

NOI MATERIALE CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE DIRIJATE, DERIVATE DIN POLIMERI NATURALI

Teză de doctorat – Rezumat

pentru obținerea titlului științific de doctor la
Universitatea Politehnica Timișoara
în domeniul de doctorat INGINERIE CHIMICĂ

autor

ing. CRISTINA-TEODORA ARDEAN

conducător științific

Prof.univ.dr.ing. CORNELIU MIRCEA DAVIDESCU

Iunie 2023

CUPRINS

NOTAȚII. ABREVIERI. ACRONIME	Error! Bookmark not defined.
LISTA DE TABELE	Error! Bookmark not defined.
LISTA DE FIGURI	Error! Bookmark not defined.
INTRODUCERE	Error! Bookmark not defined.
PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 1. MATERIALE CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE	Error! Bookmark not defined.
1.1. Generalități	Error! Bookmark not defined.
1.2. Materialele anorganice structurate	Error! Bookmark not defined.
1.3. Materiale organice	Error! Bookmark not defined.
1.4. Celuloza - caracterizare, obținere, aplicații	Error! Bookmark not defined.
1.5. Chitosanul - caracterizare, obținere, aplicații	Error! Bookmark not defined.
1.6. Factori care influențează mecanismele de acțiune antimicrobiană	Error! Bookmark not defined.
1.6.1. Factori care influențează activitatea antimicrobiană a celulozei	Error! Bookmark not defined.
1.6.2. Factori care influențează activitatea antimicrobiană a chitosanului	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 2. MATERIALE FUNCȚIONALIZATE PRIN IMPREGNARE. OBȚINERE ȘI CARACTERIZARE	Error! Bookmark not defined.
2.1. Metode de obținere a materialelor prin funcționalizare prin impregnare	Error! Bookmark not defined.
2.1.1. Impregnarea rășinii cu solvent (SIR)	Error! Bookmark not defined.
2.1.2. Impregnarea prin ultrasonare	Error! Bookmark not defined.
2.1.3. Impregnarea prin evaporare controlată a solventului la presiune scăzută	Error! Bookmark not defined.
2.2. Metode de caracterizare a materialelor obținute prin funcționalizare fizico-chimică prin impregnare	Error! Bookmark not defined.
PARTEA A II-A. PARTEA EXPERIMENTALĂ. CONTRIBUȚII ORIGINALE	Error! Bookmark not defined.
CAPITOLUL 3. STRATEGIA CERCETĂRII	Error! Bookmark not defined.
3.1. Obținerea materialelor	Error! Bookmark not defined.
3.1.1. Suporturi	Error! Bookmark not defined.
3.1.1.1. Celuloza (CE)	Error! Bookmark not defined.
3.1.1.2. Chitosanul (CH)	Error! Bookmark not defined.
3.1.2. Extractanți	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.1. Săruri cuaternare de amoniu	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.2. Săruri cu fosfoniu	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.3. Săruri cu sulf și azot	Error! Bookmark not defined.

3.2. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor.....	Error!
Bookmark not defined.	
3.2.1. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.1.1. Microscopie electronică de scanning, SEM și dispersie de energie de raze X, EDX	
Error! Bookmark not defined.	
3.2.2.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR	
.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.2.3. Determinarea suprafeței specifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller)	
Error! Bookmark not defined.	
3.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor obținute prin funcționalizarea chitosanului	
.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.2.1. Microscopie electronică de scanning, SEM și dispersie de energie de raze X, EDX	
Error! Bookmark not defined.	
3.2.2.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR.....	Error! Bookmark not defined.
3.2.2.3. Determinarea suprafeței secifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller)....	Error! Bookmark not defined.
Concluzii	Error! Bookmark not defined.

CAPITOLUL 4. APLICAȚII MICROBIOLOGICE ALE CELULOZEI FUNCȚIONALIZATE.....**Error! Bookmark not defined.**

4.1. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cuaternare de amoniu	Error!
Bookmark not defined.	
4.1.1. Studii pentru stabilirea raportului optim celuloză: săruri cuaternare de amoniu	Error!
Bookmark not defined.	
4.1.2. Efectul antimicrobian al materialelor cu săruri cuaternare de amoniu asupra tulpinilor microbiene de referință	Error! Bookmark not defined.
4.2. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu extractanți care conțin săruri de fosfoniu.....	Error!
Bookmark not defined.	
4.2.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CE: sare de fosfoniu	Error! Bookmark not defined.
defined.	
4.2.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu asupra tulpinilor microbiene de referință	Error! Bookmark not defined.
4.3. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cu sulf și azot	Error!
Bookmark not defined.	
4.3.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CE: săruri cu sulf și azot	Error! Bookmark not defined.
not defined.	
4.3.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot asupra tulpinilor microbiene de referință	Error! Bookmark not defined.
CONCLUZII	Error! Bookmark not defined.

CAPITOLUL 5. APLICAȚII MICROBIOLOGICE ALE CHITOSANULUI FUNCȚIONALIZAT

Error! Bookmark not defined.

5.1. Materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului cu săruri cuaternare de amoniu	Error! Bookmark not defined.
5.1.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: săruri cuaternare de amoniu	Error!
Bookmark not defined.	
5.1.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu asupra tulpinilor de referință	Error! Bookmark not defined.
5.2. Materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu	Error!
Bookmark not defined.	
5.2.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: sare de fosfoniu	Error! Bookmark not defined.
defined.	
5.2.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH-săruri de fosfoniu asupra tulpinilor de referință.....	Error! Bookmark not defined.
5.3. Materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot	Error!
Bookmark not defined.	
5.3.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: sare cu sulf și azot	Error! Bookmark not defined.
not defined.	

5.3.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot asupra tulpinilor de referință..... **Error! Bookmark not defined.**
CONCLUZII **Error! Bookmark not defined.**

**CAPITOLUL 6. CONCLUZII FINALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE..... Error!
Bookmark not defined.**

6.1. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE asupra unui inocul heterotrof **Error! Bookmark not defined.**

6.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH asupra unui inocul heterotrof..... **Error!
Bookmark not defined.**

6.3. Efectul antimicrobian al materialelor asupra tulpinilor de referință. Prezentare comparativă. **Error!
Bookmark not defined.**

BIBLIOGRAFIE **Error! Bookmark not defined.**

REZUMAT EXTINS AL TEZEI DE DOCTORAT

Biomaterialele sunt considerate materialele viitorului, devenind parte din viața cotidiană, ca urmare a aplicațiilor pe care le au în domenii precum: cosmetică, farmacie, industria alimentară, medicină, industria chimică, electronică, electrotehnică etc. Efectul lor benefic asupra protecției mediului înconjurător, dar în special rolul lor antimicrobian a captat atenția oamenilor de știință. Totodată este absolut necesar să se cunoască proprietățile lor fizico-chimice, precum forma, dimensiunea, structura cristalină, solubilitatea sau chimismul suprafeței pentru a stabili rolului fiecărei proprietăți în manifestarea efectului antimicrobian al biomaterialului.

Cercetarea și dezvoltarea biopolimerilor au câștigat un impuls semnificativ, conduse de „chimia verde” și principiile de sustenabilitate care sunt din ce în ce mai adaptate în industrie. Caracteristicile biopolimerilor, cum ar fi biocompatibilitatea lor, rata de

degradabilitate proiectată cu precizie, procesabilitatea termică, rezistența relativ ridicată, toxicitatea scăzută, cristalinitatea controlată și hidrofilitatea au făcut biopolimerii extrem de utili în aplicații biomedicale.

În ultimii ani, microorganismele rezistente la medicamente reprezintă o problemă gravă pentru sănătatea publică. De aceea, sunt necesare noi strategii de control al activității bacteriilor, iar materialele cu proprietăți dirijate pot fi o abordare promițătoare.

În contextul rezistenței tulpinilor microbiene la cei mai mulți agenți bactericizi cunoscuți până în acest moment, dezvoltarea unor noi materiale antibacteriene sau cel puțin cu proprietăți bacteriostatice, pornind de la biomateriale, a deschis noi oportunități pentru inhibarea adeziunii microbiene și limitarea transmiterii acestora. De asemenea, în contextul actual, al utilizării tot mai vaste a conceptelor de biomasă și bioenergie, studiul comparativ al unor biopolimeri cum sunt celuloza și chitosanul oferă perspective largi de utilizare a acestora, bazate pe progresele științifice și ingineresti realizate în domeniul biomaterialelor. Pornind de la asemănarea structurală a celor doi biopolimeri studiați, teza de doctorat a vizat sinteza unor materiale noi, prin grefarea/funcționalizarea prin impregnare a unor compuși chimici cu grupări pendante de N, P sau S, în acest context având rolul de extractanți, pe suprafața chitosanului și a celulozei.

