

# **NOI MATERIALE CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE DIRIJATE, DERIVATE DIN POLIMERI NATURALI**

Teză destinată obținerii  
titlului științific de doctor  
la  
Universitatea Politehnica Timișoara  
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ  
de către

**Ing. CRISTINA-TEODORA ARDEAN**

Președintele comisiei: prof.univ.dr.ing. Nicolae VASZILCSIN  
Conducători științifici: prof.univ.dr.ing. Corneliu Mircea DAVIDESCU  
prof.univ.dr.ing. Adina-Georgeta NEGREA  
Referenți științifici: prof.univ.dr. ing. Catinca SECUIANU  
prof.univ.dr.ing. Titus-Vasile VLASE  
prof.univ.dr.ing. Francisc PÉTER

Ziua susținerii tezei: 08.09.2023

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- |   |   |
|---|---|
| 1. Automatică                               | 11. Știința și Ingineria Materialelor                                   |
| 2. Chimie                                   | 12. Ingineria Sistemelor  |
| 3. Energetică                               | 13. Inginerie Energetică  |
| 4. Inginerie Chimică                        | 14. Calculatoare și Tehnologia Informației                              |
| 5. Inginerie Civilă                         | 15. Ingineria Materialelor  |
| 6. Inginerie Electrică                      | 16. Inginerie și Management   |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 17. Arhitectură   |
| 8. Inginerie Industrială                    | 18. Inginerie Civilă și Instalații                                      |
| 9. Inginerie mecanică                       | 19. Inginerie Electronică, Telecomunicații și Tehnologii Informaționale |
| 10. Știința Calculatoarelor                 |   |

Universitatea Politehnica Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul Școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2023

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității Politehnica Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300223 Timișoara, Bd. Vasile Pârvan 2B  
Tel./fax 0256 404677  
e-mail: editura@upt.ro

## Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității mele în cadrul Departamentului de Chimie Aplicată și Ingineria Compușilor Anorganici și a Mediului al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din cadrul Universității Politehnica Timișoara.

Doresc să îi mulțumesc conducătorului de doctorat **prof.dr.ing. Corneliu Mircea Davidescu** pentru împărtășirea cunoștințelor, îndrumarea, sprijinirea și susținerea acordată pe perioada studiului doctoral și a elaborării tezei.

De asemenea, le mulțumesc din suflet membrilor comisiei de îndrumare: doamnelor, **prof. dr. ing Adina Negrea**, **conf. dr. ing. Elvira-Mihaela Ciopec** și domnului **conf. dr. ing. Narcis Duțeanu**, respectiv domnului **prof. dr. ing. Petru Negrea** și doamnei **dr. chim. biolog Nicoleta Nemeș**, cărora le exprim recunoștința pentru răbdarea, susținerea, sfaturile, încurajările și îndrumarea acordată pe tot parcursul stagiului de doctorat.

Mulțumesc profesorilor și colegilor care m-au ajutat în a scrie articolele științifice, dar și pentru întregul lor ajutor în finalizarea tezei de doctorat și pe tot parcursul studiilor mele doctorale.

De asemena doresc să mulțumesc **familiei mele și prietenilor mei** care au fost alături de mine necondiționat, pentru sprijinul, susținerea și răbdarea acordată fără încetare.

În ultimul rând doresc să îmi mulțumesc pentru că nu am renunțat și pentru că am ajuns astăzi aici, doresc încă o dată să le mulțumesc celor menționați mai sus pentru tot ajutorul oferit în acești ani, tot ce am învățat în această perioadă va fi o lecție de viață importantă pentru mine în viitor.

Timișoara, iulie 2023

**Ardean Cristina Teodor**

Dedic această teză de doctorat familiei mele.

ARDEAN, Cristina Teodora

**Noi materiale cu proprietăți antimicrobiene dirijate, derivate din polimeri naturali**

Teze de doctorat ale UPT, Seria X, Nr. YY, Editura Politehnica, 2023, 148 pagini, 77 figuri, 25 tabele.

ISSN:

ISBN:

**Cuvinte cheie**

Biomateriale, celuloză, chitosan, săruri cuaternare de amoniu, săruri cu fosfoniu, săruri cu sulf și azot, activitate microbiologică

**Rezumat**

Pornind de la faptul că materialele naturale disponibile pentru o gamă largă de aplicații sunt reprezentate în general de către polizaharide și acestea pot avea activitate antimicrobiană – cazul chitosanului și al celulozei, însă, pentru a prezenta proprietăți specifice, s-au obținut 135 materiale modificate chimic prin funcționalizarea prin impregnare, prin metoda SIR (Solvent Impregnated Resin), a chitosanului și a celulozei cu săruri cuaternare de amoniu, săruri de fosfoniu și săruri cu sulf și azot.

Materialele obținute au fost caracterizate prin metode fizico-chimice precum: spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR, microscopie electronică de scanning, SEM și spectrometrie de raze X cu dispersie de energie, EDX. De asemenea, a fost determinată suprafața specifică prin metoda BET.

Studiile microbiologice au fost realizate atât pe inocul bacterian heterotrof, cât și pe tulpini specifice aparținând American Type Culture Collection (ATCC), stabilindu-se activitatea antimicrobiană (număr de colonii bacteriene, rata de inhibiție etc.). Pentru a pune în evidență aceste efecte asupra bacteriilor Gram-negative studiile au fost efectuate pe 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 testat pe tulpina de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pentru observarea activității antifungice a materialelor a fost utilizată tulpina de *Candida albicans* ATCC 10231 sau *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Teza de doctorat este structurată în 2 părți, 6 capitole.

## CUPRINS

NOTAȚII. ABREVIERI. ACRONIME.....	7
LISTA DE TABELE .....	9
LISTA DE FIGURI .....	10
INTRODUCERE.....	13
PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ.....	15
CAPITOLUL 1. MATERIALE CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE .....	15
1.1. Generalități .....	15
1.2. Materialele anorganice structurate.....	17
1.3. Materiale organice .....	22
1.4. Celuloza - caracterizare, obținere, aplicații .....	24
1.5. Chitosanul - caracterizare, obținere, aplicații.....	26
1.6. Factori care influențează mecanismele de acțiune antimicrobiană .....	29
1.6.1. Factori care influențează activitatea antimicrobiană a celulozei .....	30
1.6.2. Factori care influențează activitatea antimicrobiană a chitosanului .....	32
CAPITOLUL 2. MATERIALE FUNCȚIONALIZATE PRIN IMPREGNARE. OBȚINERE ȘI CARACTERIZARE .....	39
2.1. Metode de obținere a materialelor prin funcționalizare prin impregnare .....	39
2.1.1. Impregnarea rășinii cu solvent (SIR).....	39
2.1.2. Impregnarea prin ultrasonare .....	41
2.1.3. Impregnarea prin evaporare controlată a solventului la presiune scăzută ....	42
2.2. Metode de caracterizare a materialelor obținute prin funcționalizare fizico- chimică prin impregnare .....	44
PARTEA A II-A. PARTEA EXPERIMENTALĂ. CONTRIBUȚII ORIGINALE .....	46
CAPITOLUL 3. STRATEGIA CERCETĂRII .....	46
3.1. Obținerea materialelor .....	47
3.1.1. Suporturi .....	48
3.1.1.1. Celuloza (CE) .....	48
3.1.1.2. Chitosanul (CH) .....	49
3.1.2. Extractanți.....	50
3.1.2.1. Săruri cuaternare de amoniu .....	50
3.1.2.2. Săruri cu fosfoniu .....	52
3.1.2.3. Săruri cu sulf și azot .....	54
3.2. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor .....	65
3.2.1. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei .....	65
3.2.1.1. Microscopie electronică de scanning, SEM și dispersie de energie de raze X, EDX .....	65
3.2.1.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR.....	67
3.2.1.3. Determinarea suprafeței specifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller) .....	71
3.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor obținute prin funcționalizarea chitosanului .....	71
3.2.2.1. Microscopie electronică de scanning, SEM și dispersie de energie de raze X, EDX .....	72
3.2.2.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR.....	74

3.2.2.3. Determinarea suprafeței secifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller) .....	77
Concluzii .....	78
CAPITOLUL 4. APLICAȚII MICROBIOLOGICE ALE CELULOZEI FUNCȚIONALIZATE ..	81
4.1. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cuaternare de amoniu .....	81
4.1.1. Studii pentru stabilirea raportului optim celuloză: săruri cuaternare de amoniu .....	81
4.1.2. Efectul antimicrobian al materialelor cu săruri cuaternare de amoniu asupra tulpinilor microbiene de referință .....	84
4.2. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu extractanți care conțin săruri de fosfoniu .....	86
4.2.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CE: sare de fosfoniu .....	86
4.2.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu asupra tulpinilor microbiene de referință .....	89
4.3. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cu sulf și azot.....	90
4.3.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CE: săruri cu sulf și azot .....	90
4.3.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot asupra tulpinilor microbiene de referință .....	92
CONCLUZII .....	93
CAPITOLUL 5. APLICAȚII MICROBIOLOGICE ALE CHITOSANULUI FUNCȚIONALIZAT	95
5.1. Materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului cu săruri cuaternare de amoniu .....	95
5.1.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: săruri cuaternare de amoniu ..	95
5.1.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu asupra tulpinilor de referință .....	99
5.2. Materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu .....	103
5.2.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: sare de fosfoniu .....	103
5.2.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH-săruri de fosfoniu asupra tulpinilor de referință .....	106
5.3. Materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot.....	107
5.3.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: sare cu sulf și azot .....	107
5.3.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot asupra tulpinilor de referință .....	109
CONCLUZII .....	111
CAPITOLUL 6. CONCLUZII FINALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE .....	113
6.1. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE asupra unui inocul heterotrof .....	116
6.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH asupra unui inocul heterotrof .....	120
6.3. Efectul antimicrobian al materialelor asupra tulpinilor de referință. Prezentare comparativă. ....	124
BIBLIOGRAFIE .....	130

## NOTAȚII. ABREVIERI. ACRONIME

**AES** - spectroscopie electronică Auger;  
**AFM** - microscopie de forță atomică;  
**ATCC** - American Type Culture Collection;  
**BC** - celuloza bacteriană;  
**BET** - Brunauer, Emmett, Teller;  
**C1** - poziția carbonului la care este grefată gruparea hidroxil a carbonului anomerice;  
**C2** - grupărilor amino;  
**C3** - poziția carbonului la care este grefată gruparea hidroxil cu activitate secundară;  
**C6** - poziția carbonului la care este grefată gruparea hidroxil cu activitate principală;  
**CE** - celuloză;  
**CH** - chitosan;  
**CMPO** - oxid octil(fenil)-N,N-di-sobutilcarboil-metil-fosfină;  
**CNT** - nanotuburi de carbon;  
**DA** - gradul de acetilare;  
**DD** - gradul de deacetilare;  
**DDS** - sisteme de livrare a medicamentelor (drug delivery systems);  
**DDTMABr** - bromură de dodecil-trimetil-amoniu;  
**DDTPPBr** - bromură de dodecil-trifenil-fosfoniu;  
**DEA, DETA** - analiză termică dielectrică;  
**DEHPA** - acid bis(2-etilhexil) fosforic;  
**DLS** - spectroscopie de corelație fonică (Dynamic light scattering);  
**DMDBDMA** - dimetil-dibutil-tetradecil-1,3-malon-amidă;  
**DP** - grad de polimerizare;  
**DSC** - calorimetrie cu scanare diferențială;  
**DTA** - analiză termică diferențială;  
**EDX, EDS** - spectrometrie de raze X cu dispersie de energie;  
**EELS** - spectroscopie cu pierderi de energie electronică;  
**EHPNA** - 2-etilhexil hidrogen pofsonat;  
**EPR, ESR** - rezonanță paramagnetică a electronilor/spin;  
**FIM** - microscopie ionică cu emisie de câmp;  
**FT-IR** - spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier;  
**GO** - oxid de grafen;  
**GPC** - cromatografie prin permeație pe gel;  
**GtO** - oxidul de grafit;  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - peroxid de hidrogen;  
**HDTBPBr** - bromură de tri n-butil-hexadecil-fosfoniu;  
**HDTMACI** - clorură de hexadecil-trimetil-amoniu;  
**HMw** - masă moleculară mare;  
**HPC** - hidroxilpropil celuloza;  
**IET** - tehnica excitației impulsurilor;  
**LMw** - masă moleculară mică;  
**MO** - probă martor;  
**M1** - probă care conține suport nefuncționalizat;  
**MALDI-TOF** -spectrometrie de masă cu ionizare termică;  
**MBS** - spectroscopie Mössbauer;  
**MBT** - mercaptobenzotiazol;  
**MCC** - celuloza microcristalină;  
**MFC** - celuloza microfibrilată;

