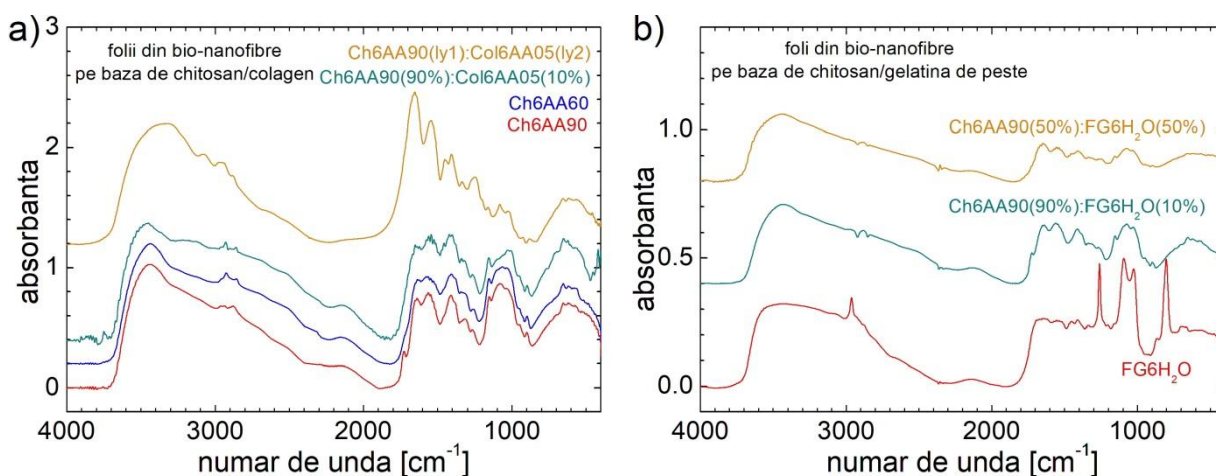


Fig. 8.3. Spectrele FT-IR ale filmelor de bio-nanofibre electrofilate preparate pe bază de a) collagen și chitosan și b) gelatină de pește și chitosan [53].

8.3 Caracterizarea SEM

Una dintre metodele clasice de caracterizare a nanofibrelor este realizată cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (SEM). Rezoluția la diferite mărimi a imaginilor SEM este mai mult decât adecvată pentru caracterizarea structurală a nanofibrelor obținute prin electrofilare. Dispunerea geometrică și efectul chitosanului pentru foliile electrofilate de bio-nanofibre este cel mai bine indicat de imaginile SEM. Aceste imagini sunt prezentate în Fig. 8.4 pentru probele Ch6AA60(90%):Col6AA05(10%) și FG6H₂O.

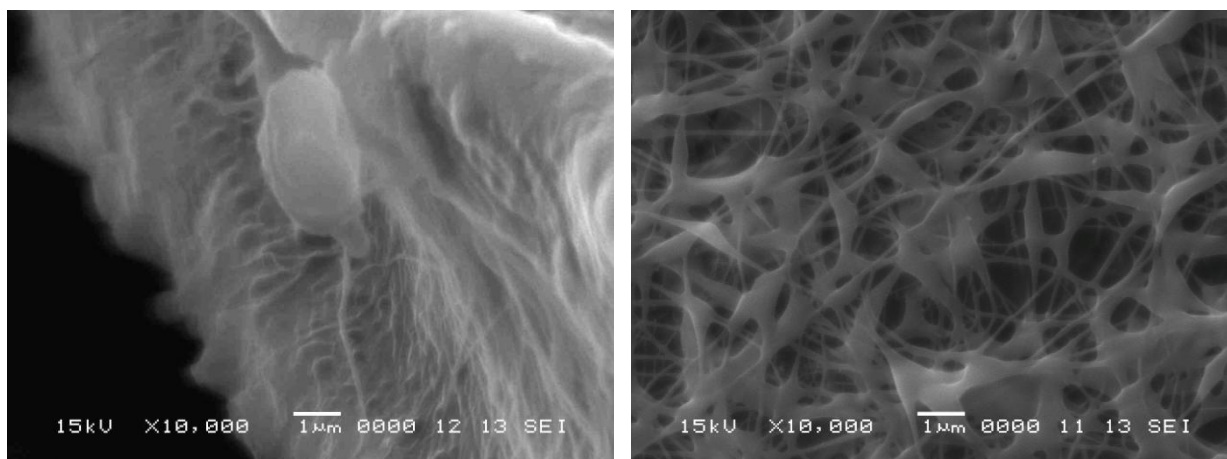
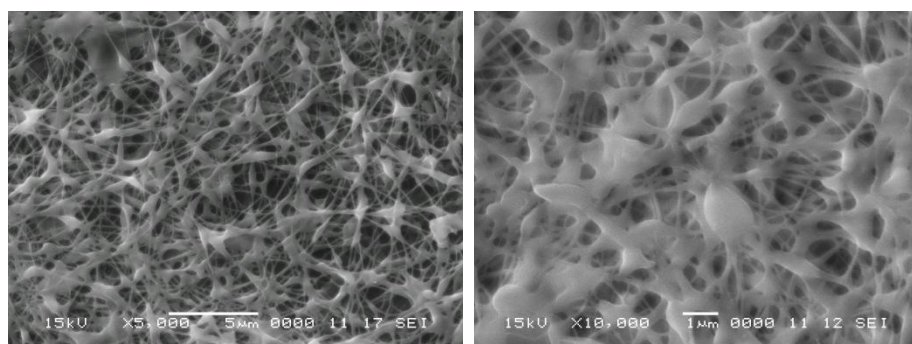


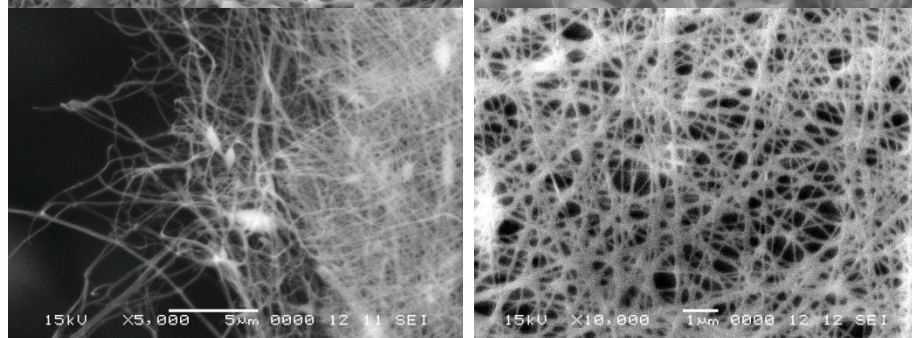
Fig. 8.4. Imagini obținute prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) ale foliilor de bio-nanofibre a) Ch6AA60(90%)Col6AA05(10%) și b) FG6H₂O obținute prin *electrospinning* [53].