Scopul acestei teze de doctorat este de a „dezvolta lumea biomaterialelor” prin modificarea proprietăților lor astfel încât, aplicațiile materialelor obținute să prezinte efect antimicrobian.

Se va evidenția faptul că efectul antimicrobian este direct dependent de raportul suport:extractant și totodată „efectul este influențat de interacțiunea dintre componenta cationică a biocidului și componenta anionică a membranei celulare bacteriene.

Teza de doctorat este structurată în două părți, structurate în 6 capitole și 149 pagini.

În partea I a tezei de doctorat se prezintă stadiul actual al cunoașterii în domeniul sintezei, caracterizării și aplicațiilor biomateriale noi menite să prezinte proprietăți microbiologice semnificative.

Necesitatea realizării acestui studiu pornește de la dorința obținerii unor biomateriale cu proprietăți dirijate, în vederea îmbunătățirii acțiunii și eficacității lor microbiologice. Teza de doctorat prin conținutul ei, a necesitat cunoștințe teoretice și experimentale, având un profund caracter interdisciplinar prin utilizarea cunoștințelor de inginerie chimică și de mediu, biotehnologie, tehnică microbiologică, metode moderne de analiză.

Chitosanul și celuloza reprezintă cei mai abundenți polimeri naturali, de origine animală sau vegetală, sunt netoxici și biodegradabili, fiecare fiind purtători ai unor grupări funcționale care să le confere biocompatibilitate și proprietăți superioare față de precursorii naturali.

Cei doi biopolimeri studiați, chitosanul și celuloza, prezintă simetrie structurală, având aceleași legături β -glicozidice, diferența principală fiind prezența grupărilor amino primare la C2 în chitosan, în locul grupărilor hidroxil din structura celulozei (Figura 6.1).

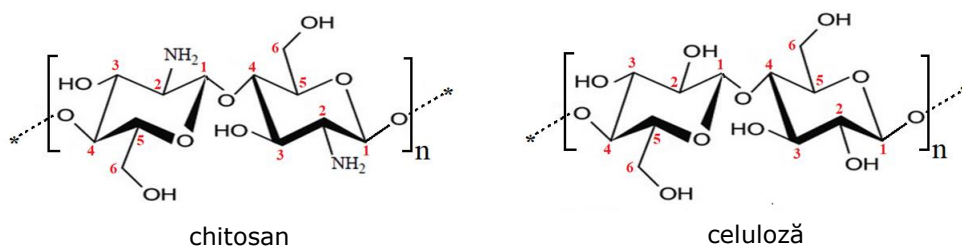


Figura 6.1. Structura chitosanului și celulozei

În stare nativă ambii biopolimeri studiați au foarte puține aplicații în comparație cu diversitatea aplicațiilor formelor lor modificate. Prin modificarea chimică a structurii de bază a celor doi polimeri sunt îmbunătățite majoritatea proprietăților native, sau sunt imprimate proprietăți noi, printre care obținerea unui efect antimicrobian substanțial al acestora.

Deși biopolimerii cu efect antimicrobian se pot obține prin modificarea permanentă a biopolimerilor prin reacții chimice, în această teză de doctorat s-a utilizat o tehnică de funcționalizare prin impregnare, metoda SIR (Solvent Impregnated Resin), obținându-se **135 materiale noi**. Aceste materiale sunt obținute pornind de la două suporturi: **celuloză (CE) și chitosan (CH)**, **6 extractați prietenoși cu mediul: (i) săruri cuaternare de amoniu** (bromură de dodecil-trimetil-amoniu (DDTMABr), bromură de tetradecil-trimetil-amoniu (TDTMABr), clorură de hexadecil-trimetil amoniu (HDTMACl)), (ii) **săruri de fosfoniu** (bromură de dodecil-trifenil fosfoniu (DDTPPBr), bromură de tri n-butyl-hexadecil fosfoniu

(HDTBPBr)) și (iii) **săruri cu sulf și azot** (tiouree (Thio și mercaptobenzotiazol (MBT)). Rapoartele masice suport:extractant pentru toate materialele studiate sunt: 1:0,012; 1:0,024; 1:0,05; 1:0,075; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,4; 1:0,5. Suplimentar, în cazul materialelor CH-DDTMABr, CH-TDTMABr, Ch-HDTMACI, întrucât la cel mai mic raport de funcționalizare CH:săruri cuaternare de amoniu = 1:0,012 luat în studiu nu a fost observată creștere bacteriană, s-au sintetizat materiale cu acești extractanți la rapoarte masice mai mici, respectiv 1:0,003; 1:0,006; 1:0,009.

Pentru a putea stabili dacă materialul prezintă proprietăți bactericide, am procedat la efectuarea unor studii microbiologice, care să evidențieze comportamentul acestor materiale în prezența unui consorțiu de bacterii obținut din apa prelevată din râul Bega. Studiile microbiologice au fost efectuate prin tehnici convenționale de cultivare, urmărind dezvoltarea microorganismelor.

Punerea în evidență a efectului bactericid s-a realizat prin determinarea numărului total de bacterii mezofile aerobe și facultativ anaerobe, cultivate la 37°C (număr total de germeni, NTG). Prezența bacteriilor heterotrofe aerobe și facultativ anaerobe s-a pus în evidență prin însămânțarea apei sau diluțiilor zecimale prin procedeul încorporării în mediu nutritiv solid (geloză nutritivă), după normativul SR EN ISO 6222:2004.

Scopul principal al numărării coloniilor constă în posibilitatea de a detecta variațiile în raport cu modificarea rapoartelor suport: extractant.

Rezultatele au fost exprimate ca **număr de unități formatoare de colonii per mililitru** (UFC/mL).

În absența coloniilor în cutiile însămânțate care conțin volume de probe de analizat nediluate, rezultatul se exprimă ca fiind nedetectabil într-un mililitru.

Dacă cutiile însămânțate conțin mai mult de 300 colonii, rezultatul se exprimă numai ca număr aproximativ de unități formatoare de colonii. Ulterior, pentru exprimarea eficienței materialului asupra dezvoltării microbiene, rezultatele obținute au fost exprimate sub forma **ratei de inhibare a creșterii microbiene**.

O prezentare schematizată a modului de obținere și testare microbiologică a materialelor se găsește în Figura 6.2.

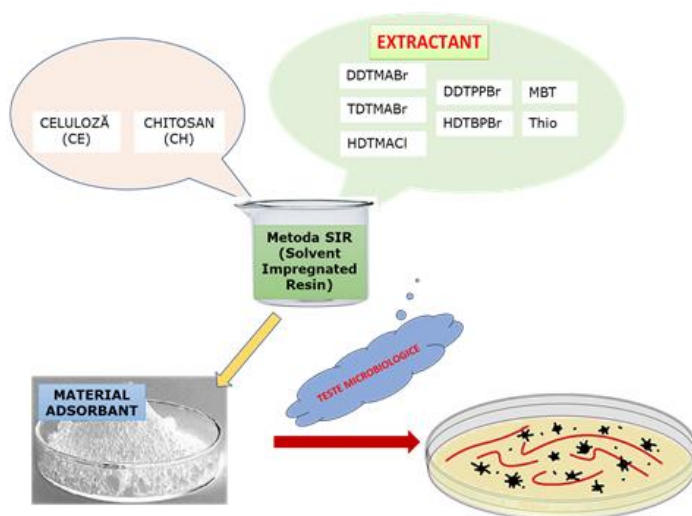


Figura 6.2. Modul de obținere și testare microbiologică a materialelor

Materialele obținute prin funcționalizarea, prin impregnare a celulozei (CE) sau chitosanului (CH) cu o serie de extractanți, la raportul masic suport:extractant=10:1, au fost caracterizate prin microscopie electronică de scanning, SEM, dispersie de energie de raze X, EDX și spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR pentru a pune în evidență prezența extractantului (DDTMABr, TDTMABr, HDTMACI, DDTPPBr, HDTBPBr, MBT și Thio) pe suprafața suportului (CE sau CH). De asemenea, s-a determinat și aria suprafeței specifice, diametru porilor și volumul total al porilor pentru materialele sintetizate. Astfel:

- În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei se poate observa din micrografiile SEM faptul că pentru toate materialele obținute fibrele de celuloză sunt mai aglomerate în urma funcționalizării. S-a observat că materialele obținute au multe fibre mai subțiri. Cu toate acestea, nu au fost observate diferențe structurale majore între fibrele de celuloză și materialele obținute prin funcționalizarea celulozei cu extractanți.