**MRSA** - *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină;  
**NCC, CNC** - celuloza nanocristalină;  
**NTG** - număr total de germeni;  
**PCA** - analiza componentelor principale;  
**PCM** - materiale cu schimbare de fază;  
**PL** - fotoluminescență;  
**PMMA** - poli(metil metacrilat);  
**RBS** - spectroscopie cu retrodifuziune Rutherford;  
**rGO** - oxid de grafen redus;  
**RMN** - spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară;  
**ROS** - specii reactive de oxigen;  
**SANS** - metoda împrăștirii neutronilor lenți;  
**SAXS** - metoda împrăștirii a razelor X lente;  
**SEM** - microscopie electronică de scanning;  
**SIMS** - spectrometrie de masă cu ioni secundari;  
**SIR** - rășina impregnată cu solvent;  
**SPM** - microscopie cu sondă de scanare;  
**STM** - microscopie de scanare cu efect tunel;  
**SWCNT** - nanotuburi de carbon cu un singur perete;  
**TBP** - tributilfosfat;  
**TDTMABr** - bromură de tetradecil-trimetil-amoniu;  
**TEM** - microscopia electronică cu transmisie;  
**TGA** - analiza termogravimetrică;  
**Thio** - tiouree;  
**TL** - termoluminescență;  
**TOPO** - oxid trioctilfosfin;  
**UFC<sub>control</sub>** - numărul de colonii de pe placa de control;  
**UFC<sub>test</sub>** - numărul de colonii de pe placa de testat;  
**UHMWPE** - polietilenă cu greutate moleculară ultra mare;  
**UV-VIS** - spectroscopie ultraviolet-vizibil;  
**XPCS** - spectroscopie de corelare a fotonilor cu raze X;  
**XPS** - spectroscopia fotoelectronilor cu raze X;  
**XRD** - difracția cu raze X;  
**XRF** - fluorescență de raze x ;  
**XRT** - topografie cu difracție de raze X.



## LISTA DE TABELE

- Tabelul 1.1.** Caracteristicile materialelor anorganice structurate;
- Tabelul 1.2.** Caracteristicile materialelor organice dopate cu materiale anorganice;
- Tabelul 3.1.** Proprietăți ale bromurii de dodecil-trimetil-amoniu, DDTMABr;
- Tabelul 3.2.** Proprietăți ale bromurii de tetradecil-trimetil-amoniu, TDTMABr;
- Tabelul 3.3.** Proprietăți ale clorurii de hexadecil-trimetil-amoniu, HDTMACl;
- Tabelul 3.4.** Proprietăți ale bromurii de dodecil-trifenil-fosfoniu, DDTPPBr;
- Tabelul 3.5.** Proprietăți ale bromurii de tributil-hexadecil-fosfoniu, HDTBPBr;
- Tabelul 3.6.** Proprietăți ale 2-mercaptobenzotiazolului, MBT;
- Tabelul 3.7.** Proprietăți ale tioureei;
- Tabelul 3.8.** Benzile FT-IR specifice grupărilor în CE și în materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți;
- Tabelul 3.9.** Valorile ariei suprafeței specifice, diametru porilor și volumul total al porilor pentru CE și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți;
- Tabelul 3.10.** Benzile IR specifice grupărilor prezente în CH și în materialele obținute prin funcționalizarea CH cu extractanți;
- Tabelul 3.11.** Valorile ariei suprafeței specifice, diametru porilor și volumul total al porilor pentru CH și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu diferiți extractanți;
- Tabelul 4.1.** Influența raportului CE: săruri cuaternare de amoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu;
- Tabelul 4.2.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu;
- Tabelul 4.3.** Influența raportului CE:sare de fosfoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu;
- Tabelul 4.4.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu;
- Tabelul 4.5.** Influența raportului CE:săruri cu sulf și azot în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot;
- Tabelul 4.6.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot;
- Tabelul 5.1.** Influența raportului CH: săruri cuaternare de amoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu;
- Tabelul 5.2.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene, în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu;
- Tabelul 5.3.** Influența raportului CH:sare de fosfoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu;
- Tabelul 5.4.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu;
- Tabelul 5.5.** Influența raportului CH: sare cu sulf și azot în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot;
- Tabelul 5.6.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene, în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot.

## LISTA DE FIGURI

- Figura 1.1.** Clasificarea materialelor cu activitate antimicrobiană;
- Figura 1.2.** Structura moleculară a celulozei;
- Figura 1.3.** Aplicații ale celulozei;
- Figura 1.4.** Deacetilarea chitinei pentru formarea chitosanului;
- Figura 1.5.** Structura chitosanului;
- Figura 1.6.** Poziția grupărilor reactive pe scheletul moleculei de chitosan;
- Figura 1.7.** Aplicații ale chitosanului;
- Figura 1.8.** Factori care influențează activitatea antibacteriană a celulozei;
- Figura 1.9.** Factori care influențează activitatea antibacteriană a chitosanului;
- Figura 1.10.** Influența pH-ului asupra solubilității chitosanului;
- Figura 2.1.** Principiul de bază al metodei SIR (Solvent Impregnated Resin);
- Figura 2.2.** Cavitația acustică cauzată de undele ultrasonice;
- Figura 2.3.** Rotavapor;
- Figura 2.4.** Evaporare în tub;
- Figura 2.5.** Evaporarea centrifugală;
- Figura 2.6.** Prezentarea schematică a investigației unui material;
- Figura 3.1.** Structura celulozei;
- Figure 3.2.** Structura chitosanului;
- Figura 3.3.** Structura chimică a bromurii de dodecil-trimetil-amoniu, DDTMABr;
- Figura 3.4.** Structura chimică a bromurii de tetradecil-trimetil-amoniu, TDTMABr;
- Figura 3.5.** Structura chimică a clorurii de hexadecil-trimetil-amoniu, HDTMACl;
- Figura 3.6.** Structura chimică a bromurii de dodecil-trifenil-fosfoniu, DDTPPBr;
- Figura 3.7.** Structura chimică a bromurii de tri-n-butyl-hexadecil-fosfoniu, HDTBPBr;
- Figura 3.8.** Structura chimică a 2-mercaptobenzotiazolului, MBT;
- Figura 3.9.** Structura chimică a tioureei, Thio;
- Figura 3.10.** Schema procesului de obținere a materialelor;
- Figura 3.11.** Pregătirea cutiilor Petri pentru inoculare (sterilizare)
- Figura 3.12.** Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei și testate în plăci Petri cu inocul heterotrof;
- Figura 3.13.** Materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului și testate în plăci Petri cu inocul heterotrof;
- Figura 3.14.** Pregătirea probelor pentru inoculare cu tulpini de referință : a) Densitometru - concentrație McFarland; b) Tulpini de referință ATCC; c) Candida parapsilosis; d) Pseudomonas aeruginosa; e) Escherichia coli; f) Staphylococcus aureus;
- Figura 3.15.** Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof și incubate
- Figura 3.16.** Materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof și incubate;
- Figura 3.17.** Materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof după 48 h;
- Figura 3.18.** Imagini obținute cu numărătorul automat de colonii YUL Flash&Go pentru materialele obținute prin funcționalizarea chitosanului, testate în plăci Petri cu tulpini de referință;
- Figura 3.19.** Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof și incubate;
- Figura 3.20.** Imagini obținute cu numărătorul automat de colonii YUL Flash&Go pentru materialele obținute prin funcționalizarea celulozei, testate în plăci Petri cu tulpini de referință;
- Figura 3.21.** Microscopie electronică de scanning, SEM la magnificația de 2000 X și dispersie de energie de raze X, EDX pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți;
- Figura 3.22.** Spectre FT-IR pentru CE și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți

- Figura 3.23.** Microscopie electronică de scanning, SEM la magnificația de 2000 X și dispersie de energie de raze X, EDX pentru CH și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu diferiți extractanți;
- Figura 3.24.** Spectre FT-IR pentru CH și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu diferiți extractanți;
- Figura 4.1.** Comparatie între proba martor (M0) – CE nefuncționalizată (M1)- materiale CE-DDTMABr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 4.2.** Comparatie între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materiale CE-TDTMABr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 4.3.** Comparatie între proba martor (M0) – CE nefuncționalizată (M1)- materiale CE-HDTMACl la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 4.4.** Comparatie conformeri, extractanți săruri cuaternare de amoniu;
- Figura 4.5.** Comparatie între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-DDTPPBr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 4.6.** Comparatie între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-HDTBPBr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 4.7.** Comparatie între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-MBT la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 4.8.** Comparatie între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-Thio la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 5.1.a.** Cultură bacteriană martor (M0);
- Figura 5.1.b.** Probă control – CH nefuncționalizat (M1);
- Figura 5.2.** Comparatie între proba martor (M0) - CH nefuncționalizat (M1) – materialul CH-DDTMABr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 5.3.** Comparatie între proba martor (M0) - CH nefuncționalizat (M1)- materialul CH-TDTMABr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 5.4.** Comparatie între proba martor (M0) - CH nefuncționalizat (M1)- material CH-HDTMACl la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 5.5.** Diferențe între peretele celular la bacteriile Gram-negative și Gram-pozitive;
- Figura 5.6.** Comparatie între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- materialul CH-DDTPPBr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 5.7.** Comparatie între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- CH:HDTBPBr la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 5.8.** Conformeri stabili pentru sărurile de fosfoniu;
- Figura 5.9.** Comparatie între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- CH:MBT la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 5.10.** Comparatie între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- materialul CH-Thio la diferite rapoarte de funcționalizare;
- Figura 6.1.** Structura chitosanului și celulozei;
- Figura 6.2.** Modul de obținere și testare microbiologică a materialelor;
- Figura 6.3.** Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu;
- Figura 6.4.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu;
- Figura 6.5.** Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu;
- Figura 6.6.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu;
- Figura 6.7.** Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot;
- Figura 6.8.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot;
- Figura 6.9.** Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu;
- Figura 6.10.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu;

- Figura 6.11.** Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu;
- Figura 6.12.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu;
- Figura 6.13.** Numărul unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot;
- Figura 6.14.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot;
- Figura 6.15.** Rata de inhibiție a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- Figura 6.16.** Rata de inhibiție a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
- Figura 6.17.** Rata de inhibiție a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Escherichia coli* ATCC 25922;
- Figura 6.18.** Rata de inhibiție a creșterii bacteriene a materialelor asupra *Candida albicans* ATCC 10231; (materialele obținute prin funcționalizarea CE) / *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (materialele obținute prin funcționalizarea CH)

## INTRODUCERE

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 polimerilor naturali au câștigat un impuls semnificativ, conduse de „chimia verde” și principiile de sustenabilitate care sunt din ce în ce mai adaptate în industrie. Caracteristicile polimerilor naturali, cum ar fi biocompatibilitatea lor, rata de degradabilitate proiectată cu precizie, procesabilitatea termică, rezistența relativ ridicată, toxicitatea scăzută, cristalinitatea controlată și hidrofilitatea au făcut polimerii naturali 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 inhibiția 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 polimeri naturali precum 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 polimeri naturali 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, cu rol de suport.