Utilizarea chitosanului, ca și componentă majoră a bio-nanofibrelor electrofilate, duce la formarea unei folii dens împachetată formată din straturi depuse succesiv, în timp ce ultimul strat de nanofibre este depus pe ultima suprafață și se îmbină în proporție semnificativă cu biomaterialul existent (vezi Fig. 8.4a).

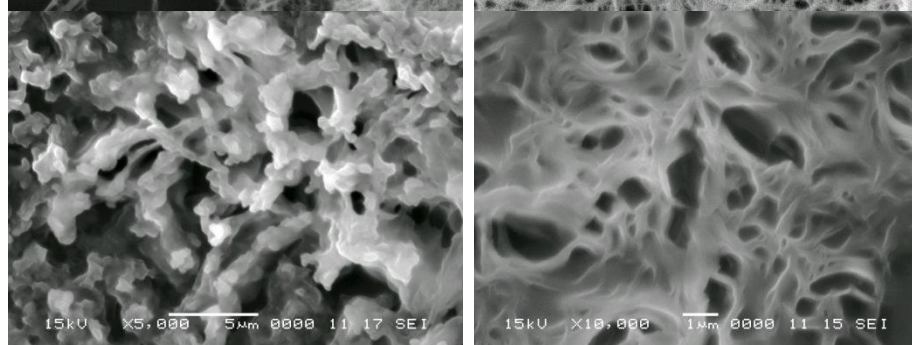
a) FG6H₂O

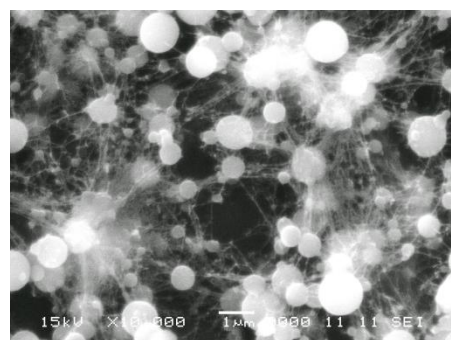
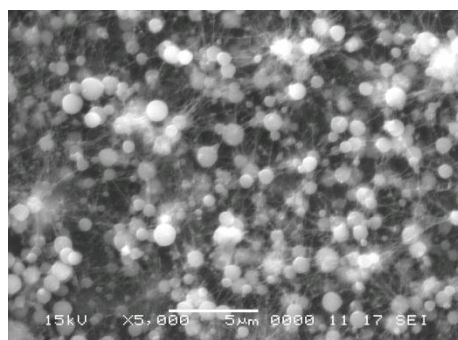
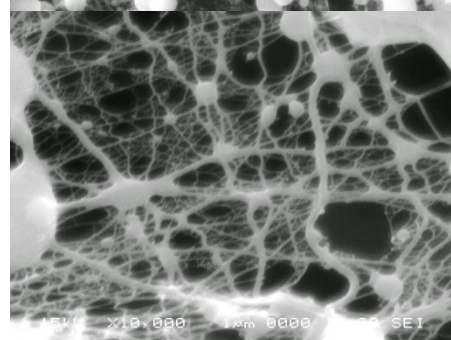
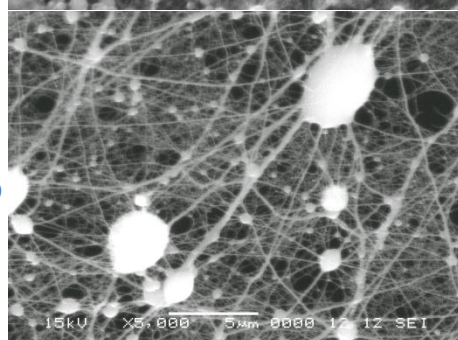


b) PVA6AA90



c) PEG6AA90



d) Ch6AA90(50%)FG6H₂O(50%)e)
Ch6AA90(90%)PVA6AA90(10%)

f) Ch6AA90(50%)PEG6AA90(50%)

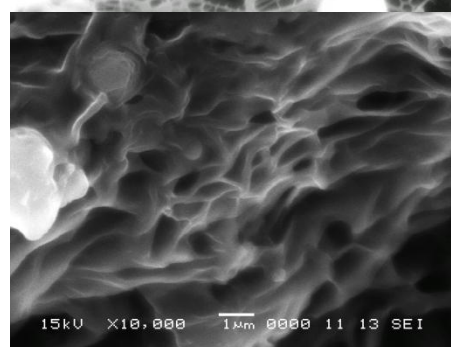


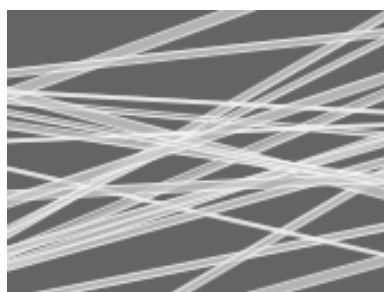
Fig.8.5. Imagini obținute prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) cu mărire de $\times 5000$ (stânga) și $\times 10000$ (dreapta) măsurate pentru foliile de bio-nanofibre a) FG6H₂O; b) PVA6AA90; c) PEG6AA90; d) Ch6AA90(50%)FG6H₂O(50%); e) Ch6AA90(90%)PVA6AA90(10%); f) Ch6AA90(50%)PEG6AA90(50%) [59].