- Această modificare morfologică este atribuită umflării și dezintegrării parțiale a fibrelor celulozice în timpul procesului de modificare a suprafeței, urmată de inserția de fragmente cu grupări active prezente în extractanți, care acoperă suprafața fibrelor. Cu toate acestea, fibre de dimensiuni micro analoge cu o microstructură de suprafață aspră și în formă de tijă sunt relevate pentru probele pe bază de celuloză microcristalină, demonstrând funcționalizarea suprafeței omogenă fără variații mari a morfo suprafeței.
- În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea, prin impregnare a chitosanului s-au constatat din imaginile SEM faptul că morfologia materialelor obținute în urma funcționalizării chitosanului nu se modifică semnificativ față de materialului suport, (CH). Prezintă formă grăunțoasă.
 - Din spectrele EDX se observă peak-urile specifice compoziției celulozei și anume C și O, sau peak-urile specifice C, N și O, din structura chitosanului. Totodată sunt prezentate spectrele EDX caracteristice materialelor sintetizate prin funcționalizarea celulozei, în care se observă peak-urile specifice elementelor prezente în compoziția celulozei, dar și a extractanților. Astfel, apar peak-uri specifice extractanților DDTMABr și TDTMABr și anume Br și N, sau Cl. Totodată, apar peak-uri specifice P și Br, elemente prezente în extractanții DDTPPBr și HDTBPBr sau peak-uri specifice S și N, elemente prezente în extractanții MBT și Thio.
 - Din spectrele FT-IR se poate afirma faptul că atât celuloza cât și chitosanul au fost funcționalizați cu succes cu cei 7 extractanți luați în studiu.
 - Din datele privind aria suprafeței specifice, diametrul porilor și volumul total de pori a CE și a materialelor obținute prin funcționalizarea CE, se poate afirma faptul că: (i) aria suprafeței materialelor CE-DDTMABr (0,002 nm) și CE-HDTMACl (0,082 nm) este mai mică decât a CE (0,091 nm), iar a celorlalte materiale este mai mare (între 0.168 nm și 5.429 nm); (ii) diametrul porilor materialelor CE-DDTMABr (176 nm) este mai mare decât a CE (66,0 nm), iar a celorlalte materiale este mai mic (între 3,08 nm și 36,5 nm); (iii) volumul total al porilor al materialului CE- DDTMABr ($6,278 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$) este mai mic decât al CE ($2,563 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$), iar a celorlalte materiale este mai mare (între $2,335 \times 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$ și $1,077 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$);
 - Din datele privind aria suprafeței specifice, diametrul porilor și volumul total de pori a CE și a materialelor obținute prin funcționalizarea CH, se poate afirma faptul că: (i) aria suprafeței materialelor este mai mică decât a CH; (ii) diametrul porilor materialelor este aproximativ asemănător cu al CH; (iii) volumul total al porilor al materialelor este mai mic decât al CH.

6.1. Efectul antibacterian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE asupra unui inocul heterotrof

În privința potențialului antimicrobian al CE, acesta poate fi pus în evidență numai prin intermediul materialelor obținute prin funcționalizarea acesteia, CE nativă neavând efect antimicrobian semnificativ (rata de inhibare a creșterii bacteriene de 17,93%). De aceea, utilizarea acestui biopolimer pentru obținerea unor materiale cu proprietăți avansate este justificată în principal prin această activitate antibacteriană sporită împotriva microorganismelor patogene.

Am sintetizat materiale având drept suport CE și trei extractanți - săruri cuaternare de amoniu: DDTMABr, TDTMABr și HDTMACl; doi extractanți - săruri de fosfoniu: DDTPPBr, HDTBPBr și doi săruri cu sulf și azot: MBT și Thio.

Pentru a stabili eficiența materialelor obținute, s-au luat în lucru mai multe rapoarte CE:extractant (w:w), astfel încât să poată fi urmărită eficiența raportului de funcționalizare. Rapoartele suport:extractant luate în lucru au fost: 1:0,012; 1:0,025; 1:0,050; 1:0,075; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,4; 1:0,5. Ulterior, materialele obținute la aceste rapoarte au constituit materialele solide pentru testarea eficienței lor, sub aspect al activității antimicrobiene, efectuându-se teste microbiologice.

Eficiența **materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu sărurile cuaternare de amoniu**, sub aspect al numărului unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate, este prezentată în Figura. 6.3., respectiv rata de inhibare atinsă de fiecare material obținut în urma funcționalizării este prezentată în Figura 6.4.

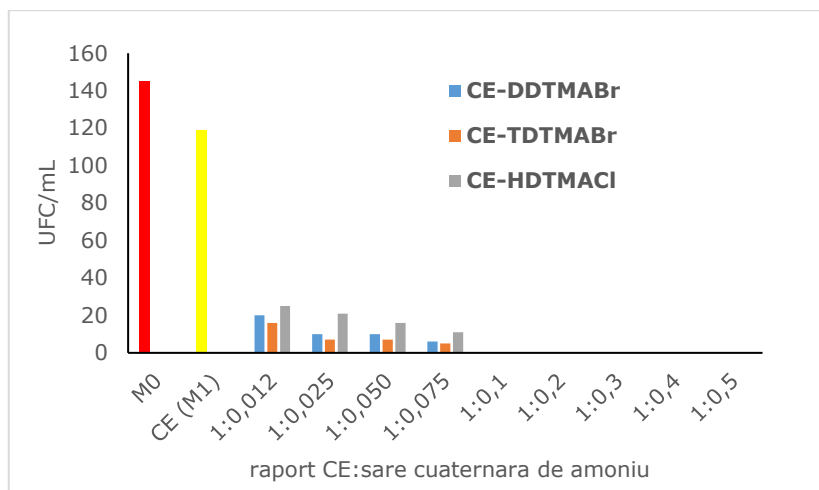


Figura 6.3. Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu

Îndiferent de sarea cuaternară de amoniu utilizată pentru funcționalizarea CE, materialele obținute au prezentat efect antibacterian total începând cu raportul CE:sare cuaternară de amoniu = 1:0,1.

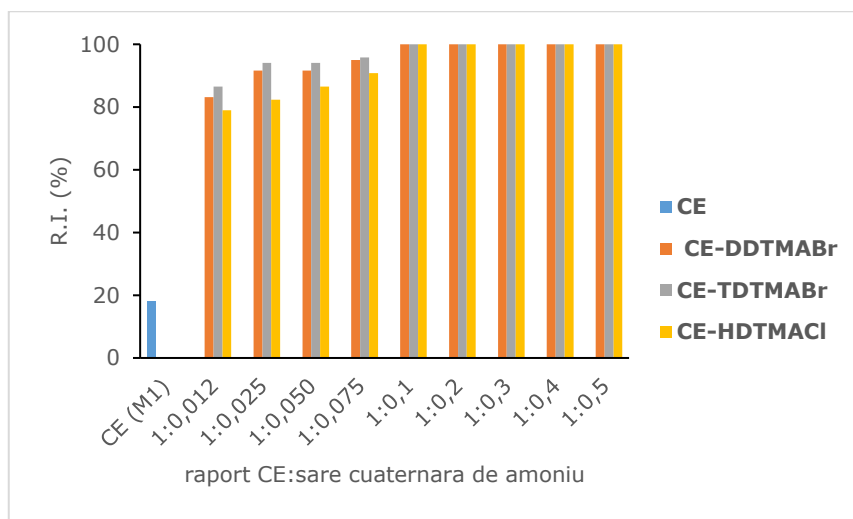


Figura 6.4. Rata de inhibare bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu

Rata de inhibare a creșterii bacteriene este maximă, începând cu raportul de funcționalizare CE:sare cuaternară de amoniu = 1:0,1. Chiar și la rapoarte de funcționalizare mai mici, s-a obținut o rată de inhibare a creșterii bacteriene cuprinsă între 78,99%, pentru materialul CE-HDTMACI obținut la raportul CE:HDTMACI= 1:0,012) și 95,80%, pentru materialul CE-TDTMABr obținut la raportul CE:TDTMABr = 1:0,5. La rapoarte mici de funcționalizare CE:TDTMABr = 1:0,012 – 1:0,075, materialul CH-TDTMABr a prezentat rata de inhibare ușor mai mare.

Rata de inhibare a creșterii bacteriene, când au fost testate materiale obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu, a crescut în ordinea TDTMABr > DDTMABr > HDTMACI. Acest aspect a fost corelat cu distanța dată de lungimea brațului substituentului alchil, de la structura de bază a polimerului (scheletul polimeului), până la sarcina pozitivă dată de azotul cuaternar.

Eficiența **materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu**, sub aspect al numărului unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate, este prezentată în Figura. 6.5., respectiv rata de inhibare atinsă de fiecare material obținut în urma funcționalizării CE este prezentată în Figura 6.6.