Scopul acestei teze de doctorat este de a „dezvolta lumea materialelor naturale” 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 cu titlul: **„Noi materiale cu proprietăți antimicrobiene dirijate, derivate din polimeri naturali”** este structurată în 2 părți, 6 capitole.

Pornind de la faptul că materialele naturale disponibile pentru o gamă largă de aplicații sunt reprezentate în general de către polizaharide și acestea pot avea activitate antimicrobiană – cazul chitosanului și al celulozei, însă, pentru a prezenta proprietăți specifice, s-au obținut **135 materiale** prin funcționalizarea prin impregnare, prin metoda SIR (Solvent Impregnated Resin), a **chitosanului și a celulozei** cu **săruri cuaternare de amoniu** (bromură de dodecil-trimetil-amoniu (DDTMABr), bromură de tetradecil-trimetil-amoniu (TDTMABr), clorură de hexadecil-

trimetil amoniu (HDTMACI)), **săruri de fosfoniu** (bromură de dodecil-trifenil fosfoniu (DDTPPBr), bromură de tri n-butil-hexadecil fosfoniu (HDTBPBr)) și **săruri cu sulf și azot** (tiouree (Thio), mercaptobenzotiazol (MBT)).

Materialele obținute au fost caracterizate prin metode fizico-chimice precum: spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR, microscopie electronică de scanning, SEM și spectrometrie de raze X cu dispersie de energie, EDX. De asemenea, a fost determinată suprafața specifică prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller).

Studiile microbiologice au fost realizate atât pe inocul bacterian heterotrof, cât și pe tulpini specifice aparținând American Type Culture Collection (ATCC), stabilindu-se activitatea antimicrobiană (număr de colii bacteriene, rata de inhibiție etc.). Pentru a pune în evidență efectele asupra bacteriilor Gram-negative studiile au fost efectuate pe materialele sintetizate care au fost însămânțate cu tulpini de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, iar pentru a pune în evidență efectele asupra bacteriilor Gram-pozitive studiile s-au realizat prin însămânțarea materialelor sintetizate cu tulpina de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pentru observarea activității antifungice a materialelor a fost utilizată tulpina de *Candida albicans* ATCC 10231 sau *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Bibliografia studiată este reprezentativă și de actualitate, ea conține 368 titluri

## PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ

### CAPITOLUL 1.

## MATERIALE CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE

### 1.1. Generalități

Proiectarea unor materiale noi cu proprietăți antimicrobiene este de mare actualitate, nu doar în scop științific, dar și datorită creșterii rezistenței microorganismelor (bacterii, virusuri, fungi) la acțiunea asupra acestora [1]. Rezistența dezvoltată de către microbi, dar și rezistența emergentă la medicamente, constituie o problemă globală majoră, considerată una dintre cele mai mari provocări, care necesită rezolvare [2]. În ziua de astăzi, acest lucru este neliniștitor pentru viața modernă, prin urmare, este de mare importanță proiectarea unor materiale noi cu proprietăți dirijate, care să „lupte” împotriva microorganismelor [1].

Materialele cu proprietăți antimicrobiene sunt compuși chimici care afectează dezvoltarea agenților microbieni, unele având capacitatea de a inhiba înmulțirea acestora (efect bacteriostatic), altele de a le distruge (efect bactericid). De asemenea, aceste materiale pot avea comportament „antifouling” sau antivegetativ, ceea ce presupune faptul că inhibă dezvoltarea bacteriilor nepermițând formarea de colonii bacteriene pe părțile umede ale corpului [1]. Materialele cu proprietăți biocide nu numai căucid agenții patogeni, dar sunt și utile pentru dezinfecția generală [1]. Pentru a fi utile în diverse aplicații medicale, materialele cu proprietăți antimicrobiene trebuie să fie biocompatibile, în special să nu fie dăunătoare pentru celulele mamiferelor [1].

Dintre diversele tipuri de materiale cu proprietăți antimicrobiene, se remarcă **materialele pe bază de polimeri**, datorită caracteristicilor lor unice [1]. Materialele polimerice cuprind clase foarte largi de compuși, precum compuși naturali sau compuși sintetici, organici (în mare parte) și/sau anorganici, care prezintă o varietate extraordinară de proprietăți [3]. Materialele pe bază de polimeri pot fi compuse din unul sau mai multe elemente metalice, care se găsesc în cantități relativ mici, (de exemplu: Fe, Ni, Al, Cu, Zn sau Ti) și adesea și elemente nemetalice (de exemplu: C, N sau O) [3]. Astfel de materiale, care conțin diverse aliaje, au aplicații medicale, cum ar fi în stomatologie, pentru obținerea amalgamelor dentare, a șuruburilor de fixare sau în cardiologie pentru obținerea stimulatoarelor cardiace, a stenturilor coronariene sau în ortopedie pentru construcția dispozitivelor corective ale coloanei vertebrale, din oțeluri inoxidabile sau a protezei de înlocuire totală a șoldului construită din aliaje pe bază de cobalt [3]. Polimerii și derivații polimerici cu proprietăți antimicrobiene intrinseci prezintă un interes mare pentru dezvoltarea unor antibiotice noi, atât pentru a combate tendința de creștere a rezistenței antimicrobiene a microorganismelor, cât și pentru a găsi materiale utile pentru tratamentul infecțiilor patogene cu mai multe caracteristici specifice [1].

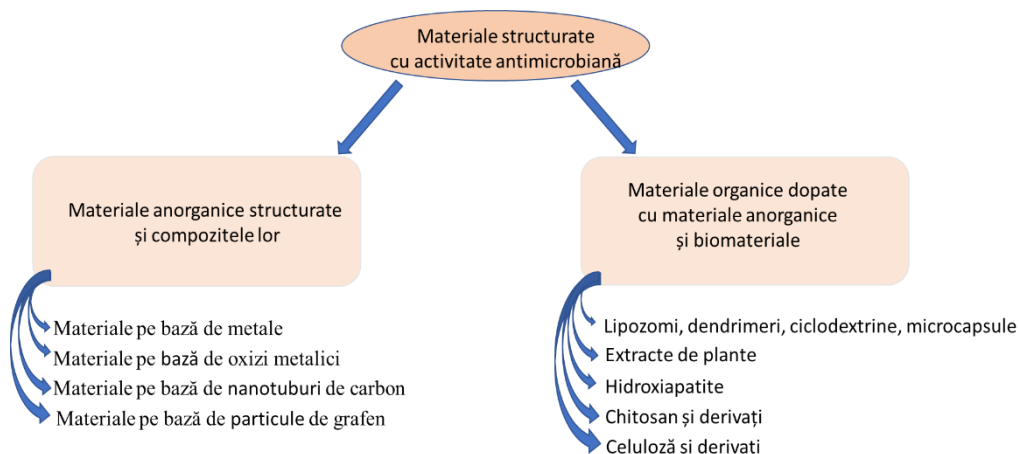
O altă categorie de materiale cu potențial efect antimicrobian o reprezintă **materialele ceramice**, care cuprind o varietate de compuși anorganici metalici și

nemetalici, incluzând oxizi (de exemplu:  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  și  $\text{ZrO}_2$ ), nitruri (de exemplu:  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), carburi (de exemplu:  $\text{SiC}$ ) și diverse săruri (de exemplu:  $\text{NaCl}$  și  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Materialele ceramice sunt în general izolatori electrici și termici ca urmare a absenței unui număr mare de electroni de conducție [3]. De asemenea, materialele ceramice au aplicații și în domeniul dispozitivelor biomedicale, cum ar fi în oftalmologie, pentru a realiza ochelarii corectori, în stomatologie pentru dinții implantabili sau în ortopedie pentru construcția materialelor ceramice utilizate ca umplutură osoasă sau ca și capete de proteze totale de șold [3].

Pentru a utiliza diverse proprietăți ale materialelor de bază, s-au dezvoltat diverse materiale compozite, astfel realizându-se o combinație de proprietăți care nu sunt specifice niciunui material singular, avantajele fiecărui material component fiind reunite, iar dezavantajele fiind minimizate. Există un număr mare de tipuri de compozite sintetice, a căror domeniu de aplicare este foarte vast, aplicațiile medicale fiind cel mai des întâlnite [3]. În acest sens pot fi obținute diverse materiale structurate, pe bază de compuși organici sau anorganici, a căror proprietăți sunt modelate funcție de utilizarea dorită.

Multe dintre materialele structurate pe bază de compuși anorganici sau organici prezintă activitate antimicrobiană bună. Funcție de tipul de material care stă la baza acestor compuși, o clasificare sugestivă este prezentată în Figura 1.1, în două clase principale:

1. Materiale anorganice structurate și compozitele lor;
2. Materiale organice dopate cu grupări anorganice și biomateriale;



**Figura 1.1.** Clasificarea materialelor cu activitate antimicrobiană

**Materialele anorganice structurate** includ materiale pe bază de elemente metalice (argint, aur, cupru, galiu), oxizi metalici (dioxid de titan, oxid de zinc, oxid de magneziu, oxizi de fier), nanotuburi de carbon, argilă nano-stratificată și nanocompozite ale acestora. **Materialele organice dopate cu materiale anorganice** includ ciclodextrine, lipozomi, dendrimeri, fiecare dopați cu nanocompozite metalice sau alte nanoparticule anorganice [4]. **Materialele naturale** cu activitate antimicrobiană au proveniență diversă, unele fiind cunoscute încă din antichitate: (extracte din plante), altele reprezintă componenta fibroasă a tuturor celulelor vegetale (celuloza) sau au fost obținute din exoscheletul unor animale marine



(chitosan). Ulterior au fost descoperite și alte biomateriale capabile de efect antimicrobian, generate de microorganisme ca un produs secundar al ciclurilor lor biochimice, de exemplu celuloza bacteriană [5]. Sursele lor sunt abundente și, în general, destul de ieftine. Deși unele biomateriale prezintă activitate antimicrobiană intrinsecă (chitosanul), aceasta poate fi modulată prin grefarea unor grupări active astfel încât să li se îmbunătățească proprietățile (derivați de chitosan, derivați de celuloză) [6-11], altele manifestă efect antimicrobian doar în urma funcționalizării cu grupări care să imprime acest efect (spre exemplu celuloza și derivații acesteia).

În ultimii ani, microorganismele rezistente la medicamente reprezintă o problemă gravă pentru sănătatea publică. Este necesară abordarea unor noi strategii de control al activității bacteriilor, iar materialele/nanomaterialele cu proprietăți dirijate pot fi o abordare promițătoare, deoarece dimensiunea particulei oferă mari dimensiuni ale suprafeței și în consecință reactivitatea (și în multe cazuri toxicitatea) crește substanțial.