Se poate considera că fibrele principale formează o așa-numită rețea de plasă. Fibrele secundare cu diametrul de la jumătate ($1/2$) până la o zecime ($\sim 1/10$) din diametrul fibrelor primare formează o rețea secundară locală. Acestea se caracterizează printr-o lungime de sub $1\ \mu\text{m}$ până la câțiva micrometri și, de obicei, sunt conectate direct la rețeaua primară, dar pot fi conectate și prin *bulbi* mici. Mai multe fibre terțiare pot forma o altă rețea locală și pot uni fibrele secundare prin legături directe. O fibră terțiară poate uni două fibre secundare fără alt contact, dar se pot observa alte fibre terțiare care să prezintă noduri de reticulare într-un număr redus. La această mărire a imaginilor SEM, fibrele cuaternare (de ordinul IV) sunt greu de observat.

CAPITOLUL 9 REȚELE NEURONALE ARTIFICIALE FOLOSITE PENTRU CARACTERIZAREA NANOFIBRELOR PRODUSE PRIN *ELECTROSPINNING*

9.1 Caracterizarea gradului de ordine locală a nanofibrelor folosind rețele neuronale artificiale

Procedura de analiză-predicție a fost aplicată pe unele dintre imaginile SEM măsurate. Mai întâi s-a observat că ordinea prezisă nu este o valoare unică și cel mai bine poate fi descrisă ca un interval. Aceasta este o abordare rezonabilă pentru nanofibrele cu atât de multe caracteristici, altele decât fibrele liniare (a se vedea discuția anterioară legată de caracterizarea imaginilor SEM). Astfel, se poate observa că folia mono-componentă de nanofibre pe bază de gelatină de pește FG6H₂O prezintă un grad de ordine în intervalul 0.287 – 0.472. Aceasta înseamnă că fibrele sunt în mare parte dezordonate. Cele mai dezordonate nanofibre au fost găsite pentru folia Ch6AA90(50%):FG6H₂O(50%) cu două componente produsă pe baza de gelatină de pește. Gradul de ordine prezis a fost în intervalul 0.051 – 0.312 fapt care a plasat aceste rețele ca fiind formate din nanofibre aproape total dezordonate. Gradul de densitate al rețelei de nanofibre poate juca, de asemenea, un rol important în analiza gradului de ordine, așa cum se poate observa din setul de două imagini prezentat în figura 9.1 (al treilea rând) pentru folia Ch6AA90(90%):PVA6AA90(10%) cu două componente. După cum era de așteptat, o rețea mai densă poate fi caracterizată printr-o orientare mai eterogenă a fibrei, cu un grad de ordonare a nanofibrelor în intervalul 0.281 – 0.520. Aici se poate observa că unele părți ale rețelei de nanofibre au trecut de limita de la dezordonată la ordonată de 0.5. O rețea mai puțin densă prezintă un interval mai restrâns de grad de ordonare (0.157 – 0.368) și în general poate fi caracterizată ca fiind mai dezordonată decât rețeaua densă. Ultimele două seturi de predicții (ultimul rând din Fig. 9.3) obținute pentru foliile pe bază de PVA, foliile din nanofibre cu două componente Ch6AA90(90%) PVA6AA90(10%) și cu o singură componentă PVA6AA90 arată că gradul de dezordine poate crește odată cu creșterea numărului de componente.



Gradul
de ordine
prezis
(0.380)



Gradul de
ordine prezis
(0.618)