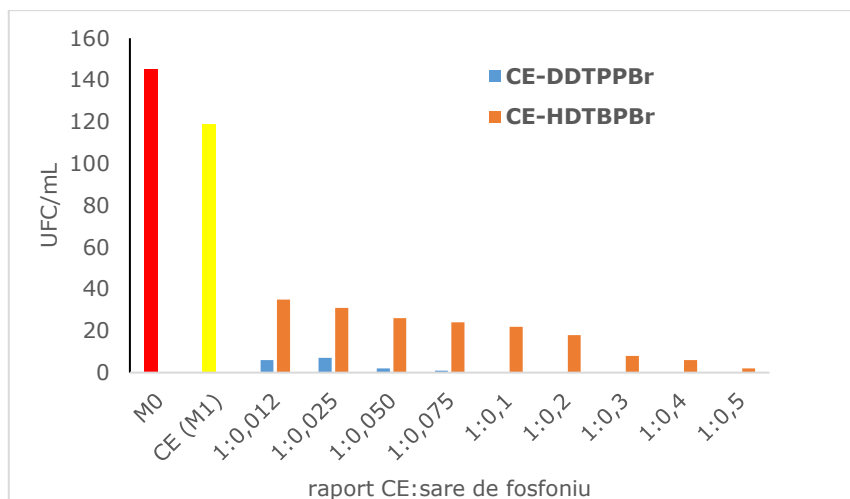


Figura 6.5. Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu

Materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu au prezentat eficiență antimicrobiană bună și foarte bună, dovedită prin lista creșterii coloniilor bacteriene pentru materialul CE-DDTPPBr, începând cu raportul de funcționalizare 1:0,1.

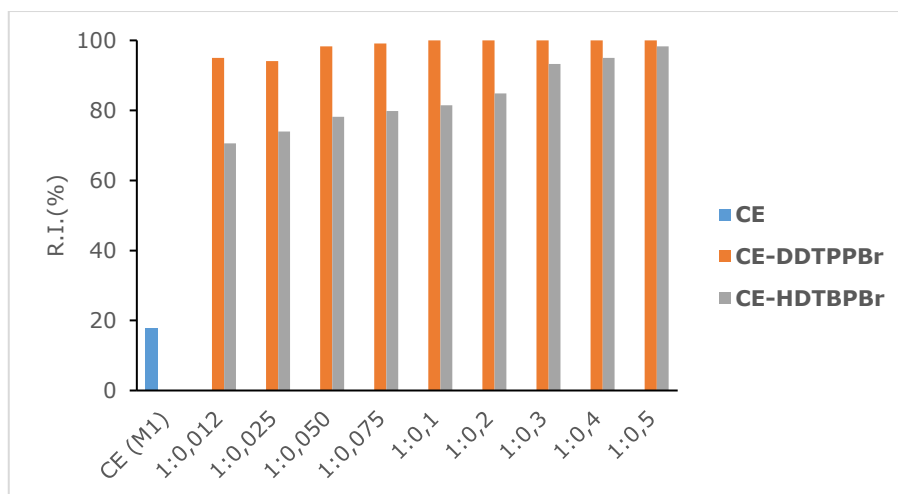


Figura 6.6. Rata de inhibare bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu

Rata de inhibare a creșterii bacteriene pentru materialele CE-HDTBPBr a variat în intervalul 70,59%, la raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr =1:0,012 și 98,32%, la raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr =1:0,5. Pentru materialul CE-DDTPPBr variația ratei de inhibare a creșterii microbiene a fost în intervalul 94,96%, la raportul de funcționalizare CE:DDTPPBr=1:0,012) și 100%, la rapoarte de funcționalizare CE:DDTPPBr =1:0,5), ceea ce indică eficiență antimicrobiană foarte bună pentru acest material.

Indiferent de raportul de funcționalizare, materialul CE-DDTPPBr a manifestat rată de inhibare a creșterii bacteriene mai bună comparativ cu materialul CE-HDTBPBr. Acest aspect a fost corelat cu diferența de hidrofobicitate dată mai ales de substituentul de cuaternizare diferit (trifenil, respectiv tributil). Deși, cei doi extractanți, DDTPPBr și HDTBPBr au și lungime diferită a lanțului substituentului alchil (dodecil și hexadecil) care distanțează sarcina pozitivă a grupării active de structura de bază a CE, aportul de hidrofobicitate este neesențial, comparativ cu cel imprimat de substituentul de cuaternizare.

Eficiența **materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf**, sub aspect al numărului unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate, este prezentată în Figura 6.7., respectiv rata de inhibare atinsă de fiecare material obținut în urma funcționalizării este prezentată în Figura 6.8.

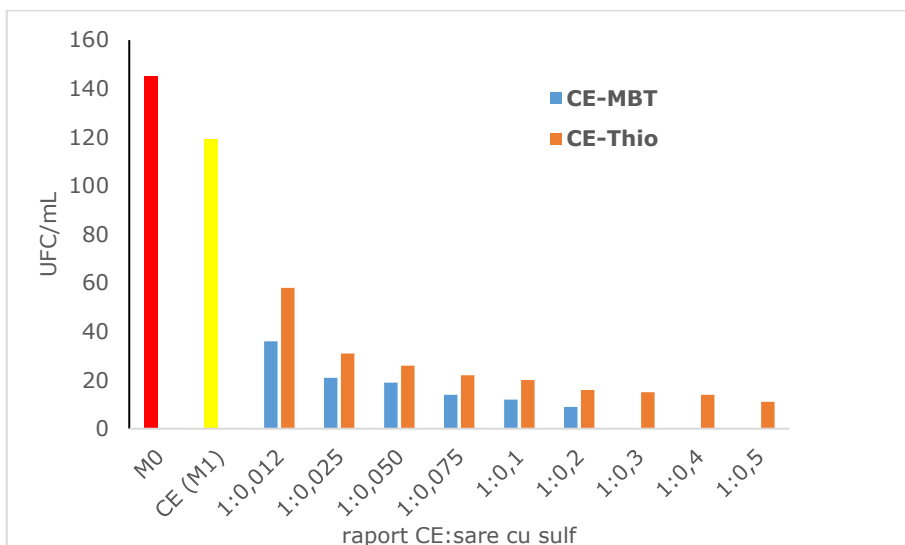


Figura 6.7. Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf

În privința materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf, efect antimicrobian mai bun a manifestat materialul CE-MBT. Independent de raportul de funcționalizare, materialul CE-Thio au permis dezvoltarea unui număr mai mare de colonii bacteriene, comparativ cu materialul CE-MBT, pentru care, odată atins raportul de funcționalizare CE:MBT = 1:0,3 nu a mai fost observată creștere microbiană. Acest aspect a fost corelat cu atingerea unui echilibru al caracterului hidrofob/hidrofil, care se pare că este necesar a fi atins pentru obținere aefectului antimicrobian total.

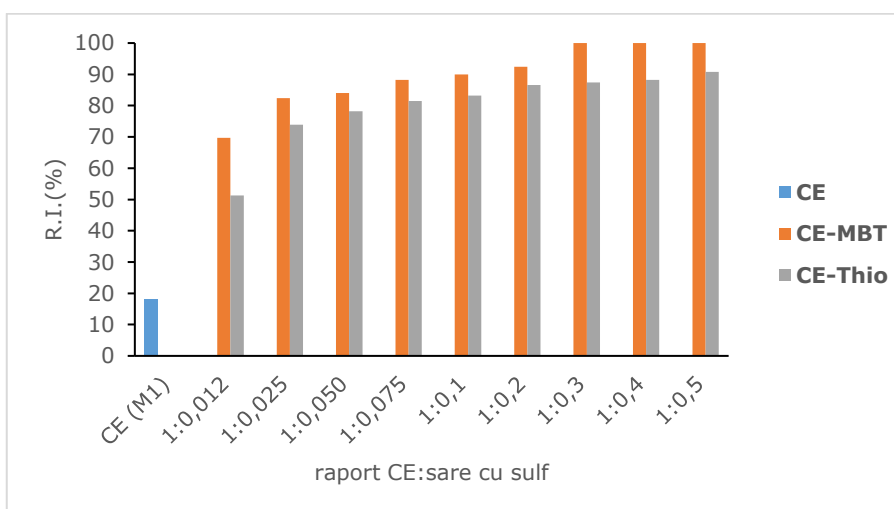


Figura 6.8. Rata de inhibare bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf

Rata de inhibare a creșterii bacteriene pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf variază între 51,26% pentru materialul CE-Thio la raportul de funcționalizare CE:Thio=1:0,012) și 100% pentru materialul CE-MBT la rapoarte CE:MBT de funcționalizare mai mari de 1:0,3).

Pentru materialul CE-Thio, întrucât rata de inhibare a creșterii bacteriene a fost în intervalul 51,26%-90,76%, corespunzătoare unei creșteri a raportului de funcționalizare CE:Thio de 50 ori, putem considera că aceste materiale au efect bacteriostatic, ceea ce presupune o inhibare a dezvoltării bacteriilor, fără a le omorî neapărat.

În consecință, datorită abundenței grupărilor hidroxil pe suprafața CE, este posibilă modificarea cu ușurință a suprafeței CE cu o serie de grupări chimice (N, P sau S), care imprimă proprietăți specifice noului derivat format, cu aplicații variate: materiale

biodegradabile de înaltă performanță, inginerie biomedicală, industria medicamentelor, ca agent antimicrobian, cataliză, industria textilă, agent floculant în tratarea apelor etc.