## 1.2. Materialele anorganice structurate

Încă din cele mai vechi timpuri au fost studiate și utilizate diverse particule metalice pentru a lupta împotriva infecțiilor. **Argintul** a fost printre primii agenți antimicrobieni cunoscuți, a cărui proprietăți antibacteriene și multifuncționale sunt intens studiate și astăzi [12-19].

Au fost utilizate diverse metode pentru obținerea acestor particule, precum reducerea foto-catalitică [20], procedee de reducere chimică [21], procedee foto-chimice sau reducere chimică în prezența UV, procedee sono-chimice [13], fotoreducere [22], fiind chiar sintetizate prin metode biologice [23-27].

Argintul este un agent antimicrobian mai sigur în comparație cu unii agenți organici antimicrobieni [28], care au fost evitați din cauza riscului și a efectelor nocive ale acestora asupra organismului uman [29]. Totodată este un metal „oligodinamic” datorită capacității sale de a exercita efect bactericid, dar în principal datorită activităților sale antimicrobiene și toxicității sale scăzute pentru celulele umane [30]. Proprietatea sa terapeutică a fost dovedită împotriva unei game largi de microorganisme [31, 32], chiar și la concentrații scăzute [14]. Mecanismul său antimicrobian poate fi explicat prin interacțiunea dintre ionii metalici care trec prin membrana celulară și se leagă de grupările -SH ale enzimelor celulare [33]. Scăderea activității enzimatice determină modificarea metabolismului microorganismelor și inhibă creșterea lor, până la moartea celulei. Ionii de  $Ag^+$  catalizează producerea de radicali de oxigen (ROS-radical oxygen species) care oxidează structura moleculară a bacteriilor, prin urmare este inhibată multiplicarea microorganismelor [28, 34].

De asemenea, a fost dovedită proprietatea argintului pentru a preveni formarea de biofilm [35]. Particulele de argint sunt cunoscute și pentru faptul că sunt un dezinfectant non-toxic [36-38].

Investigarea bio-intoxicării cu argint a arătat faptul că particulele de argint de dimensiuni mai mici sunt mai puțin toxice pentru piele decât cele cu dimensiuni mari la același nivel de concentrație [39].

da Silva Paula et al. au raportat influența antibacteriană a nanoparticulelor de argint introduse în copolimerul polistiren-acid acrilic. Autorii consideră faptul că grupările carboxilice ale acidului acrilic duc la o mobilitate ionică crescută în copolimer, ceea ce determină activitatea antibacteriană îmbunătățită [40]. Fernández și colab. au dezvoltat nanoparticulele de argint pe fibre de celuloză utilizate apoi ca material absorbant. Producerea nano-firelor de argint a fost extinsă de Sun și colab. [41], Ilic și colab. descriind eficiența antifungică a țesăturii din poliester și poliamidă pretratate

cu nanoparticule de Ag [42]. Eficiența antibacteriană a compozitului Ag/SiO<sub>2</sub> încărcat pe fibre de lână a fost investigat de Wang et al. [43]. Oh și colab. au sintetizat de asemenea, Ag/SiO<sub>2</sub> investigând eficacitatea sa antibacteriană și antifungică [44]. Fu și colab. au produs filme compozite multistrat din heparină / chitosan / nanoparticule de argint pentru aplicații bio-medicale [45]. Jeong și colab. au sintetizat un compozit pe bază de argint-sulf observând faptul că adăugarea sulfului sporește proprietățile antibacteriene și stabilitatea ionilor de argint. Ei au subliniat faptul că materialul pe bază de argint-sulf este netoxic, deși sulful este un agent toxic [32]. Liu et. al. au constatat faptul că materialul obținut în urma adsorbției nanoparticulelor de argint pe hidroxiapatită, prezintă bio-activitate ridicată [46]. Învelișul compozit hidroxiapatit / argint a fost conceput și ulterior utilizat în special pentru reducerea infecțiilor bacteriene după plasarea unui implant [47].

Acestea sunt doar câteva din utilizările materialelor pe bază de argint în care au fost subliniate proprietățile antimicrobiene.

**Alte particule de metal** cunoscute ca având aplicație biomedicală sunt cele de aur. Eficacitatea lor antibacteriană puternică împotriva acneei, faptul că sunt fără toleranță la antibiotice și s-au dovedit a fi conservanți naturali, au determinat utilizarea în industria săpunului și cosmetică [48-51]. Zhang și colab. au propus materiale cu particule de aur pentru inhibiția creșterii și multiplicarea diferiților microbi, în mod eficient împotriva bacteriilor Gram-pozitive, Gram-negative și împotriva fungilor [51]. Grace și Pandian au utilizat particulele de aur ca nucleu purtător, acoperit cu antibiotice precum streptomycină, gentamicina și neomicină. Rezultatul lor a demonstrat faptul că materialele pe bază de compozite de aur au o eficiență antibacteriană intensă împotriva diferitelor bacterii Gram-negative și Gram-pozitive. Au ajuns la concluzia cum că particulele metalice de aur pot modifica calea metabolizării și este influențat mecanismul de eliberare a medicamentelor asupra celulelor bacteriene. Prin urmare, se poate obține o eficiență antibacteriană mai bună ca urmare a eficienței puternice a materialelor compozite pe bază de aur/medicament [50].

**Particule de cupru** au fost încorporate în particule submicronice de sepiolit ( $Mg_8Si_{12}O_{30}(OH)_4 \cdot 8H_2O$ ), obținând materiale compozite cu proprietăți antibacteriene comparabile cu triclosanul (antibacterian chimic care se găsește în pasta de dinți și alte produse cosmetice) [52]. Cubillo și colab. au raportat proprietăți bactericide puternice atât pentru compozit, cât și pentru triclosan [52]. Cu toate acestea, observația lui Pape et al. a confirmat faptul că activitatea antibacteriană a particulelor de cupru este în mod clar mai mică decât cea a particulelor de argint [39].

Valappil și colab. au investigat proprietățile antibacteriene ale materialelor compozite pe bază de **particule de galiu** obținând eficiență antibacteriană și un bun potențial terapeutic pentru bacteriile patogene, inclusiv MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) și *Clostridium difficile* [53].

Dintre agenții anorganici cu capacitate dovedită de acțiune antimicrobiană sunt **materialele pe bază de particule de oxizi metalici**.

Au fost investigați numeroși oxizi metalici, în prezent **particulele de TiO<sub>2</sub>** având o nouă abordare pentru aplicații remarcabile ca material multifuncțional atractiv. Particulele de TiO<sub>2</sub> au proprietăți unice, cum ar fi stabilitate mare, iar din punct de vedere medical au antibioză de lungă durată, sigură și cu spectru larg [54-57]. Particulele de TiO<sub>2</sub> au fost în centrul atenției mai ales pentru aplicații fotocatalitice [58-66]. Acest lucru face particulele de TiO<sub>2</sub> aplicabile în multe domenii, cum ar fi agent de autocurățare, agent antibacterian, agent de protecție UV [67], pentru purificarea apei și aerului [68-70] senzori de gaz și celule solare de înaltă eficiență.

Particulele de  $\text{TiO}_2$  au fost utilizate în diverse studii pentru a obține protecție antibacteriană [56, 71, 72]. Zhao și colab. au prezentat faptul că adăugarea unei cantități optime de hidroxil-propil-celuloza (HPC) în timpul sintezei particulelor de  $\text{TiO}_2$  poate îmbunătăți hidrofilitatea și activitatea fotocatalitică a  $\text{TiO}_2$  [73]. Hsieh și colaboratorii au studiat caracterul anti-UV și alte proprietăți fizice ale compozitului  $\text{TiO}_2$ /chitosan [74]. A fost studiată producția de nanocompozite  $\text{Pt/TiO}_2$  [75],  $\text{TiO}_2$ /chitosan [74],  $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$  [76], nanotuburi de carbon (CNT)/ $\text{TiO}_2$  [77, 78],  $\text{TiO}_2$ /hidroxiapatită [79] etc.

Activitatea bactericidă a  $\text{TiO}_2$  se pare că depinde de eliberarea treptată a ionilor de titan. Un mecanism de bacteriostază este hidroxilarea în componente foarte reactive, cum ar fi HCl, HOCl, TiOH, peroxid de hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sau superoxid ( $\text{O}_2^-$ ), deoarece acestea provoacă oxidarea membranelor celulare bacteriene, ducând la creșterea permeabilității celulare și în cele din urmă la moartea celulei.

De asemenea, **oxidul de zinc**, a fost considerat extrem de atractiv datorită potențialului remarcabil de aplicare în celule solare, senzori, afișaje, dispozitive piezoelectrice, traductoare electro-acustice, fotodiode și dispozitive care emit lumină UV, ecrane solare, senzori de gaz, materiale absorbante de radiații UV, acoperiri anti-reflex, foto-cataliză, catalizator, agent antimicrobian [80-90].

Li și colaboratorii au investigat activitatea antibacteriană a unei țesături din bumbac funcționalizată cu particule de ZnO, în prezența transpirației, materialul dovedind performanțe antibacteriene suficient de bune [91]. Particulele de ZnO au fost utilizate pentru producere unui compozit cu rășina acrilică, care a dovedit proprietăți antibacteriene bune împotriva *S.aureus* [90]. Xu și Cai [92] au dopat țesătura de bumbac cu nanotije de ZnO punând în evidență caracterul antimicrobian al compozitului.

**Particulele de MgO** prezintă activitate bactericidă, împotriva bacteriilor atât Gram-pozitive, cât și Gram-negative, virusurilor și fungilor. Avantajul particulelor de MgO în comparație cu alte particule de oxid de metal este faptul că, poate fi preparat din precursori și solvenți disponibili și economici. Mg(II) poate fi utilizat în diferite materiale sub formă de oxizi, MgO sau halogenuri,  $\text{MgX}_2$ , de ex.  $\text{MgF}_2$  [93]. În plus, inducerea speciilor reactive de oxigen (ROS) care conțin particule de MgO poate inhibi direct enzimele vitale ale bacteriilor. S-a descoperit că nanomaterialul  $\text{MgF}_2$  previne formarea biofilmului de *E. coli* și *S. aureus*. Testele bacteriologice standard au arătat faptul că particulele de MgO au o activitate excelentă împotriva *E.coli* și *Bacillus megaterium* și o activitate bună împotriva *Bacillus subtilis*. Bioactivitatea particulelor de MgO se datorează încărcăturii pozitive pe care o au în suspensie apoasă, opusă celei a pereților bacterieni, ceea ce sporește efectul bactericid total [94].

**Nanoparticulele de aluminiu** au o gamă largă de aplicații în produsele industriale, precum și în produsele de îngrijire personală. Ansari et al. au studiat în detaliu mecanismul de acțiune al nanomaterialului cu aluminiu asupra bacteriei *E. coli* [95]. Nu este clar dacă particulele de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  sunt adecvate pentru tratamentul antibacterian. Efectul lor bactericid este relativ slab și sunt necesare concentrații mari pentru a prezenta efect sau este necesară o combinație cu alte materiale nanostructurate, cum ar fi materiale cu argint, cupru sau ZnO.