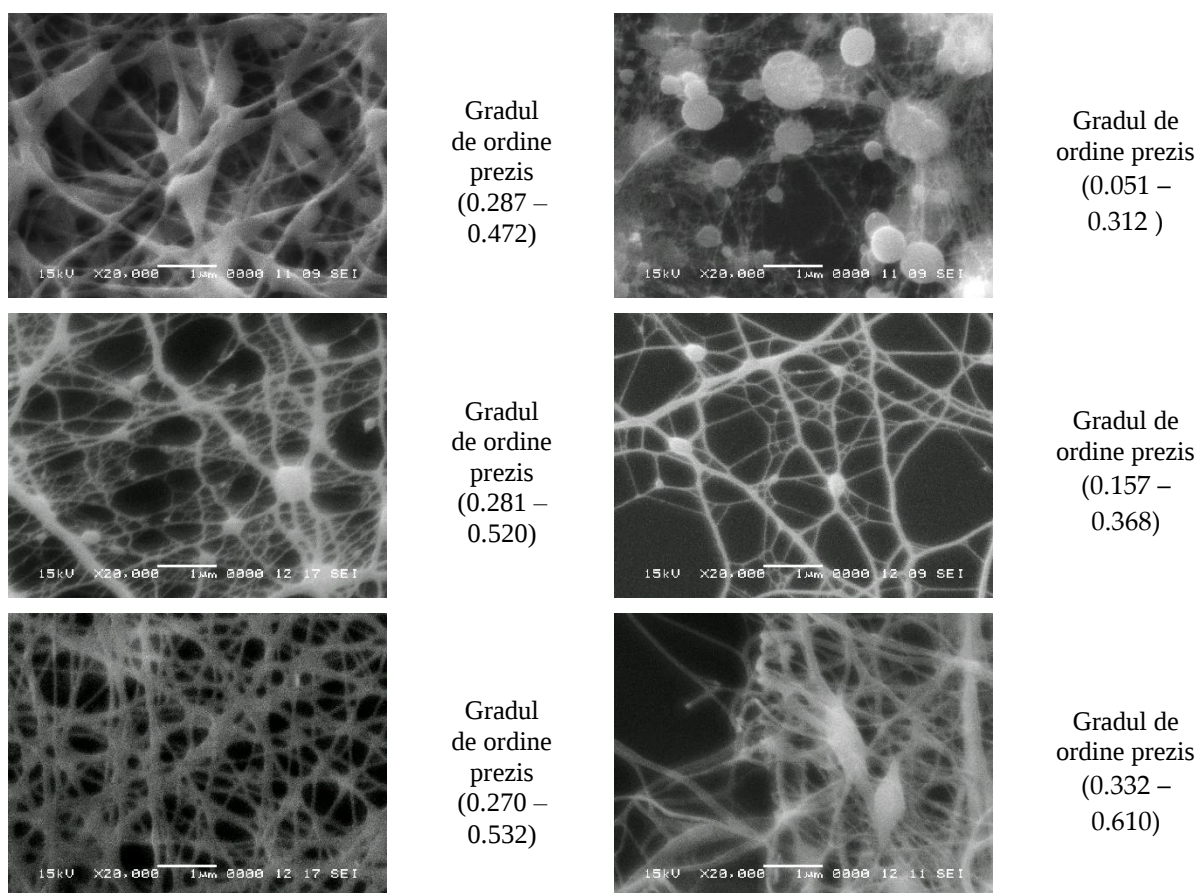


Fig. 9.1. Gradul de ordine al nanofibrelor electrofilate prezis de RNA din imagini cu fibre simulate cu a) 0.33 și b) 0.66 grade de ordine și din imagini SEM măsurate cu o mărire de $\times 20000$ pentru foliile c) FG6H₂O; d) Ch6AA90(50%)FG6H₂O(50%); e) și f) Ch6AA90(90%)PVA6AA90(10%); g) și h) PVA6AA90 [59].

9.2 Analiza statistică în componente principale și utilizarea rețelelor neuronale artificiale

Analiza componentelor principale (PCA) este un instrument puternic de evaluare a comportamentului statistic al datelor măsurate, permițând discriminarea diferitelor părți ale unui sistem statistic, găsirea corelațiilor între diferite tipuri de parametri și, dacă este cazul, observarea unui proces de evoluție. Principalul rezultat al aplicării analizei PCA la măsurătorile care implică biosolide (așa cum s-au descris în capitolul 3 fertilizatorii organo-minerali pe bază de biosolide) a nămolurilor și a apelor uzate provenite de la un abator de păsări este reprezentat în Fig. 9.4 ca un grafic al PC2 (a doua componentă principală) în funcție de PC1 (prima componentă principală) [62]. Aici, contribuțiile fiecărui parametru (absorbanța totală a spectrelor VIS-IRapropiat, $T_{2,1}$ timp de relaxare spin-spin, coeficientul de auto-difuzie D1, pH-ul, CE și TDS-ul) sunt considerate ca pondere cu care sunt calculate componentele principale de la PC1 la PC6.

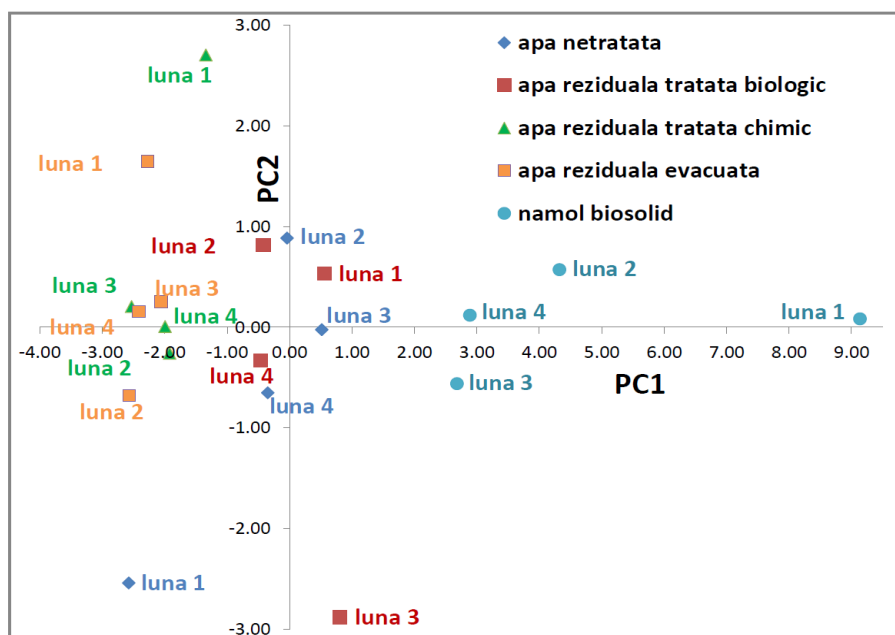


Fig.9.2. Analiza statistică în componente principale PCA: graficul 2D al funcției PC1 versus PC2 obținute pentru apele reziduale (netratate, tratate biologic, tratate chimic și ape evacuate) și probe de nămol biosolid folosit ca fertilizant colectate în patru luni de monitorizare [62].

Pentru a evalua importanța unui anumit parametru pentru fiecare componentă principală, trebuie luate în considerare doar mărimile valorilor enumerate. Semnul valorilor enumerate va contribui la deplasarea datelor prezentate în Fig. 9.2 și va duce la separarea între diferite tipuri (grupe) de probe. Prima componentă principală PC1 este caracterizată de cea mai mare separare a datelor, iar deplasarea (variația) scade odată cu creșterea numărului componentei principale, astfel PC6 are cea mai mică deplasare.

În figura 9.2, grupul de patru puncte (începând cu luna unu până la patru de monitorizare) corespunzătoare apelor uzate neepurate care sunt prezentate cu romb albastru. Pentru lunile 2, 3 și 4 aceste puncte sunt situate în centrul figurii având cele mai mici valori ale lui PC1 și PC2. Punctul corespunzător lunii unu de monitorizare a apelor uzate neepurate este situat la un negativ mare a lui PC1 și PC2. O anumită contribuție poate fi găsită ca provenind de la parametrul RMN, $T_{2,1}$ (-0.561). Cea mai mică contribuție la PC1 vine de la pH (0.25) și de la absorbanta totală măsurată în VIS-IRapropiat (0.336). În schimb, principala contribuție la componenta principală 2 (PC2) provine de la pH (0.794). De asemenea, cu o contribuție mare poate fi creditată și absorbanta totală în VIS-IRapropiat (-0.627). La PC2 o contribuție nesemnificativă provine de la $T_{2,1}$ (0.054), și apoi de la TDS (0.165) și CE (0.22). Coeficientul de auto-difuzie RMN, D_1 va avea o contribuție relativ importantă (0.343). Prin urmare, măsurătorile pH-ului, CE și TDS-ului efectuate pentru probele colectate în prima lună de monitorizare sunt în afara intervalului așteptat. Un comportament similar poate fi găsit pentru apele uzate și epurate biologic (pătratul umplut cu roșu în Fig. 9.2).