6.2. Efectul antibacterian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH asupra unui inocul heterotrof

Chiar dacă CH are, prin gruparea amino prezentă în structură, o activitatea antibacteriană intrinsecă (dovedită prin rata de inhibare a creșterii bacteriene de 41,38%), prin modificarea CH nativ, se pot obține derivați ai acestuia cu proprietăți antimicrobiene remarcabile, cum sunt materialele obținute prin funcționalizarea prin impregnare a CH cu săruri cuaternare de amoniu sau săruri de fosfoniu, la care a fost atinsă rata maximă de inhibare bacteriană.

S-au sintetizat prin funcționalizarea CH cu aceiași extractanți, materiale la raporte de funcționalizare diferite, pentru a urmări eficiența materialelor sub aspect al manifestării activității antimicrobiene.

Astfel, atunci când au fost testate **materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu**, CH-DDTMABr, CH-TDTMABr și CH-HDTMACI, s-a observat creștere bacteriană doar la rapoartele 1:0,003 până, la 1:0,009, la toate celelalte rapoarte de funcționalizare creșterea bacteriană nefiind observată (Figura 6.9).

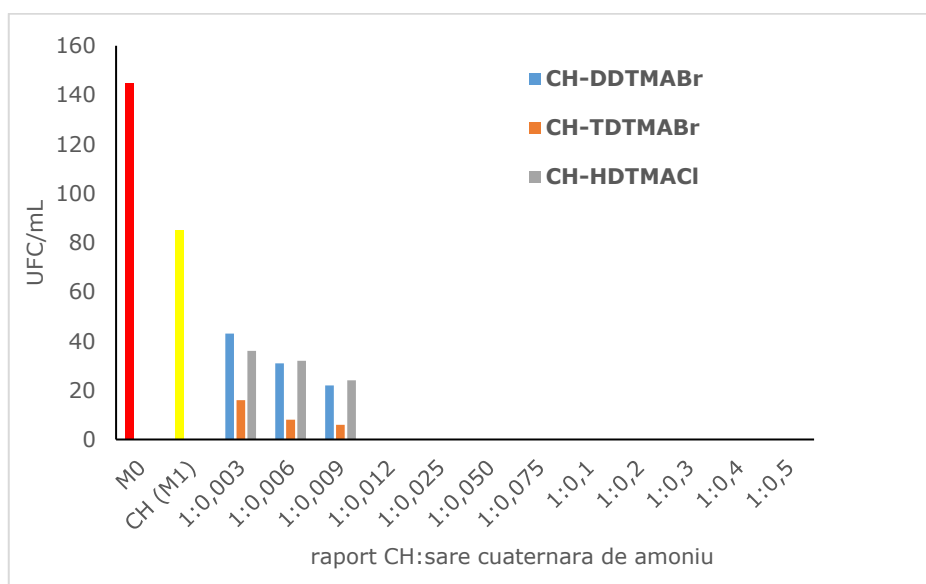


Figura 6.9. Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu

În consecință, rata de inhibare a creșterii bacteriene pentru materialele obținute prin funcționalizarea Ch cu săruri cuaternare de amoniu a fost maximă pentru rapoartele 1:0,012 până la 1:0,5.

La rapoartele de funcționalizare CH:sare cuaternară de amoniu mai mici, rata de inhibare a creșterii bacteriene a variat între 49,41 %, pentru materialul CH-DDTMABr obținut la raport CH:DDTMABr=1:0,012 și 92,94% pentru materialul CH-TDTMABr obținut la raport CH:TDTMABr=1:0,009 (Figura 6.10).

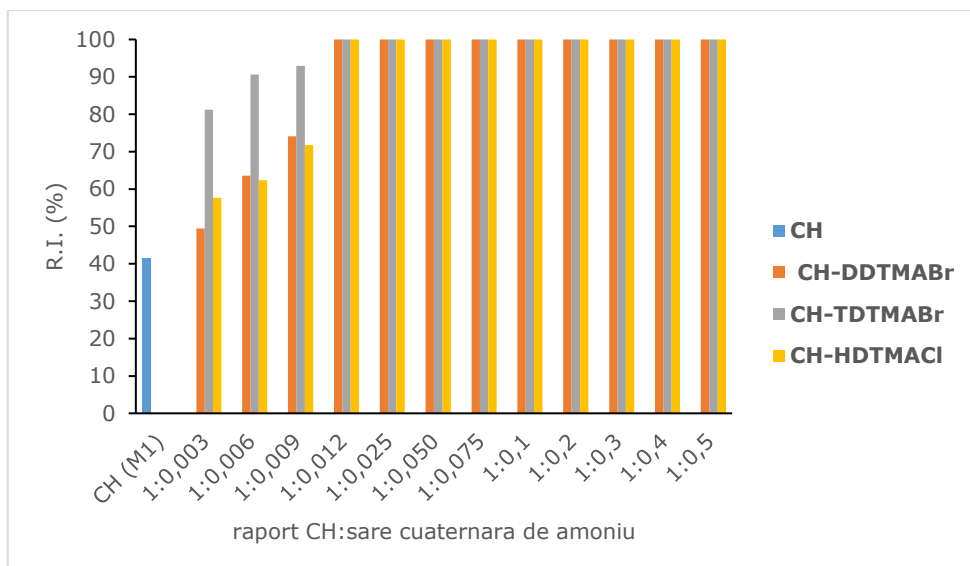


Figura 6.10. Rata de inhibare bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu

La rapoarte mici de funcționalizare, pentru materialele CH-săruri cuaternare de amoniu, efectul antibacterian a fost corelat cu lungimea substituentului alchil al fiecărui extractant, respectiv cu distanța de la azotul cuaternar până la scheletul de bază al chitosanului, dată de conformația acestui braț.

În cazul **materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu**, CH-HDTBPBr și CH-DDTPPBr, la rapoarte de funcționalizare între 1:0,012 și 1:0,5, creșterea bacteriană a fost observată la materialul CH-HDTBPBr, în timp ce materialul CH-DDTPPBr nu a prezentat creștere bacteriană (Figura 6.11).

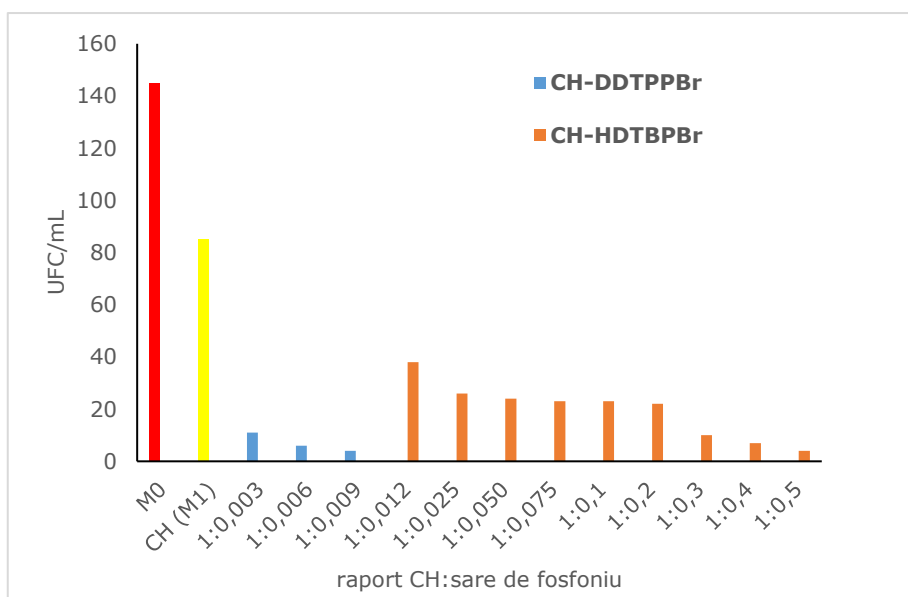


Figura 6.11. Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu

Pentru a observa începând cu ce raport de funcționalizare se manifestă efectul antibacterian în cazul materialelor CH-DDTPPBr, am sintetizat rapoarte 1:0,003 până la 1:0,009 și s-a confirmat că efect bactericid total, în cazul acestor materiale, se obține începând cu raportul masic 1:0,012 (Figura 6.12.).