Sadiq și colab. au studiat efectul inhibitor al particulelor de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , pe un interval larg de concentrații 10-1000  $\mu\text{g/L}$ , asupra *E. coli* [96]. Particulele de alumina au prezentat un efect ușor de inhibiție a creșterii bacteriene, doar la concentrații foarte mari și este atribuită interacțiunilor cu sarcina de suprafață dintre particule și celulele bacteriene. Este posibil ca proprietățile de captare a radicalilor liberi să fi prevenit distrugerea peretelui celular și acțiunea antimicrobiană drastică. Alumina are o structură asemănătoare corindonului și este stabilă termic pe un interval larg de

temperaturi. Alumina poartă o sarcină neutră pe suprafața sa la pH aproape neutru. Datorită interacțiunii electrostatice dintre *E. coli* (încărcate negativ) și particulele de alumina (încărcate pozitiv) are ca rezultat aderența particulelor de  $Al_2O_3$  pe suprafața celulelor bacteriene [97].

Proprietatea antimicrobiană a acestor oxizi metalici este atribuită generării de specii reactive de oxigen (ROS) care provoacă distrugerea peretelui celular și, în consecință, duce la moartea celulei [98]. Cu toate acestea, particulele de alumina pot acționa ca și captatori de radicali liberi și sunt capabile să salveze celulele de la moartea indusă de stresul oxidativ. Acest fenomen pare să fie dependent de structura particulei, dar independent de dimensiunea acesteia în intervalul 6-1000 nm [94].

**Particulele de  $Fe_3O_4$**  reprezintă o clasă suplimentară de materiale antimicrobiene care sunt utilizate în domeniul medical. Aceste materiale pot fi adaptate pentru a imprima proprietăți antimicrobiene atunci când sunt sintetizate ca particule nanodimensionate. Particulele de  $Fe_3O_4$  demonstrează proprietăți antiaderente și reduce semnificativ creșterea colonizării bacteriene atât Gram-negative, cât și Gram-pozitive. Au fost raportate a fi particule bactericide atunci când sunt funcționalizate fototermic. S-a demonstrat faptul că  $Fe_2O_3$  reduce creșterea viabilității *S. aureus*. Mecanismul antibacterian al particulelor de  $Fe_2O_3$  este legat de capacitatea particulelor de a pătrunde în interiorul celulei și de a genera specii reactive de oxigen. S-a observat faptul că o concentrație mare de particule de  $Fe_2O_3$  duce la creșterea numărului de celule moarte. Activitatea antibacteriană a fost din nou atribuită creșterii stresului oxidativ și interferenței membranei bacteriene. Potențialul zeta negativ al particulelor de  $Fe_2O_3$  și interacțiunile electrostatice minime cu sarcinile negative de suprafață ale bacteriilor explică de ce este nevoie de concentrații relativ mari de particule de  $Fe_2O_3$  pentru efect antibacterian. Particulele de  $Fe_2O_3$  prezintă un interes deosebit nu numai datorită proprietăților lor antibacteriene naturale, ci și datorită proprietăților lor super-paramagnetice. Acest lucru permite ca particulele să fie direcționate în interiorul corpului cu un câmp magnetic, eventual după acoperirea cu un anumit tip de agent antimicrobian [94].

Proprietățile extraordinare ale **nanotuburilor de carbon, (CNT)** au atras în mod constant interesul pentru cercetare [99, 100], datorită proprietăților lor speciale precum: conductivitate electrică bună [101, 102], rezistența la foc [99], protecție UV [103], creșterea confortului îmbrăcăminteii [103] rigiditate și rezistență ridicată [99, 104, 105]. Prima dovadă a activității antimicrobiene a CNT a fost raportată pentru nanotuburi de carbon cu un singur perete (SWCNT-single-walled carbon nanotubes) împotriva *E. coli* de către Kang et al. Mecanismul antibacterian al CNT se bazează pe faptul că are loc deteriorarea membranei celulare, ca urmare a contactului direct cu celulele bacteriene a CNT [106, 107].

În literatură a fost raportată prepararea materialelor compozite pe bază de CNT și  $TiO_2$  [77, 78]. Este de așteptat un efect antibacterian sinergic utilizând materialele compozite CNT/ $TiO_2$ .

**Grafenul** este utilizat pe scară largă în domeniul nanomedicinii, în special pentru biosenzori și diagnosticare. Un număr tot mai mare de studii au fost raportate cu privire la utilizarea potențială a grafenului pentru aplicațiile de livrare a medicamentelor. Oxidul de grafen (GO) este de obicei utilizat ca purtător de medicament, frecvent după modificarea suplimentară a suprafeței. Activitatea antibacteriană a grafitului (Gt), oxidului de grafen (GO), oxidului de grafit (GtO) și oxidului de grafen redus (rGO) față de *E. coli* a fost comparată de către Liu și colab. [108]. Potențialul antimicrobian a acestor materiale a scăzut în ordinea  $GO > rGO > Gt > GtO$  în condiții similare de concentrație și incubare. Nguyen și colab. au investigat

grafenu dopat cu nanoparticule de argint [109]. S-a observat faptul că particulele foarte dispersate și de diferite forme și dimensiuni au fost lipite de straturile de grafen. Aceste compozite au prezentat activități antibacteriene mai mari împotriva speciilor bacteriene precum *E. coli*, *L. anguillarum*, *S. aureus* și *B. cereus*. De asemenea, particule de argint depuse pe GO inhibă viteza de creștere pentru *P. aeruginosa* [110].

Există o multitudine de studii despre potențialul antimicrobian al compozitelor pe bază de argilă / polimer [111-130], dovedindu-se faptul că prezintă eficiență antibacteriană, efect sterilizant, dar și capacitatea de a adsorbi toxine [131].

Primele cercetări privind aplicațiile medicale ale argilei stratificate au fost înregistrate de romani în anul 60 î.Hr. Argila a fost utilizată ca și cataplasma pentru răni. Proprietățile „vindecătoare” ale argilei stratificate sunt puse pe seama absorbției fizice a apei, a bacteriilor toxice, a virusilor și a materiei organice. Elemente metalice precum argint, cupru, mangan, zinc, fier, dar și oxizi de metal, în special, dioxidul de titan pot fi asociate și cu proprietățile antibacteriene ale argilei minerale. Cu toate acestea, mecanismul chimic de interacțiune dintre argilă și bacterii nu este clar cunoscut. Efectul de vindecare al argilei stratificate este confirmat în numeroase studii de caz. Williams și colab. au observat inhibiția completă a creșterii la *E. coli* în prezența argilei stratificate [132].

Utilizarea argilei stratificate era cunoscută de la aborigeni, aceasta fiind sensibilă la bacterii patogene și rezistente la antibiotice. Haydel et al. au utilizat două minerale argiloase bogate în fier pentru a evalua fezabilitatea tratamentului cu minerale argiloase ca agenți terapeutici [133]. Seckin și colab. au extins cercetările obținând o matrice argilă-polivinil-piridiniu cu scopul de a îndepărta celulele bacteriene din apă [134]. Hu și colab. au investigat efectul antibacterian al montmorilonitului în care s-au înlocuit ioni de sodiu prezenți în compoziția de bază cu ioni de cupru [135, 136]. Magana și colab. au produs montmorilonit modificat chimic cu ioni de argint prin schimb ionic evaluând proprietățile antibacteriene [137]. Zhou și colab. au sintetizat un nanocompozit pe bază de polimer/argint-chitosan/argilă evaluând proprietățile bacteriostatice [138]. Mlynarcikova și colab. și Pavlikova și colab. au produs un material compozit pe bază de argilă și fibre de polipropilenă [113, 114].

O scurtă listă a caracteristicilor importante ale materialelor anorganice structurate este rezumată în Tabelul 1.1.

**Tabelul 1.1.** Caracteristicile materialelor anorganice structurate

<b>Materialelor anorganice structurate</b>	<b>Caracteristici</b>
Argint	Antimicrobian, dezinfectant, conductiv electric, protecție UV, antifungic
Aur	Antibacterian, antifungic, conductiv electric
Cupru	Antibacterian, protecție UV, conductiv electric
Galiu	Antibacterian
TiO <sub>2</sub>	Antibacterian, fotocatalizator, autocurățare, protecție UV, purificator pentru apă și aer, degradare coloranți, senzor de gaz, celulă solară
ZnO	Antibacterian, blocant UV, fotocatalizator
MgO	Antibacterian, antiviral, antifungic
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Antibacterian
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Antibacterian, paramagnetic

- Continuare **Tabel 1.1.** -

<b>Materialelor anorganice structurate</b>	<b>Caracteristici</b>
Grafen	Antibacterian, biosenzor
CNT- nanotuburi de carbon	Antimicrobian, conductiv electric, ignifug, antistatic, absorbant
Argile stratificate	Antibacterian, ignifug, absorbant UV

### 1.3. Materiale organice

Materialele precum lipozomii, ciclodextrinele, dar și dendrimerii pot încapsula diverse molecule organice, anorganice sau biologice obținându-se materiale cu proprietăți antibacteriene performante.

Lipidele amfifile sub formă de vezicule sferice cu dimensiuni coloidale, dispersate în apă, formate dintr-un strat dublu de molecule de surfactant (fosfolipide) se numesc **lipozomi**. Din cauza structurilor lor amfifile, aceștia pot transporta atât materiale hidrofobe, cât și hidrofile. Lipozomii au fost utilizați în sistemele de eliberare controlată a medicamentelor (DDS-drug delivery systems) [139, 140]. Mărimea lipozomilor se modifică în intervalul de nanometri până la macrometri [141]. Se pare că, încapsularea în structura lipozomilor a unor săruri anorganice de aur prezintă activitate bacteriană acționând prin eliberare controlată. În cazul modificării activității antibacteriene, straturile de fosfolipide pot acționa ca nutrient pentru a crește activitatea bacteriană [4].

**Dendrimerii** sunt o clasă de compuși macromoleculari monodispersi [142-144], care pot acționa ca nanoreactoare cu capacitatea de preorganizare a elementelor metalice [145, 146]. Dispersia atomică / moleculară a grupării anorganice prezente în structura unui dendrimer va prezenta proprietăți fizice și chimice unice. Sărurile dendrimer-carboxilat pot fi dopate cu argint aflat în concentrații mari, ca urmare a unui număr mare de grupări de suprafață, active. Prin urmare, acestea pot constitui cale de livrare la nivel nanoscopic ca urmare a dopării cu concentrații variabile de materiale bioactive precum metale și ioni metalici [4].

Lipozomii și dendrimerii pot fi astfel utilizați pentru depozitarea, transportul și livrarea grupărilor active în scopuri diferite [147]. O tehnologie inovatoare de nano-încapsulare pentru a obține o eficiență antimicrobiană permanentă pe țesăturile din bumbac a fost prezentat de Compania Ciba. Produsele comerciale bazate pe acest concept sunt acum disponibile sub eticheta Ciba Tinosan CEL [148].

În general, pentru atingerea unor performanțe prin combinarea proprietăților a cel puțin două materiale, se sintetizează diverși compuși sub formă de capsule. Acestea sunt compuse dintr-un înveliș alcătuit din polimeri sintetici și un miez care include materiale adecvate precum diferiți agenți activi, catalizatori, vitamine, medicamente, materiale bioactive, proteine și materiale cu schimbare de fază (PCM-uri-phase change materials). Agentul încărcat este dispersat în miezul capsulei, în partea sa centrală. Așa au încapsulat cu succes Shim și colab. nanoparticulele de oxid de zinc (ZnO) în polimetacrilatul de metil (PMMA) pentru a-i controla proprietățile [149]. Pe această tehnologie de producere a capsulelor se bazează industria farmaceutică, pentru obținerea unor medicamente cu eliberare prelungită sau a celor gastrorezistente.