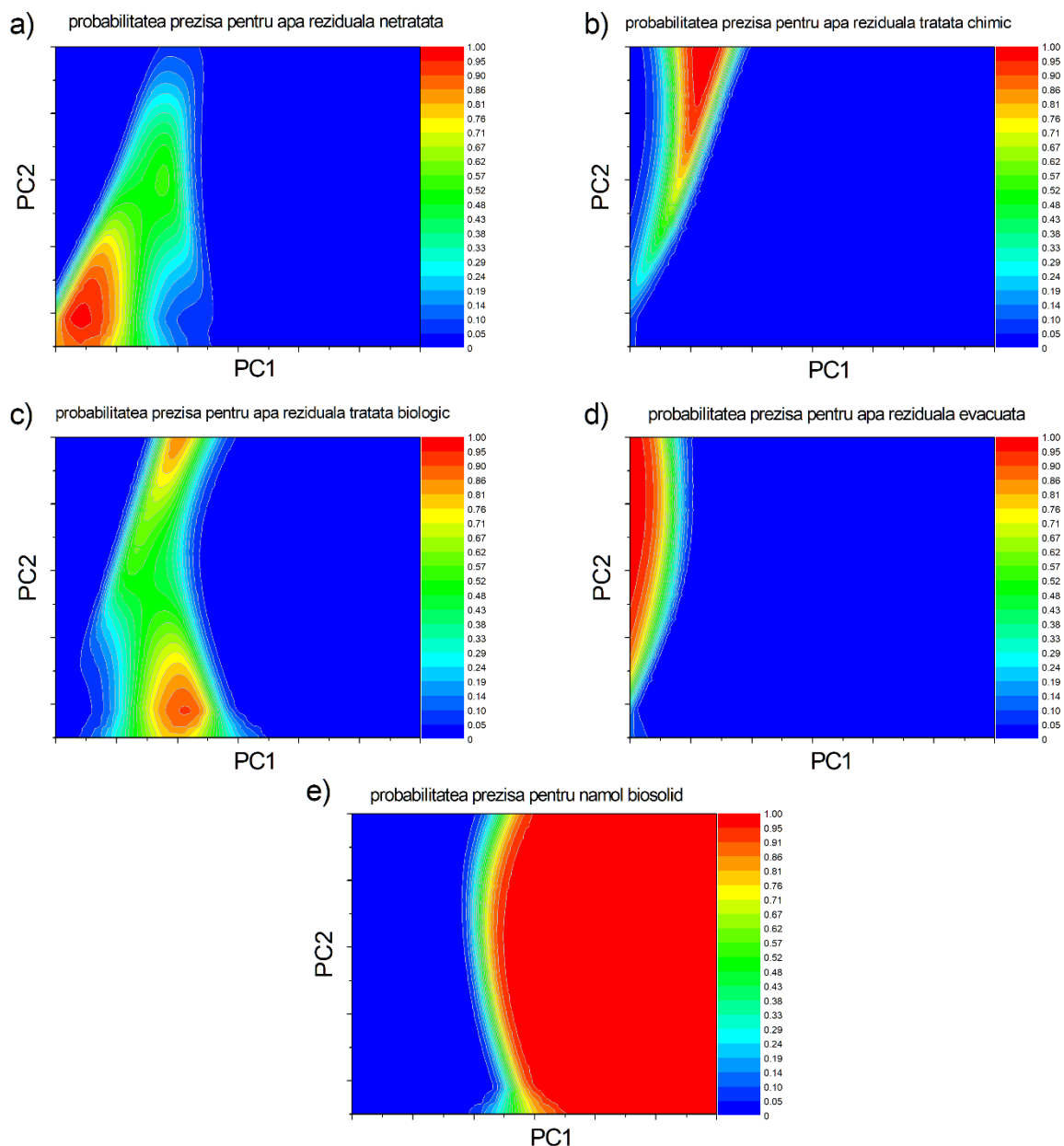


Fig.9.3. Probabilitatea prezisă cu ajutorul RNA pentru a) apele reziduale netratate, b) apele reziduale tratate chimic, c) apele reziduale tratate biologic, d) apele reziduale evacuate și e) nămol biosolid [62].

Aici, punctele corespunzătoare probelor colectate în lunile 1, 2 și 4 sunt grupate, iar punctul corespunzător lunii 3 este în mare măsură deplasat în direcția negativă a PC2. Prin urmare, valoarea pH-ului și absorbanta totală în VIS-IR apropiat măsurate pentru această probă sunt principalele responsabile cu această poziție în afara grupului.