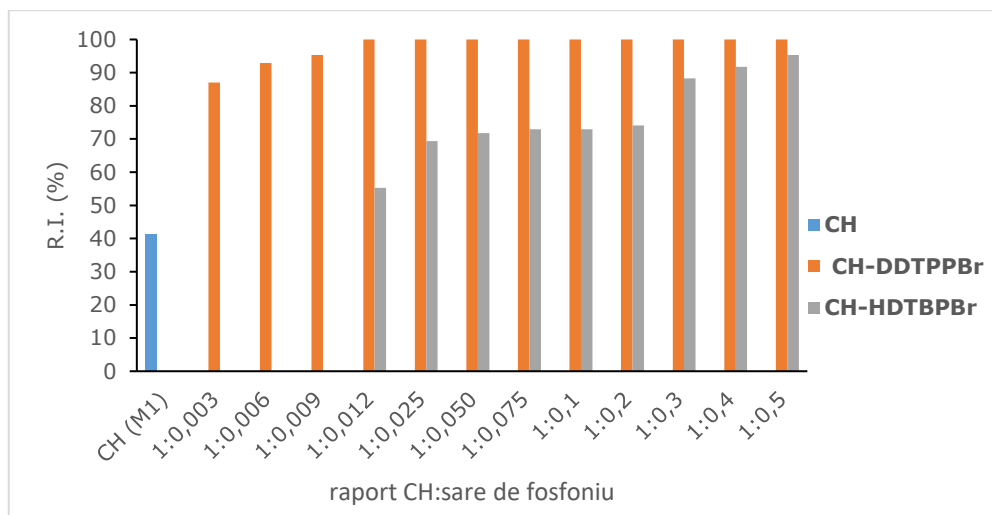


Figura 6.12. Rata de inhibare bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu

Rata de inhibare a creșterii bacteriene pentru materialul CH-DDTPPBr a variat între 87,06% (raport CH:DDTPPBr=1:0,003) și 95,29% (raport CH:DDTPPBr = 1:0,009), ceea ce presupune o activitate antibacteriană foarte bună chiar și la utilizarea unei cantități foarte mici de extractant.

Rezultatele foarte bune, sub aspect al manifestării efectului antibacterian, a fost justificat prin aportul adus de caracterul hidrofob al substituentului fenil în cazul materialului CH-DDTPPBr, comparativ cu substituentul butil, în cazul materialului CH-HDTBPBr.

Este dovedit astfel rolul extrem de important pe care îl joacă balanța hidrofil/hidrofob în manifestarea efectului bactericid, la intercațunarea cu celula bacteriană.

Pentru **materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf**, rezultatele sunt similare cu cele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf. Efect antibacterian mai bun are materialul CH-MBT, comparativ cu materialul CH-Thio, indiferent de raportul de funcționalizare CH:sare cu sulf (Figura 6.13).

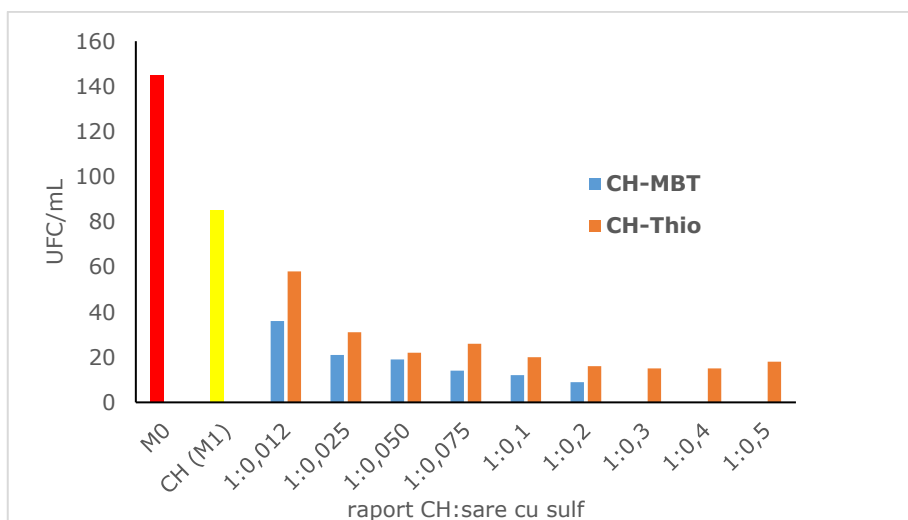


Figura 6.13. Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf

Rata de inhibare a creșterii bacteriene a crescut proporțional cu creșterea raportului de funcționalizare (Figura 6.14.), atingând valoarea maximă (100%) pentru materialul CH-MBT începând cu raportul de funcționalizare CH:MBT=1:0,3.

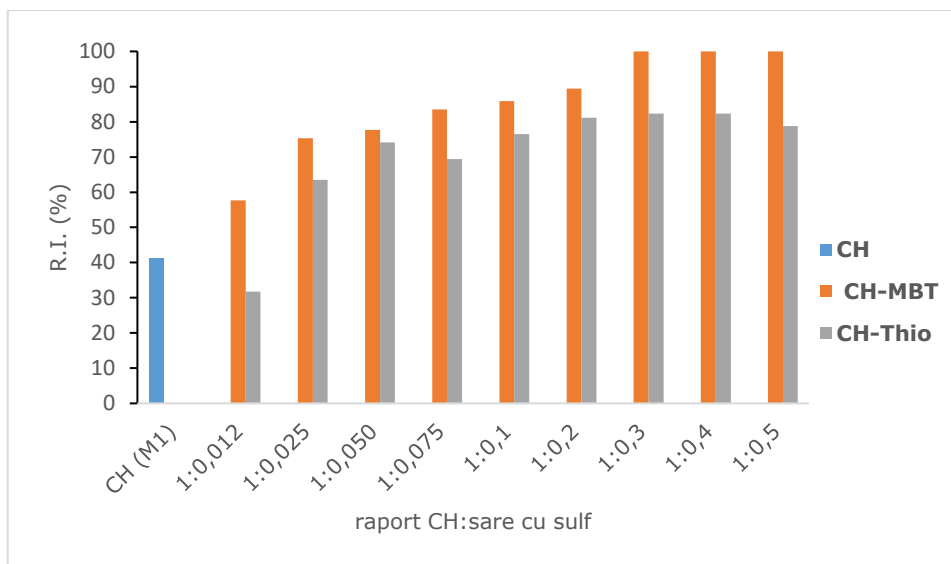


Figura 6.14. Rata de inhibare bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf

La raport de funcționalizare CH:Thio=1:0,012 pentru materialul CH-Thio a fost obținută o rată de inhibare a creșterii bacteriene de 31,76%, în timp ce în cazul aceluiași material, pentru raportul de funcționalizare CH:Thio=1:0,5 s-a atins rata de inhibare de 78,82%. Pe baza acestor rezultate, deși raportul de funcționalizare CH:Thio a fost crescut de 50 ori, rata de inhibare abia a crescut de 2,5 ori, ceea ce ne determină să considerăm că acest material, CH-Thio are efect mai degrabă bacteriostatic și nu bactericid.

Datorită prezenței grupării – NH₂, care acționează ca un nucleofil puternic, CH poate fi funcționalizat cu o gamă largă de grupări active/pendante pentru a se modula structura pentru aplicații specifice. Această versatilitate structurală îi conferă chitosanului modificat multiple aplicații: în industria alimentară – datorită filmelor de protecție ce pot fi obținute și ulterior aplicate pentru conservarea produselor, în medicină și farmacie – ca agent antibacterian sau antifungic, în ingineria țesuturilor și în vindecarea rănilor, în industria medicamentelor, în industria textilă, în tratarea apelor uzate etc.

Așadar, particularitatea CH este dată de prezența grupării amino primare, care îi conferă un grad mare de reactivitate, în timp ce în structura celulozei, prezența a câte trei grupări hidroxil în fiecare unitate monomeră permite formarea de legături de H intramoleculare și intermoleculare puternice.

6.3. Efectul antimicrobian al materialelor asupra tulpinilor de referință. Prezentare comparativă.

Cei doi biopolimeri studiați, CE și CH, deși au structuri moleculare similare, cu aceleași legături β-glicozidice între unitățile monomere, sub aspectul naturii chimice a biopolimerilor studiați, celuloza este un polizaharid neutru sau anionic, în timp ce chitosanul este un polizaharid neutru sau cationic. Din acest motiv, chiar dacă structura de bază a biopolimerilor este similară, ei au manifestat efecte antibacteriene diferențiate, funcție de extractantul cu care a fost realizată funcționalizarea și tipul de microb asupra căruia au fost testate.

Astfel a fost urmărit modul de răspuns al bacteriilor studiate sub acțiunea materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei, respectiv chitosanului, cu grupări de azot, fosfor sau sulf, având structură chimică diferită. În toate cazurile, materialul sintetizat a avut efect antibacterian îmbunătățit față de biopolimerul nativ.

Testele microbiologice de control s-au efectuat utilizând o suspensie bacteriană de aproximativ 1x10⁸ UFC/mL din tulpini microbiene de referință (ATCC). Pentru a pune în evidență efectul asupra bacteriilor Gram-negative au fost studiate materiale însămânțate cu tulpini de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, în timp ce efectul materialelor asupra bacteriilor Gram-pozitive a fost urmărit pe tulpina de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Eficiența acestor materiale, sub aspect al activității antifungice, a fost testată pe *Candida albicans* ATCC 10231.