**Ciclodextrinele** sunt o familie de oligozaharide ciclice compuse din subunități de glucopiranoză legate  $\alpha$ -1,4, utile ca agenți de complexare moleculară [150]. Sunt produse în timpul procesului de distrugere a amidonului prin degradare enzimatică

[151-153]. Cea mai notabilă caracteristică a ciclodextrinelor este capacitatea lor de a forma complexări moleculare cu o gamă largă de solide, lichide și compuși gazoși, cu scopul de a fi utilizate în eliberarea controlată a moleculelor active [152-168]. Deoarece țesăturile sunt în contact direct cu pielea umană, a fost studiată specificația toxică a ciclodextrinei. Rezultatele indică faptul că pot fi dăunătoare organismului uman în concentrații mari [151]. Martel și colab. au concluzionat faptul că a avut loc doparea prin formarea unui copolimer reticulat între componențel principal, PCA (principal component analysis) și ciclodextrine [162]. Montazer și colab. au dopat de asemenea  $\beta$ -ciclodextrina cu diclofenac de sodiu pentru pansamentul plăgilor [162].

O sumarizare a caracteristicilor importante ale materialelor organice dopate cu materiale anorganice este prezentată în Tabelul 1.2.

**Tabelul 1.2.** Caracteristicile materialelor organice dopate cu materiale anorganice

<b>Materialelor organice dopate cu substanțe anorganice</b>	<b>Caracteristici</b>
Lipozomi cu săruri anorganice de aur	Sistemele de eliberare controlată a medicamentelor
Lipozomi, dendrimeri	Nanoreactoare, depozitare, transport și livrare a grupărilor active
Săruri dendrimer-carboxilat dopate cu argint	Cale de livrare la nivel nanoscopic
Ciclodextrine	Agenți de complexare moleculară și pentru eliberarea controlată a moleculelor active
Ciclodextrină dopată cu diclofenac de sodiu	Pansamentul rănilor

O categorie aparte de materiale organice o reprezintă **biomaterialele**. Materialele naturale sau sintetice utilizate pentru a susține sau prelua complet funcția țesuturilor vii sau pentru a funcționa în strânsă legătură cu un sistem viu sunt numite *biomateriale*.

Chiar dacă studiul biomaterialelor reprezintă un domeniu interdisciplinar nou, aplicațiile acestora datează din cele mai vechi timpuri, fiind descoperite la mumiile egiptene de exemplu sub formă de ochi de sticlă, nasuri de metal sau dinți de fildeș. Implanturile din cupru au fost utilizate până la mijlocul secolului al XIX-lea din cauza lipsei unor materiale mai bune, fiind înlocuit, în cele din urmă cu oțel inoxidabil. Utilizarea aurului în stomatologie datează de 2000 de ani. Hipocrate menționează în scrierile sale despre firele de aur utilizate ca suturi. Dispozitivele obținute, în jurul anilor 1880, din oase de cadavre și fildeș au fost utilizate în ortopedie, fiind considerate tot biomateriale. Un alt exemplu ar fi, în cazul lui Sir John Charnley care a proiectat primul implant total de șold cu tulpină femurală, cu cap bilă și cupe de teflon, care s-a dovedit a fi un dezastru. Când a fost înlocuit polimerul cu polietilenă cu greutate moleculară ultra înaltă (ultra high molecular weight polyethylene-UHMWPE), rezultatele au fost atât de bune încât implantul său de șold a fost la fel de bun ca orice șold actual. La sfârșitul celui de-al Doilea Război Mondial, un alt inventator, dr. Wilhem Kolff, a utilizat un înveliș din celuloză conectat la o instalație de osmoză pentru a realiza dializa sângelui pacienților cu boli de rinichi [3, 169].

Deoarece majoritatea materialelor sunt polimeri și majoritatea progreselor recente în știință și tehnologie implică polimeri, unii au numit aceasta, *epoca polimerilor*. Cuvântul polimer este derivat din grecescul „poly” și „meros”, adică „multe” și, respectiv, „părți” [170]. O categorie aparte de polimeri o reprezintă

*polimerii naturali*, care au fost luați în considerare încă din anii 1940 când Henry Ford a utilizat plastic din soia pentru a construi diverse piese de mașină, într-un efort de a-și demonstra convingerea că „fermele sunt fabricile viitorului”.

Polimerii naturali sunt produși de sisteme biologice, de exemplu, microorganismele, plante și animale sau sunt sintetizați chimic din materii prime precum zaharuri, amidon, grăsimi sau uleiuri naturale [171, 172]. Pielea, bumbacul, lâna, cauciucul natural sau pluta toți sunt polimeri naturali, cunoscuți încă de la începutul civilizației. Deși aceste materiale sunt încă populare pentru aplicații specifice, majoritatea materialelor polimerice utilizate astăzi în cele mai multe domenii sunt sintetice și se bazează pe resursele derivate din petrol [171]. Cu toate acestea, în domeniul medical și în domenii conexe care necesită manifestarea unor proprietăți specifice, de obicei antimicrobiene, cum este industria alimentară, cea cosmetică, cea textilă, alternativă constituie utilizarea polimerilor naturali și a derivaților acestora.

În acest context, biomaterialele derivate din polimeri naturali pot fi implantate în organism sau utilizate împreună cu acesta, deoarece sunt concepute pentru a avea proprietăți care se potrivesc cu cele ale sistemului biologic. Pe de altă parte, acestea trebuie să fie suficient de stabile pentru utilizarea vizată și să fie concepute pentru a îndeplini parțial sau complet funcțiile țesuturilor și organelor bolnave, deteriorate sau care funcționează defectuos.

Biomaterialele, datorită utilizării preconizate într-un mediu foarte complex, trebuie să îndeplinească unele cerințe, dintre care specificații generale sunt [169]:

1. Să fie biocompatibile (netoxice, non-cancerigene, non-alergenice etc.)
2. Să aibă proprietăți fizice (densitate, formă, porozitate, topografia rugozității suprafeței) comparabile cu cele ale țesutului pe care îl înlocuiesc sau unde sunt implantate,
3. Să aibă proprietăți mecanice adecvate (compresiune, tracțiune, forfecare),
4. Să aibă durată de viață adecvată (să fie stabile pe toată perioada utilizării sau se degradează în câteva zile sau săptămâni, în funcție de obiectiv),
5. Să aibă proprietăți chimice similare cu cele ale țesuturilor (de exemplu, hidrofile sau hidrofobe, cu grupări funcționale similare),
6. Să fie procesabile și sterilizabile fără dificultate,
7. Să aibă bioactivitate adecvată (în mare parte să fie inerte, dar ar putea avea activități de inducție sau de conducere, sau să poarte agenți bioactivi dacă este necesar),
8. Să fie economici și disponibili.

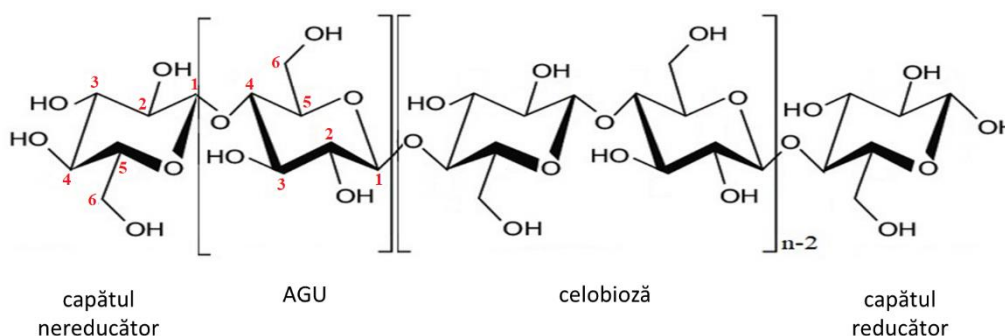
#### **1.4. Celuloza - caracterizare, obținere, aplicații**

Celuloza este cel mai abundent tip de material organic, regenerabil, de pe Pământ [173], cu o producție anuală de biosinteză, estimată la peste  $10^{11}$  tone. Biosinteza celulozei este un fenomen foarte complex, iar descrierile detaliate ale procesului de biosinteză pot fi găsite în lucrările lui Brown, Saxena și Brown și Dufresne. Celuloza este un polimer natural sustenabil fascinant și aproape inepuizabil, care a fost utilizat sub formă de fibre sau derivații săi de mii de ani, pentru o gamă largă de aplicații, de materiale și de produse [174].

Celuloza este una din componentele majore ale pereților celulari ai plantelor, obținută în principal din resurse naturale precum iarba (bambus), paie (grâu, orz, orz), fibre (in, iută, cânepă, trestie de zahăr) [175], frunze (ananas, palmier), animale marine [176], ciuperci, alge și bacterii [177, 178], lemn și reziduuri forestiere de



lemn, precum ar fi aşchii de lemn, ramuri [179-180]. Indiferent de sursa de proveniență [181, 182], celuloza poate fi caracterizată ca o homopolizaharidă liniară cu greutate moleculară ridicată, formată din unități monomere dispuse alternativ cu unghi de  $180^\circ$  între ele, legate prin legături  $\beta$ -1,4 (Figura 1.2) [183, 184]. Segmentul care se repetă este un dimer de glucoză cunoscut sub numele de celobioză [181, 185, 186]. Fiecare unitate monomeră, denumită unitatea de anhidroglucoză (AGU), are trei grupări hidroxil, care conferă celulozei cele mai importante proprietăți și determină structura sa microfibrilată pe mai multe niveluri [181, 187, 178], dar și organizarea sub forma ierarhizată a regiunilor cristaline și a celor amorfă și structura extrem de coezivă [176, 188, 189].



**Figura 1.2.** Structura moleculară a celulozei [190].

Fiecare lanț de celuloză posedă o asimetrie direcțională a axei sale moleculare față de capete: un capăt are funcționalitate chimică reducătoare datorată unității hemiacetal, fiind o punte eterică de forma C-O-C și celălalt capăt are grupări hidroxil de tip "pandantiv", acest capăt neavând proprietăți de reducere [181]. Însă, grupările hidroxil au rol principal în formarea unor legături covalente cu diverși reactanți [191], care sporesc activitatea chimică a celulozei și implicit efectul antibacterian.

Celuloza prezintă proprietăți uimitoare, cum ar fi o structură polichirală bine definită, complexă, biocompatibilitate și biodegradabilitate. Mai mult, molecula conține diferite funcționalități reactive pentru o conversie chimică selectivă către produse cu caracteristici "personalizate". Cu toate acestea, aplicațiile celulozei sunt limitate din cauza insolubilității polimerului natural în majoritatea solvenților. Pe de altă parte, reactivitatea grupărilor hidroxil și cristalinitatea fibrelor de celuloză datorate legăturilor de hidrogen foarte puternice și prezența unor zone hidrofobe (în jurul atomilor de C) au o anumită influență asupra proprietăților generale, inclusiv asupra solubilității [192].