CONCLUZII FINALE

1. S-a dezvoltat un plan de cercetare care a fost utilizat pentru caracterizare complexă folosind metode avansate, a unor biomateriale de tipul nanofibrelor obținute prin *electrospinning* și de tipul biosolidelor utilizate ca fertilizatori organo-minerali.
2. S-a proiectat, construit și testat cu succes un dispozitiv de *electrospinning* utilizat pentru producerea de folii mono și bi-component de nanofibre prin electrofilare, bazate pe chitosan, collagen, gelatină din pește, PVA și PEG.
3. Prin colaborare cu Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Mașini și Instalații destinate Agriculturii și industriei alimentare-INMA București- Sucursala Cluj-Napoca, s-au obținut prin extrudare 3 tipuri de biosolide utilizate ca fertilizatori organo-minerali.
4. S-a utilizat cu succes relaxometria RMN a ^1H pentru caracterizarea complexă a fertilizatorilor organo-minerali, materialelor brute utilizate pentru *electrospinning*, a soluțiilor precursore și a foliilor de nanofibre.
5. S-a folosit pentru prima dată relaxometria RMN bi-dimensională de tipul T_2 - T_2 EXSY și T_1 - T_2 COSY pentru caracterizarea proceselor de schimb molecular și a componentelor dinamice ale bio-nanofibrelor produse în cadrul programului experimental al acestei teze.
6. S-a folosit cu succes spectroscopia RMN în câmpuri înalte, localizată, pentru studiul denaturării collagenului dizolvat în soluții de acid acetic în funcție de concentrația acestuia.
7. S-au efectuat măsurători de spectroscopie RMN în câmpuri înalte a ^1H și ^{13}C sub MAS pentru cele 3 tipuri de fertilizatori organo-minerali și s-au pus în evidență modificări subtile datorate unor variații minore ale componentelor acestora.
8. Spectroscopia FT-IR s-a dovedit a fi o metodă utilizată cu succes pentru caracterizarea complexă atât a fertilizatorilor organo-minerali, cât și a materialelor brute utilizate pentru *electrospinning*, a soluțiilor precursore și în final și a foliilor de nanofibre.
9. Difracția de raze X a fost utilizată cu succes pentru caracterizarea structurală a materialelor brute utilizate pentru *electrospinning* cât și a biosolidelor utilizate ca fertilizatori organo-minerali.

-
10. Micrografia electronică de baleiaj (SEM) a confirmat producerea de nanofibre cu morfologie (forma, structură, dimensiunii și conectivitate) complexă influențată puternic de tipul și concentrația biomaterialelor folosite. În plus, cuplată cu EDX s-a dovedit a fi esențială pentru clarificarea elementelor componente, nou formate prin extrudare și obținerea de biosolide utilizate ca fertilizatori organo-minerali.
 11. S-a arătat că și măsurătorile clasice, utilizate pentru determinarea parametrilor fizico-chimici ale unor soluții, cum ar fi pH, conductivitate electrică și TDS, turbiditate, indicii de refracție și vâscozitate pot fi folosite în mod inteligent. În acest sens măsurători dinamice de pH și de conductivitate electrică au fost utilizate pentru determinarea cantității de fertilizator eliberat, a unui timp specific de eliberare și a unei viteze de eliberare a fertilizatorilor în soluții de apă distilată.
 12. Analiza datelor a fost complexă și a implicat mai multe niveluri, începând de la procesarea primară a datelor măsurate, continuând cu analiza acestora care implică transformata Fourier 1D și transformata Laplace 1D și 2D, deconvoluția spectrelor Laplace și Fourier, analiza cantitativă și terminând cu analiza statistică în componente principale (PCA) îmbunătățită prin utilizarea inteligenței artificiale care a implicat folosirea de rețele neuronale artificiale și învățare automată.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Dharadhar and A. Majumdar, “Biomaterials and Its Medical Applications”, Application of Biomedical Engineering in Neuroscience, 355-380, 2019, doi: 10.1007/978-981-13-7142-4_18.
2. A. Bharadwaj, “An overview on biomaterials and its applications in medical science”, in *IOP conference series: materials science and engineering*, IOP Publishing, 2021, April, Vol. 1116, No. 1, p. 012178.
3. Y.C. Ahn, S.K. Park, G. T. Kim, Y. J. Hwang, C.G. Lee, H.S. Shin, et al, “Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers”, *Curr Appl Phys*, 6:1030–5, 2006.
4. J. Zeleny, “The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces”, *Phys Rev* 3:69–91, 1914.
5. G.I. Taylor, “Electrically Driven Jets”, *Proc R Soc Lond, A Math Phys Sci*, (1934–;313, 453-75, 1990.
6. S.Y. Chew, Y. Wen, Dzenis Y, Leong KW. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Curr Pharm Des*, 12:4751–70, 2006.
7. D. Liang, B.S. Hsiao, B Chu, “Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications”, *Adv Drug Deliv Rev* 59:1392–412, 2007
8. A.L. Yarin, S. Koombhongse, D.H. Reneker, “Bending instability in electrospinning of nanofibers”, *J Appl Phys.*, 89:3018–26, 2001
9. S Ramakrishna, K Fujihara, W.E. Teo, T. Yong, Z. Ma, R. Ramaseshan, “Electrospun nanofibers: solving global issues”, *Mater Today*, 9:40–50, 2006.
10. L.A. Smith, P.X. Ma, “Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering”, *Colloid Surf B*, 39: 125–31, 2004.
11. N. Bhardwaj, S. C Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 28(3), 325-347, 2010.
12. N. Cioica, C. Coța, E. M. Nagy, Z.Gyorgy, C. Nicola, “Reactive Extrusion Processing of Nutrient-Enriched Biosolids”, *INTERNATIONAL SYMPOSIUM, INMA TECH 2020*.
13. C. Coța, N. Cioica, E. M. Nagy, Z. Gyorgy, , R. Fechete, “Research Regarding the Realisation of Granular Organo-Mineral Fertilizers Based on Biosolids”, *INTERNATIONAL SYMPOSIUM, INMA TECH*, 2019.
14. H. Kominko et al., “Sustainable Management of Sewage Sludge for the Production of Organo-Mineral Fertilizers”, *Waste Biomass Valorization*, vol. 9, pp. 1817–1826, 2018.