CE nefuncționalizată a manifestat efect bactericid ușor mai slab asupra bacteriilor Gram-pozitive (Figura 6.15), comparativ cu cele Gram-negative (Figura 6.16 și Figura 6.17),

În timp ce chitosanul nativ a prezentat efect bactericid ușor mai bun asupra bacteriilor Gram-negative (Figura 6.16 și Figura 6.17).

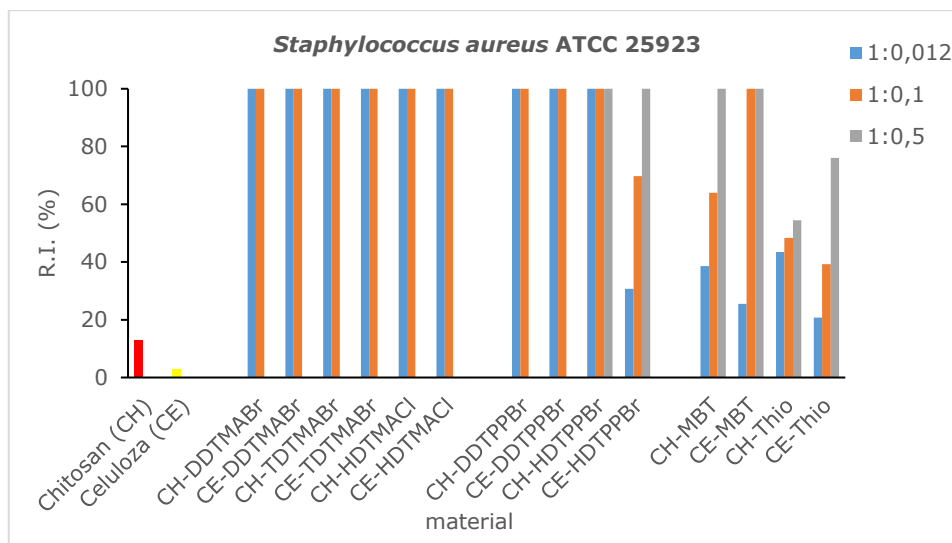


Figura 6.15. Rata de inhibare a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

În privința efectului materialelor asupra speciei *Pseudomonas aeruginosa*, toate materialele obținute prin funcționalizarea CE sau CH cu săruri cuaternare de amoniu testați au prezentat efect bactericid, corelat cu cantitatea de extractant utilizată pentru funcționalizare (Figura 6.16.).

Nu a fost atinsă rata de inhibare maximă, la niciun raport studiat, probabil fiind necesară o cantitate de biocid mult mai mare. Membrana externă a celulei bacteriene la specia *Pseudomonas aeruginosa* este o barieră selectivă importantă, ceea ce determină o adsorbție redusă a biocidului în celulă datorită susceptibilității reduse a acestei specii pentru agenți biociți.

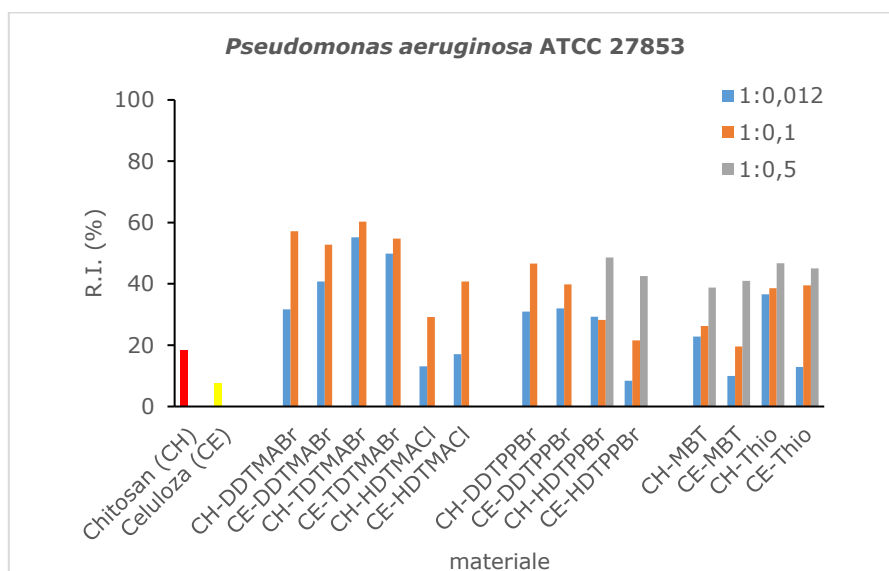


Figura 6.16. Rata de inhibare a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu au prezentat o activitate antimicrobiană foarte bună pentru toate microorganismele examinate (cu excepția *Pseudomonas aeruginosa*), bacterie care este cunoscută pentru rezistența sa la majoritatea antibioticelor uzuale.

Toate materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu

au prezentat o activitate antibacteriană mai mare, în general, împotriva *Staphylococcus aureus*, decât asupra speciei *Escherichia coli* (Figura 6.15 și Figura 6.17).

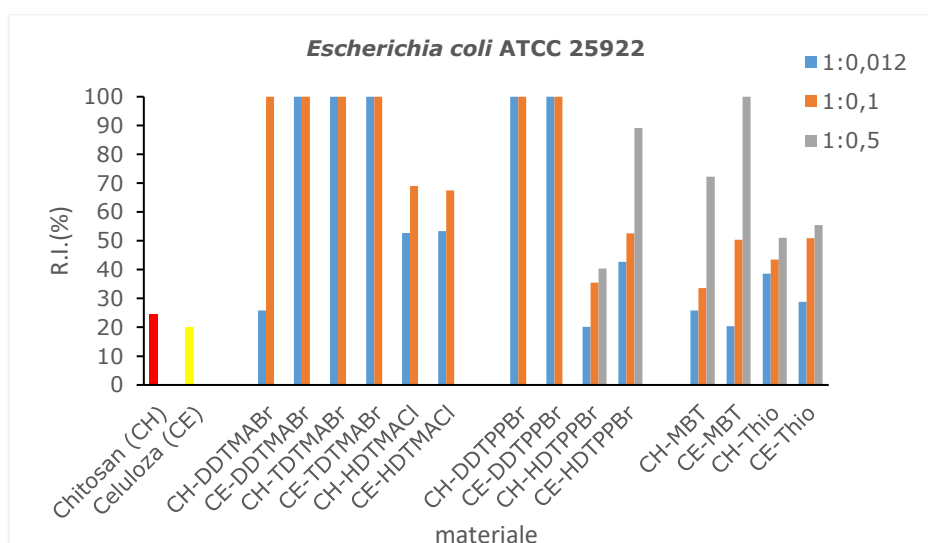


Figura 6.17. Rata de inhibare a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Escherichia coli* ATCC 25922

Toate materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu utilizați (DDTMABr, TDTMABr, HDTMACl), au arătat activitate antibacteriană foarte bună asupra speciilor *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*, indiferent de raportul de funcționalizare a materialului suport (Figura 6.15 și Figura 6.18).

Posibil ca acest efect să se datoreze comportării similare a peretelui celular de la specia *S.aureus* cu celula fungică a speciei *Candida albicans*.

Materialul aderă puternic la peretele celular bacterian și pe membrana celulară fungică, deteriorându-le structura și nepermițând schimbul de elemente nutritive necesare pentru dezvoltarea microbiană, ceea ce ulterior duce la moartea celulei, și obținerea efectului antimicrobian.

Un alt rol important în permeabilitatea membranei celulare are cantitatea de acizi grași prezenți în structura acesteia, care ulterior se corelează cu gradul de pătrundere a elementului toxic în celulă.