Încorporarea în polimeri a unor cantități mici de particule nanometrice cu o rigiditate ridicată reprezintă o abordare recentă, fiind exploatată pe scară largă pentru crearea de noi materiale cu proprietăți mecanice adaptate. Nanofibrele de celuloză cristalină atrag un interes semnificativ în acest context, datorită proprietăților lor mecanice interesante [5]. Cele mai importante dintre avantajele utilizării celulozei ca bază în compozitele polimerice sunt: regenerabilitatea, costul scăzut, densitatea scăzută și consumul redus de energie, biocompatibilitatea, abrazivitatea scăzută și suprafața sa relativ reactivă. Cercetătorii din întreaga lume studiază materialele celulozice în vederea extinderii aplicațiilor compozitelor celulozice și a celulozei modificate [193]. Recent a crescut interesul pentru utilizarea particulelor nanometrice

rigide, de tipul nanofibrelor de celuloză, ca materiale de armare în matrici polimerice, compozite sau nanocompozite. Nanofibrele celulozice, în literatura de specialitate au fost raportate ca și microcristale, nanocristale, cristalite de celuloză, izolate prin hidroliza acidă și sunt numite astfel pe baza caracteristicilor lor fizice (rigiditate, grosime și lungime) [5]. Samir și colaboratorii (2005) raportează faptul că microcristalele de celuloză cresc în condiții controlate, ceea ce permite formarea de cristale individuale de înaltă puritate [194]. Structura lor ordonată poate nu numai să confere rezistență ridicată, ci și să determine modificări semnificative ale unor proprietăți importante ale materialelor, cum ar fi natura electrică, optică, magnetică, feromagnetică și dielectrică, precum și în ceea ce privește conductivitatea. Deoarece celuloza este clasificată ca un carbohidrat (substanță care conține carbon, hidrogen și oxigen), este necesar să subliniem faptul că, deși acest termen se aplică unui număr mare de compuși organici, celuloza este unică prin faptul că poate fi atât sintetizată din monozaharide, cât și hidrolizată la monozaharide [5].

Pe lângă interesul științific de lungă durată pentru celuloză, utilizarea celulozei ca materie primă regenerabilă și biodegradabilă în diverse aplicații este o soluție propusă recent [192, 195]. Structura versatilă a celulozei permite utilizarea acesteia într-o varietate de aplicații, în urma modificării structurii prin diverse căi, inclusiv metode fizice și chimice, de exemplu, materiale de umplutură, materiale de construcție și acoperire, laminate, hârtie, textile, filme optice, medii de adsorbție, regulatori de vâscozitate și chiar materiale funcționale cu proprietăți avansate (Figura 1.3) [192, 195-197]. Este o alternativă ecologică la produsele sintetice derivate din industria petrolului. Recent, celuloza modificată a fost folosită ca bază pentru diverse compozite, datorită performanțelor sale mecanice și termice excelente [193].

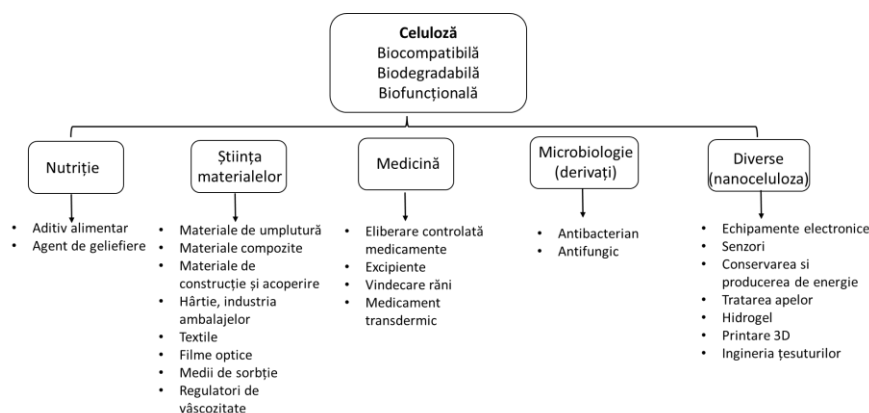


Figura 1.3. Aplicații ale celulozei [193].

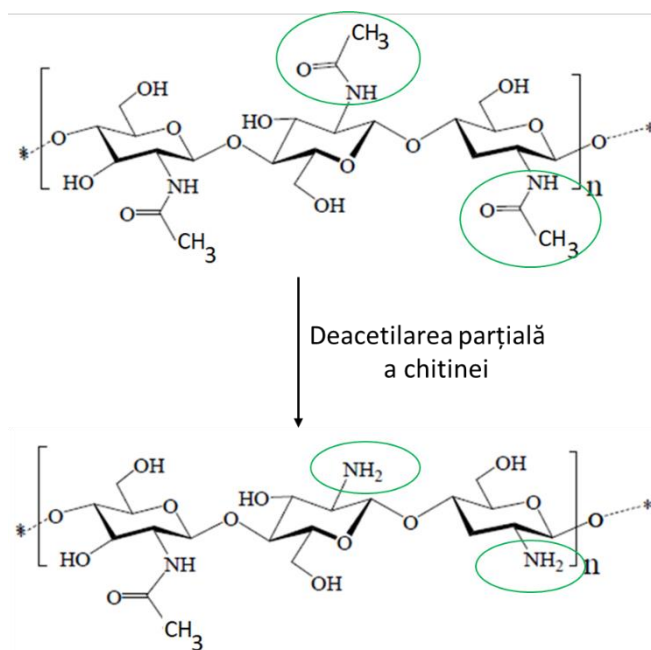
## 1.5. Chitosanul - caracterizare, obținere, aplicații

Chitosanul este derivat din chitină, care este al doilea polimer natural ca abundență după celuloză. Chitina, materia primă utilizată pentru producerea chitosanului, este o polizaharidă albă, aspră și cu structură neelasică, prezentă în pereții celulari ai ciupercilor și în exoscheletele crustaceelor. În 1859, Rouget a descoperit faptul că prin încălzirea chitinei, în mediu alcalin, poate obține un material solubil în acizi organici [198]. Denumirea acestui material „chitosan” a fost dată de

Hoppe-Seyler în 1894 [198, 199], dar structura chimică a fost necunoscută până în 1950 datorită cercetărilor amănunțite ale lui Muzzarelli și Hirano [200].

Datorită structurii sale macromoleculare deosebite, biocompatibilității, biodegradabilității și altor proprietăți funcționale intrinseci, chitosanul a atras atenția pentru diferite interese științifice și industriale majore, încă de la sfârșitul anilor 1970 [198, 201]. Descoperit în mușchii și produs comercial din cochilii de crustacee, chitosanul este acum utilizat în diverse aplicații [200].

Chitosanul are o structură similară cu a celulozei și chitinei, singura diferență este gruparea funcțională din poziția C2. Celuloza și chitina are o grupare hidroxil (-OH) și, respectiv, o grupare N-acetilamină (-NHCOCH<sub>3</sub>), iar chitosanul are o grupare amino (-NH<sub>2</sub>) în poziția C2. Chitosanul poate fi obținut prin deacetilare parțială sau totală a chitinei, grupările acetil din lanțul molecular al chitinei fiind îndepărtate pentru a forma grupări amino în chitosan (Figura 1.4). Din acest motiv, chitosanul poate fi clasificat ca un copolimer al unităților de 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranoză (glucozamină) și 2-acetamidă-2-deoxi-β-D-glucopiranoză (N-acetilglucozamină) legate prin legături glicozidice β (1 - 4) [202-205].

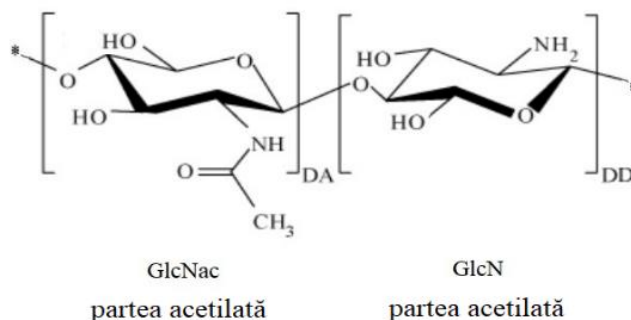


**Figura 1.4.** Deacetilarea chitinei pentru formarea chitosanului [202-205].

Diferența majoră între chitină și chitosan fiind grupurile amino, diferă proprietățile fizico-chimice, care sunt corelate cu funcțiile biologice și deci comportamentul chimic este diferit. Chitosanul are un conținut de azot de 6,80% sau mai mare. În general, atunci când conținutul de grupări N-acetil este mai mare de 50% se consideră ca e vorba despre chitină, în timp ce pentru valori mai mici se consideră a fi chitosan [206].

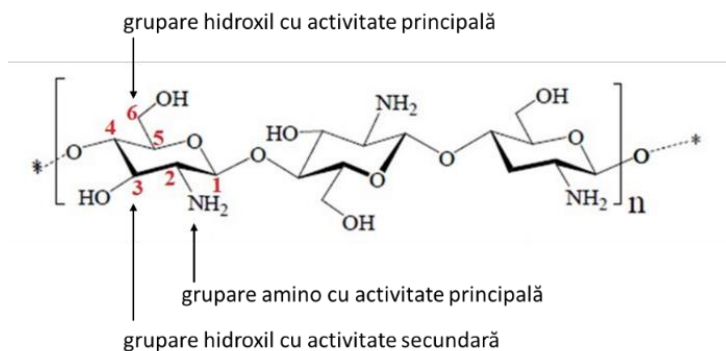
Structura chitosanului include o parte acetilată și o parte deacetilată, iar structura moleculară a unităților monomerice care se repetă în molecula chitosanului este prezentată în Figura 1.5. În cazul în care partea stângă este 2-amino-2-deoxi-β-

(1-4)-D-glucopiranoză, reprezentând gradul de acetilare (DA) al chitosanului, partea dreapta este rezultatul deacetilare al părții stângi reprezentând gradul de deacetilare al chitosanului.



**Figura 1.5.** Structura chitosanului [206].

Unitățile monomere componente sunt distribuite aleatoriu sau sub formă de blocuri, formând polimerul de chitosan [207-209]. Acest mod de distribuție a dat chitosanului o structură rigidă și inegală. Prezența grupărilor hidroxil situate la C6 (grupare hidroxil cu activitate principală) și C3 (grupare hidroxil cu activitate secundară) și a grupărilor amino (localizate pe C2) (Figura 1.6.), care sunt foarte reactive, cu tendință concomitentă de a forma legături de hidrogen intramoleculare și intermoleculare, are ca rezultat formarea structurii liniare a moleculei de chitosan.



**Figura 1.6.** Poziția grupărilor reactive pe scheletul moleculei de chitosan [209].

Cercetările efectuate de-a lungul timpului asupra proprietăților chitosanului au scos în evidență o serie de proprietăți foarte importante, printre care activitatea antibacteriană, în contextul necesității de a găsi noi materiale care să prezinte un efect bactericid asupra unor bacterii care sunt deseori rezistente la antibioticele existente. Se știe că chitosanul este un agent cu activitate antibacteriană împotriva multor bacterii comune, Gram-pozitiv și Gram-negativ [11, 210].

Chitosanul are mai multe avantaje față de alte tipuri de agenți antimicrobieni, deoarece posedă o activitate antibacteriană mai mare, un spectru mai larg de activitate și o toxicitate mai mică față de celulele mamiferelor [209, 211, 212].

Potențialul de a utiliza chitosanul în domeniul medicinei este foarte important. De-a lungul timpului a primit diferite întrebuințări, foarte spectaculoase ca arie de acoperire. În domeniul "bio" a fost utilizat în biotehnologie [213-216], conservarea alimentelor [217, 218], medicamente, produse farmaceutice [203, 219] și terapie genică [220, 221].