15. V. Kumar et al., "A review on sewage sludge (Biosolids) a resource for sustainable agriculture", Archives of Agriculture and Environmental Science, vol. 2, no.4, pp. 340-347, 2017.
16. R. Pöykiö, G. Watkins, O. Dahl, "Characterisation of municipal sewage sludge as a soil improver and a fertilizer product", Ecological Chemistry and Engineering S, vol. 26, no. 3, pp.547-557, 2019.
17. H. Kominko et al., "The Possibility of Organo-Mineral Fertilizer Production from Sewage Sludge", Waste Biomass Valorization, vol.8, pp. 1781–1791, 2017.
18. H. Kominko et al., "Closing the nutrient cycle by using organo-mineral fertilizers based on secondary raw material", Proceedings of 7th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, Heraklion, Greece, pp. 1-15, 2019.
19. E. M. Nagy et al., "Research on the realization of biocomposite ecofertilizing granular materials based on peat", Annals of the University of Craiova -- Agriculture, Montanology, Cadastre Series, vol.. XLVIII/2018, pp.344-349, 2018.
20. .
21. M. Warne, M. McLaughlin, D. Heemsbergen, M. Bell, K. Broos, M. Whatmuff, G. Barry, D. Nash, D. Pritchard, D.Stevens, G. Pu, *Draft Position Paper recommendations of the Australian National Biosolids Research Program on Biosolids Guidelines*, 2008.
22. D.L. Pritchard, N. Penney, M.J. McLaughlin, H. Rigby, K. Schwarz, "Land application of sewage sludge (biosolids) in Australia: risks to the environment and food crops", Water Sci. Technol. 62 (1), 48–57. 2020
23. **R.Crainic**, E. M. Nagy, G. Fodorean, M. Vasilescu, P. Pascuta, F. Popa and R. Fechete, "Advanced NMR, FT-IR, VIS-nearIR and XRD methods used for characterization of organo-mineral fertilizers based on biosolids", Agriculture 14, 2024.
24. B.M.M.N. Borges, D.B. Abdala, M.F. de Souza, L.M. Viglio, M.J.A. Coelho, P.S. Pavinato, and H.C.J. Franco, "Organomineral phosphate fertilizer from sugarcane byproduct and its effects on soil phosphorus availability and sugarcane yield", Geoderma 339, 20–30 (2019).
25. C. Lu and H. Tian, "Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: Shifted hot spots and nutrient imbalance", Earth Syst. Sci. Data 9, 181–192 (2017).
26. A.E. Johnston, D. Curtin, and K. Syers, Efficiency of Soil and Fertilizer Phosphorus Use, FAO: Roma, Italy, 2008.

27. M. Pawlett, L.K. Deeks, and R. Sakrabani, "Nutrient potential of biosolids and urea derived organo-mineral fertilizers in a field scale experiment using ryegrass (*Lolium perenne* L.)", *Field Crops Res.* 175, 56–63 (2015).
28. M.C. Paré, S.E. Allaire, L.É. Parent, and L. Khiari, "Variation in the physical properties of organo-mineral fertilisers with proportion of solid pig slurry compost", *Biosystems Engineering* 106(3), 243–249 (2010).
29. L.K. Deeks, K. Chaney, C. Murray, R. Sakrabani, S. Gedara, M.S. Le, ... and G.H. Smith, "A new sludge-derived organo-mineral fertilizer gives similar crop yields as conventional fertilizers", *Agronomy for Sustainable Development* 33, 539–549 (2013).
30. R. Fechete, D. E. Demco, D.C. Moldovan, R.I. Chelcea, E. Culea, "Rezonanța Magnetică Nucleară, Metode Clasice și Moderne, Ed. Risoprint" Cluj-Napoca, 2010.
31. J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2012.
32. L. Venkataramanan, Y.Q. Song, and M.D. Hürlimann, "Solving Fredholm integrals of the first kind with tensor product structure in 2 and 2.5 dimensions", *IEEE Transactions on Signal Processing* 50, 1017–1026, 2002.
33. M.D. Hürlimann, S. Utsuzawa, and C.Y. Hou, "Spin dynamics of the Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence in time-dependent magnetic fields", *Phys. Rev. Appl.* 12, 044061, 2019. <https://doi.org/10.1103/PhysRevApplied.12.044061>
34. C. Duan, C. Ryan, S. Utsuzawa, Y.Q. Song, and M.D. Hürlimann, "Effect of off-resonance on T1 saturation recovery measurement in inhomogeneous fields", *J. Magn. Reson.* 281, 31–43, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2017.05.003>
35. Y.Q. Song, Y. Tang, M.D. Hürlimann, and D.G. Cory, "Real-time optimization of nuclear magnetic resonance experiments", *J. Magn. Reson.* 289, 72–78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.02.009>
36. Y.Q. Song, "Magnetic Resonance of Porous Media (MRPM): a perspective", *J. Magn. Reson.* 229, 12–24, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.11.010>
37. Smith, Brian C. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC press, 2011.
38. Brian C. Smith, *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*. CRC Press, Boca Raton, 1999.

39. Brian C. Smith, *Quantitative Spectroscopy: Theory and Practice*. Academic Press, San Diego, 2002.
40. S. Bourne, A. Haefner, K. Norton, and P. Griffiths, *Anal. Chem.* 62: 2448, 1990.
41. P. Griffiths and J. DeHaseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2nd ed., Wiley, New York, 2007.
42. M. Diem, P. Griffiths, and J. Chalmers, Eds., *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Wiley, New York, 2008.
43. C.A. De Caro and C. Haller, *UV/VIS Spectrophotometry—Fundamentals and Applications*, Mettler-Toledo International, 2015.
44. Y. Waseda, E. Matsubara, and K. Shinoda, *X-ray Diffraction Crystallography: Introduction, Examples and Solved Problems*, Springer Science & Business Media, 2011.
45. W. Zhou, R. Apkarian, Z.L. Wang, and D. Joy, “Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM)”, *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 1–40, 2007.
46. C. Lu and H. Tian, “Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance”, *Earth Syst. Sci. Data* 9, 181–192, 2017.
47. FAO. Efficiency of Soil and Fertilizer Phosphorus Use. 2008.
48. C. Borgia, R.J.S. Brown, and P. Fantazzini, “Uniform-Penalty Inversion of Multiexponential Decay Data”, *J. Magn. Reson.* 132, 65–77, 1998.
49. I. Lacan, M. Moldovan, and I. Ardelean, “The Influence of Chitosan on Water Absorption and Solubility of Calcium Phosphate Cement”, *Coatings* 13, 1641, 2023. <https://doi.org/10.3390/coatings13091641>.
50. Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, “Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy of Biological Tissues”, *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179, 2008.
51. **R. Crainic**, A.S. Farcașanu, P. Pășcuță, L.D. Șaitiș, F. Popa, R. Fechete, “Complex characterization of nanofibers biomaterials based on chitosan, collagen and fish gelatine produced by electrospinning”, *Analytical Letters*, S. 1-29, 2024, doi: 10.1080/00032719.2024.2372348.
52. S. Katakı, S. Hazarika, and D. C. Baruah, “Investigation on by-products of bioenergy systems (anaerobic digestion and gasification) as potential crop nutrients using FTIR,