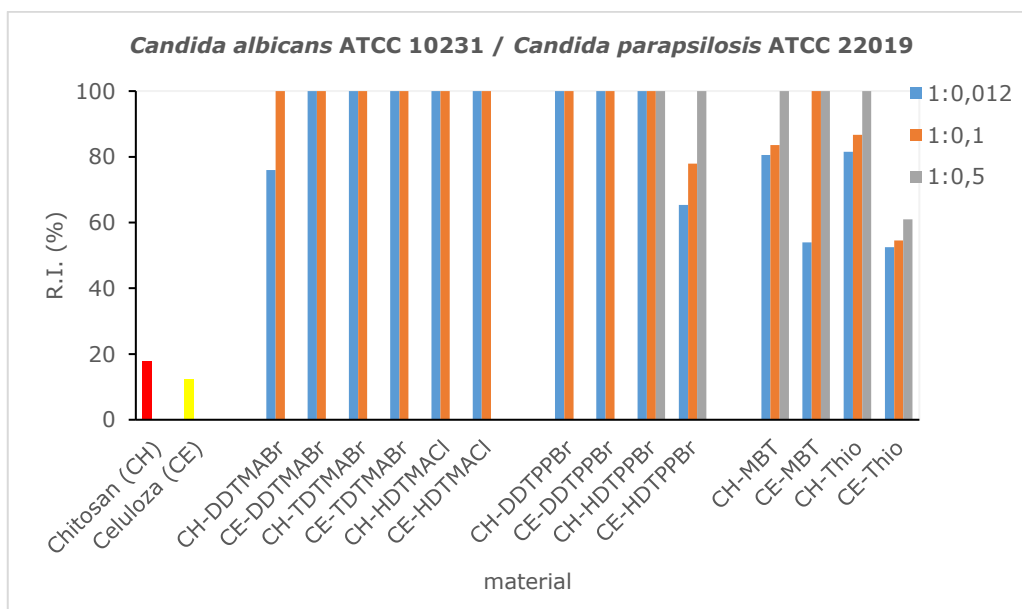


Figura 6.18. Rata de inhibare a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Candida albicans* ATCC 10231 (materialele obținute prin funcționalizarea CE) / *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (materialele obținute prin funcționalizarea CH)

Materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu și săruri

de fosfoniu au arătat o capacitate antibacteriană substanțială împotriva speciilor *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* și *Pseudomonas aeruginosa* chiar și la concentrații foarte mici de agent antimicrobian imobilizat la suprafață. Inhibarea creșterii tulpinilor *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Candida albicans* a fost obținută prin utilizarea materialelor CE-DDTMABr, CE-TDTMABr și CE-DDTPPBr, indiferent de raportul de funcționalizare testat.

Materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf au manifestat în general efect bacteriostatic sau fungistatic. Excepție a fost în cazul materialului CH-MBT când s-a atins rata de inhibare maximă asupra speciilor *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans* la rapoarte de funcționalizare începând cu raportul CH:MBT = 1:0,3.

În cazul materialelor obținute prin funcționalizare CH săruri cu sulf, activitatea antibacteriană / antifungică asupra speciilor *Staphylococcus aureus* și *Candida parapsilosis* este mai puțin evidentă în cazul rapoartelor mici de funcționalizare și crește odată cu creșterea raportului CH: sare cu sulf.

În cazul bacteriilor Gram-negative testate, efectul materialului CH-Thio este mai degrabă unul bacteriostatic, decât unul bactericid, motivat de rata de inhibiție aproximativ de același ordin de mărime, la o modificare a raportului de funcționalizare CH:Thio de 50 ori.

Hidrofobicitatea, care se corelează bine cu bioactivitatea substanțelor chimice, este o caracteristică foarte importantă și comportamentul hidrofob diferit al materialelor obținute prin funcționalizarea CH, joacă un rol important în mecanismele lor de activitate biologică, indiferent că e vorba despre activitatea antibacteriană sau antifungică.

În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea biopolimerilor cu săruri cuaternare de amoniu, activitatea antibacteriană a fost dependentă de lungimea lanțului alchil care distanțează gruparea pendentă a sării cuaternare față de structura de bază a biopolimerului.

În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea biopolimerilor cu săruri de fosfoniu, activitatea antibacteriană a fost puternic influențată caracterul hidrofob al grupării pendente (fenil comparativ cu butil), la care s-a adăugat distanța dată de substituentul alchil al sării cuaternare (dodecil comparativ cu hexadecil).

Ținând cont de potențialul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu, de a fi utilizate la obținerea de materiale biocompatibile pentru diverse tehnologii medicale, sigur că utilizarea materialelor CH-DDTPPBr și CH-HDTPPBr, a fost cu rezultate foarte bune asupra speciei *Staphylococcus aureus*, ceea ce reprezintă un deziderat în obținerea de biomateriale cu aplicații biomedicale.

Materialele obținute prin funcționalizarea biopolimerilor cu extractantul DDTPPBr, adică CE-DDTPPBr și CH-DDTPPBr, au efect bactericid total asupra bacteriilor Gram-pozitive și a tulpinii de *Escherichia coli*. Materialele obținute prin funcționalizarea CE și CH cu extractantul HDTBPBr, adică CE-HDTBPBr și CH-HDTBPBr, au efect bactericid maxim doar asupra bacteriilor Gram-pozitive.

Interacțiunea componentelor cationice din structura de bază a polimerilor cu componentele încărcate negativ prezente în membranele citoplasmice bacteriene este considerată o etapă crucială în manifestarea efectului antibacterian.

Sub aspectul hidrofobității, dacă comparăm acești doi extractanți utilizați pentru funcționalizarea materialului suport, se susține ipoteza conform căreia prin creșterea hidrofobității biocidelor cationice, acestea devin capabile să interacționeze cu membrana citoplasmatică.

Rezultatele obținute confirmă faptul că acțiune antibacteriană mai bună au materialele obținute prin funcționalizarea CE sau CH cu DDTPPBr, care sunt mai hidrofobe.

Cu toate că se pot sintetiza o multitudine de materiale pornind de la precursori naturali sau sintetici, prin diverse metode chimice, funcționalizarea biopolimerilor biodegradabili cu materiale cunoscute ca și agenți bactericizi este o metodă de funcționalizare preferabilă, ca răspuns la legile de mediu și problemele de gestionare ulterioară a produșilor secundari de reacție, prin care se obțin materiale cu proprietăți îmbunătățite și cu aplicabilitate vastă.

Cercetările originale prezentate în această teză de doctorat s-au concretizat prin publicarea și/sau comunicarea a 6 lucrări științifice în reviste indexate în Web of science. **Trei dintre lucrări sunt clasificate Q1, iar celelalte trei lucrări sunt Q2. De asemenea, s-a realizat 1 lucrare de licență și 1 lucrare de disertație; Suma factorilor de impact este 27,5. H-index-3.**

De menționat faptul că lucrarea cu titlul: Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization, a cărei prim-autor sunt, publicată în International Journal of Molecular Sciences, are 58 de citări după 2 ani de la publicare.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Inamuddin, M.I.A., Ram Prasad, *Advanced Antimicrobial Materials and Applications*. Environmental and Microbial Biotechnology. 2020: Springer.
2. Piera Anna Martino , E., *Antibiotic Resistance A One-Health Approach*. 2023, Antibiotics.
3. Qizhi Chen, G.T., *Biomaterials: A Basic Introduction* in CRC Press. . 2014.
4. Dastjerdi, R. and M. Montazer, *A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **79**(1): p. 5-18.
5. Kalia, S., B.S. Kaith, and I. Kaur, *Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites: Green Chemistry and Technology*. 2011: Springer Berlin Heidelberg.
6. Mourya, V.K. and N.N. Inamdar, *Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore*. Reactive & Functional Polymers, 2008. **68**(6): p. 1013-1051.
7. Martins, F.A., et al., *Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives Containing N-Quaternized Moieties in Its Backbone: A Review*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**: p. 20800-20832.
8. Sahariah, P., et al., *The effect of substituent, degree of acetylation and positioning of the cationic charge on the antibacterial activity of quaternary chitosan derivatives*. Marine drugs, 2014. **12**(8): p. 4635-4658.

9. Li, Z., F. Yang, and R. Yang, *Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups*. *Int J Biol Macromol*, 2015. **75**: p. 378-87.
10. Mohamed, N.A. and N.A. Abd El-Ghany, *Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan hydrazide derivative*. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2017. **66**(8): p. 410-415.
11. Verlee, A., S. Mincke, and C.V. Stevens, *Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives*. *Carbohydrate Polymers*, 2017. **164**: p. 268-283.
12. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. *Biotechnol Adv*, 2009. **27**(1): p. 76-83.
13. Nersisyan, H.H., et al., *A new and effective chemical reduction method for preparation of nanosized silver powder and colloid dispersion*. *Materials Research Bulletin*, 2003. **38**(6): p. 949-956.
14. Jeong, S., S.Y. Yeo, and S. Yi, *The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers*. *Journal of Materials Science*, 2005. **40**: p. 5407-5411.
15. Yeo, S.Y., H. Lee, and S. Jeong, *Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect*. *Journal of Materials Science*, 2003. **38**: p. 2143-2147.
16. Ardean, C., et al. *Kinetics and Thermodynamics Studies for Cadmium (II) Adsorption onto Functionalized Chitosan with Hexa-Decyl-Trimethyl-Ammonium Chloride*. *Materials*, 2020. **13**, DOI: 10.3390/ma13235552.
17. Ardean, C., et al., *Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(14).
18. Nemeş, N.S., et al., *Antimicrobial Activity of Cellulose Based Materials*. *Polymers (Basel)*, 2022. **14**(4).
19. Nemeş, N.S., et al. *Symmetry between Structure–Antibacterial Effect of Polymers Functionalized with Phosphonium Salts*. *Symmetry*, 2022. **14**, DOI: 10.3390/sym14030572.
20. Ardean, C., et al., *Antimicrobial Activities of Chitosan Derivatives*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(10): p. 1639.