- XRD, SEM analysis and phyto-toxicity test”, *Journal of Environmental Management*, 196, 201–216, 2017.
53. M. Dhawan, R. Sharma, and G. Sharma, “EDX and X-Ray Technique in Forensic Science”, in *Advances in Analytical Techniques for Forensic Investigation*, 339–362, 2024.
54. R. F. Melo-Silveira, G. P. Fidelis, M. S. S. P. Costa, C. B. S. Telles, N. Dantas-Santos, S. O. Elias, V. B. Ribeiro, A. L. Barth, A. J. Macedo, E. L. Leite et al., “In Vitro Antioxidant, Anticoagulant and Antimicrobial Activity and Inhibition of Cancer Cell Proliferation by Xylan Extracted from Corn Cobs”, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 409–426, 2012.
55. W. F. Wolkers, A. E. Oliver, F. Tablina, J. H. Crowe, “A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses”, *Carbohydrate Research*, 339, 1077–1085, 2004.
56. F. R. F. Silva, C. M. P. G. Dore, C. T. Marques, M. S. Nascimento, N. M. B. Benevides, H. A. O. Rocha, S. F. Chavante, E. L. Leite, “Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced by carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans”, *Carbohydrate Polymers*, 79, 26–33, 2021.
57. M. Todica, L. Udrescu, *Experimental Methods in Polymer Physics*, Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca, Romania, 2013.
58. **R. Crainic**, L. R. Drăgan, R. Fechete, “Structural investigations of polymer-based materials”, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica*, 63, 49-60, 2018.
59. **R. Crainic**, P. Păscuță, F. Popa, R. Fechete, “NMR, FT-IR, XRD, SEM and ANN characterization of nanofibers materials produced by electrospinning”, *Materials*, (in preparation, 2024).
60. R. Fechete, D.E. Demco, X. Zhu, W. Tillmann, and M. Möller, “Water states and dynamics in perfluorinated ionomer membranes by ^1H one- and two-dimensional NMR spectroscopy, relaxometry, and diffusometry”, *Chemical Physics Letters* 597, 6–15, 2014.
61. R. Fechete, D. Moldovan, and R. Chelcea, *Applications of Modern NMR Techniques to Nanocomposite Materials and Biomaterials*, ISBN: 978-973-662-906-8, Editura U.T. PRESS, Cluj-Napoca, 2013.
62. **R. Crainic**, R. Fechete, “Slaughterhouse Wastewater Properties Assessment by Modern and Classic Methods”, *Water*, 16, 2382, 2024. DOI: 10.3390/w16172382.

LISTA PUBLICATIILOR DIN DOMENIUL TEZEI

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. R. Fechete, I.A. Morar, D. Moldovan, R.I. Chelcea, **R. Crainic**, S.C. Nicoara, Fourier and Laplace-like low-field NMR spectroscopy: The perspectives of multivariate and artificial neural networks analyses, *Journal of Magnetic Resonance* 324, 106915, (2021) (IF: 2.516, AIS: 0.68).
2. **Ramona Crainic**, A. S.Farcașanu, P. Pășcuță, L. R. Șaitiș, F. Popa, Radu Fechete, Complex Characterization of Nanofiber Biomaterials Based on Chitosan, Collagen and Fish Gelatine Produced by Electrospinning." *Analytical Letters* (2024): 1-29 (IF: 1.6, AIS: 0.267).
3. **Ramona Crainic**, Radu Fechete, Slaughterhouse Wastewater Properties Assessment by Modern and Classic Methods. *Water* 2024, 16, 2382. <https://doi.org/10.3390/w16172382> (IF: 3.0, AIS: 0.529).
4. **Ramona Crainic**, E.M. Nagy, E.M.; Fodorean, G.; Vasilescu, M.; Pascuta, P.; Popa, F.; Fechete, R. Advanced Nuclear Magnetic Resonance, Fourier Transform–Infrared, Visible-NearInfrared and X-ray Diffraction Methods Used for Characterization of Organo-Mineral Fertilizers Based on Biosolids. *Agriculture* 2024, 14, 1826. <https://doi.org/10.3390/agriculture14101826> (IF: 3.3, AIS: 0.469).
5. **Ramona Crainic**, Petru Pășcuță, Florin Popa and Radu Fechete, NMR, FT-IR, XRD, SEM and ANN characterization of nanofibers materials produced by electrospinning, *Materials*, (in preparation 2025).

Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. **Ramona Crainic**, E. M. Nagy, N. Cioica, and R Fechete, ¹H NMR relaxometry and FT-IR spectroscopy used for characterization of organo-mineral fertilizers based on biosolids, ¹³th biennial International Conference on Processes in Isotopes and Molecules PIM-INCDTIM, 22-24 September 2021, Cluj-Napoca, Romania.

-
2. **Ramona Crainic**, Alexandru Stefan Farcasanu, Petru Pascuta, Lavinia Raluca Saitis, and Radu Fechete, Advanced experimental and numeric simulation method used for the characterization of nanofibers biomaterials produced by electrospinning. ³³th Annual Conference of the European Society for Biomaterials ESB2023, 4-8 September 2023, Davos, Switzerland.
 3. **Ramona Crainic**, A Fărcăsanu, P Păscută, L R Saitis and R Fechete, Experimental and numeric simulation used for the characterization of nanofibers biomaterials produced by electrospinning, ¹⁴th biennial International Conference on Processes in Isotopes and Molecules PIM-INCDTIM, 19-22 September 2023, Cluj-Napoca, Romania.