Din păcate, chiar dacă aria de aplicabilitate a chitosanului ar putea fi nelimitată datorită potențialului său biologic, solubilitate apoasă slabă îi limitează aplicarea, inclusiv comportamentul antimicrobian, în special pentru sistemele biologice [209]. Acțiunea antimicrobiană este influențată de o mulțime de factori intrinseci, cum ar fi sursa de origine (proveniența din crustacee [222], carapace de insecte [223] ciuperci [224]), concentrația sa, greutatea moleculară care generează tipul de chitosan [22], 226], gradul de polimerizare a chitosanului [227], dar și de factori externi precum pH-ul mediului [228], tipul de bacterii asupra cărora acționează [210], compoziția chimică a substratului etc. Există mulți factori care modifică comportamentul chitosanului, deci, pentru a urma calea cea mai bună în obținerea unor derivați de chitosan, este necesar să se cunoască ce aplicabilitate vor avea derivații obținuți, astfel încât modificarea proprietăților chitosanului să conducă la derivați care se pretează scopului urmărit.

În ultimele două decenii, chitosanul a primit atenție în numeroase domenii precum stomatologie, oftalmologie, biomedicină și bioimagică, igiena și îngrijire personală, medicina veterinară, industria ambalajelor, agrochimie, acvacultură, cataliză, cromatografie, industria băuturilor, fotografie, tratarea apelor uzate, deshidratarea nămolului și biotehnologie [198]. În figura 1.7 sunt prezentate câteva aplicații ale acestuia.

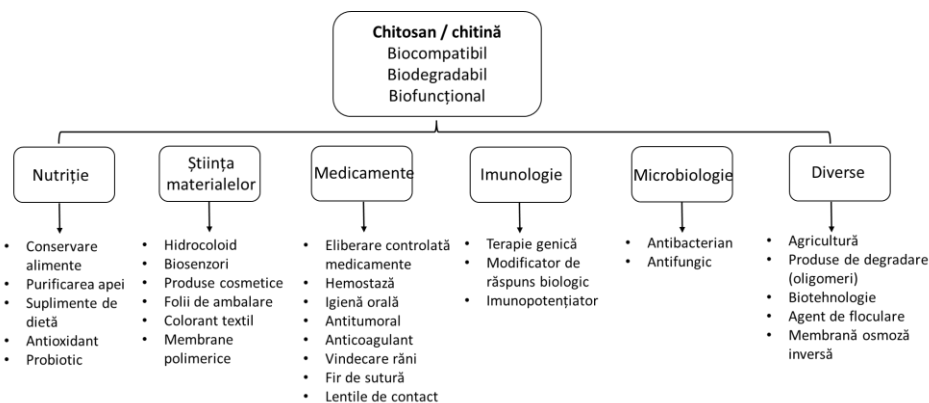


Figura 1.7. Aplicații ale chitosanului [198].

## 1.6. Factori care influențează mecanismele de acțiune antimicrobiană

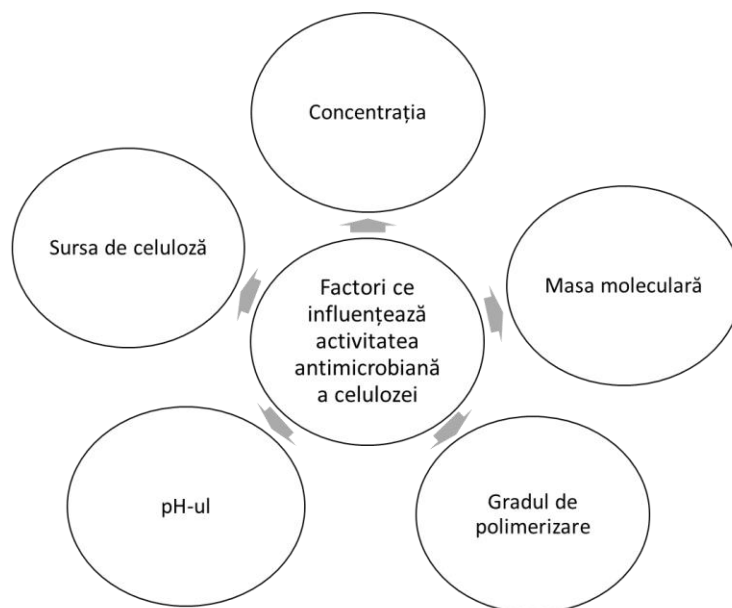
Istoricul clasificării bacteriilor a arătat faptul că disponibilitatea unor tehnici noi a dus la evoluția taxonomiei bacteriene. Prima clasificare a ținut cont de morfologia bacteriilor, majoritatea oamenilor de știință fiind interesați de descrierea bacteriilor patogene. La începutul secolului al XX-lea, pe lângă morfologie, tot mai multe date

fiziologice erau utilizate ca markeri importanți pentru clasificarea și identificarea microorganismelor. Pentru caracterizarea și identificarea acestora au fost determinate numeroase proprietăți biochimice și fiziologice ale culturilor bacteriene. Astfel, s-a ajuns la investigarea activității antimicrobiene a diverselor materiale, produsele naturale oferind o bază majoră pentru dezvoltarea antibioticelor încă din cele mai vechi timpuri (de exemplu,  $\beta$ -lactame, tetraciclină, aminoglicozide, glicopeptide).

Sistemele macromoleculare, datorită proprietăților lor, permit utilizarea lor eficientă în diverse domenii, inclusiv în crearea de materiale cu activitate antimicrobiană. Ca urmare, se continuă și astăzi dezvoltarea intensivă a unor polimeri naturali cu proprietăți antimicrobiene, fie cuaternizați, fie funcționalizați cu grupări bioactive care au succes ca materiale biocide [229].

### 1.6.1. Factori care influențează activitatea antimicrobiană a celulozei

Activitatea antimicrobiană a oricărui biomaterial, deci și a celulozei, este influențată de câțiva factori intrinseci și extrinseci. Dintre aceștia, cei mai importanți sunt: natura materialului, concentrația acestuia, pH-ul sistemului, masa moleculară, gradul de polimerizare (în corelație directă cu raportul de oligomeri din care este compus polimerul) (Figura 1.8).



**Figura 1.8** Factori care influențează activitatea antibacteriană a celulozei

#### a. Sursa de celuloză

Sursa de celuloză își pune amprenta asupra proprietăților cristaline ale fibrelor de celuloză. În celuloza de natură lemnoasă, lanțurile adiacente ale polimerului se potrivesc strâns între ele într-o regiune cristalină ordonată, rezultând un produs cu rezistență ridicată. În consecință gradul de cristalinitate diferă funcție de sursa și

gradul de prelucrare a materiei prime care, la rândul său, influențează proprietățile produsului final. Spre exemplu, celuloza bacteriană are structura fibrilei de bază de 100 de ori mai mică decât celuloza vegetală și este foarte cristalină. Elasticitatea sa este comparabilă cu cea a cartilajului articular. Prin urmare, celuloza bacteriană este un candidat potrivit pentru a fi aplicată în ingineria țesuturilor și, de asemenea, pentru a dezvolta membrane pentru eliberare controlată pentru medicamente [230].

În cazul particular al celulozei bacteriene (BC), sursa de proveniență influențează direct structura, deoarece, proprietățile sale variază funcție de tulpina bacteriană și mediul de cultură [230]. Comparativ cu celuloza vegetală, celuloza bacteriană este mai pură din punct de vedere chimic (> 98%), are un grad mai mare de polimerizare (DP-polimerization degree) ~10.000, este din punct de vedere mecanic mai puternică (modulul Young 15 până la 35 GPa, rezistență la tracțiune 200 până la 300 MPa) și are microfibrile mai subțiri (50 până la 80 nm, de aproximativ 200 de ori mai subțiri decât bumbacul) [231]. Datorită greutateii sale moleculare ridicate, cristalinității ridicate și legăturilor puternice de hidrogen, celuloza bacteriană are o solubilitate slabă. Având doar grupări hidroxil pe scheletul polimeric are ca rezultat funcționalități limitate.

Utilizarea unui polimer de origine biologică, provenit dintr-o resursă regenerabilă, biodegradabil și deci mai puțin agresiv pentru mediu, este un criteriu important, luat în calcul tot mai des pentru cercetările actuale și de viitor [232].

### **b. Concentrația**

La fel ca și celuloza microcristalină (MCC), celuloza nativă, celuloza microfibrilată (MFC) și celuloza nanocristalină (NCC, CNC) nu sunt solubile în apă. Ele pot fi, totuși, dispersate în apă. Nanoceluloza este pseudoplastică. Odată dispersată corespunzător, dezvoltă vâscozități mari la concentrații scăzute. Prezintă proprietatea anumitor geluri sau fluide care sunt groase și foarte vâscoase în condiții normale, dar devin subțiri și mai puțin vâscoase, atunci când sunt agitate sau ultrasonate (tixotropie). Când forțele de forfecare sunt îndepărtate, gelul își recapătă o mare parte din starea inițială.

Vâscozitatea ridicată la concentrații scăzute de nanoceluloză face ca nanoceluloza să fie foarte interesantă ca stabilizator non-caloric și agent de gelifiere în aplicațiile alimentare [233].

### **c. pH-ul**

Celuloza bacteriană (BC) este foarte pură deoarece nu conține hemiceluloze și lignină, are cristalinitate ridicată (mai mult de 80%), capacitate excelentă de absorbție a apei și rezistență mecanică extraordinară, în special în stare umedă.

Celuloza bacteriană, BC, constă dintr-o rețea tridimensională de fibre de celuloză ultrafine cu un diametru în intervalul 80-150 nm și care poate conține, în starea inițială, până la 99% apă. În condiții statice de cultură, pe suprafața mediului de cultură se formează straturi (foi) de BC de până la câțiva centimetri grosime. Este important să se controleze pH-ul deoarece acumularea de acizi gluconic, acetic sau lactic în mediul de cultură scade pH-ul mult sub valoarea optimă pentru creștere și producție de celuloză [192].

#### d. Masa moleculară

Așa cum am subliniat, proprietățile celulozei pot varia semnificativ funcție de origine și procesul de obținere. În acest context, capacitatea de a determina greutatea moleculară a celulozei și uniformitatea sa chimică este extrem de importantă. După aproape 200 de ani de chimie a polimerilor, determinarea greutatea moleculare a polimerilor rămâne o provocare [234]. Pentru a determina greutatea moleculară a celulozei, cercetătorii au dezvoltat diferite metode, cum ar fi metoda grupului final, metoda presiunii osmotice, metoda ultracentrifugării, metoda vâscozității, metoda dispersării luminii și metoda cromatografiei prin permeație pe gel (GPC). Dintre aceste diverse tehnici, metoda vâscozității și metoda GPC au devenit treptat cele mai utilizate metode de caracterizare datorită funcționării lor simple și repetabilității excelente [235].

Cunoașterea diferitelor metode de determinare a greutatea moleculare poate fi benefică în înțelegerea structurii moleculei de celuloză întrucât numărul de unități monomerice din celuloză este dat ca grad de polimerizare (DP) [234]. Celuloza nativă are în general valori ale gradului de polimerizare mai mari decât celuloză regenerată sau celuloză prelucrată.

#### e. Gradul de polimerizare

Structura celulozei nu este o simplă agregare a unităților de D-glucoză, unitățile de glucoză fiind legate ferm, covalent, prin legături glicozidice, pentru formarea unor lanțuri moleculare lungi, cu structură neramificată [233]. Se pare că selectarea grupărilor protectoare din monomer este crucială pentru sinteza polizaharidelor cu o structură regulată [190], strategia devenind foarte importantă pentru prepararea compușilor cu secvență controlată și poziție de funcționalizare care sunt de mare ajutor în analiza și determinarea relațiilor structură-proprietate [236].

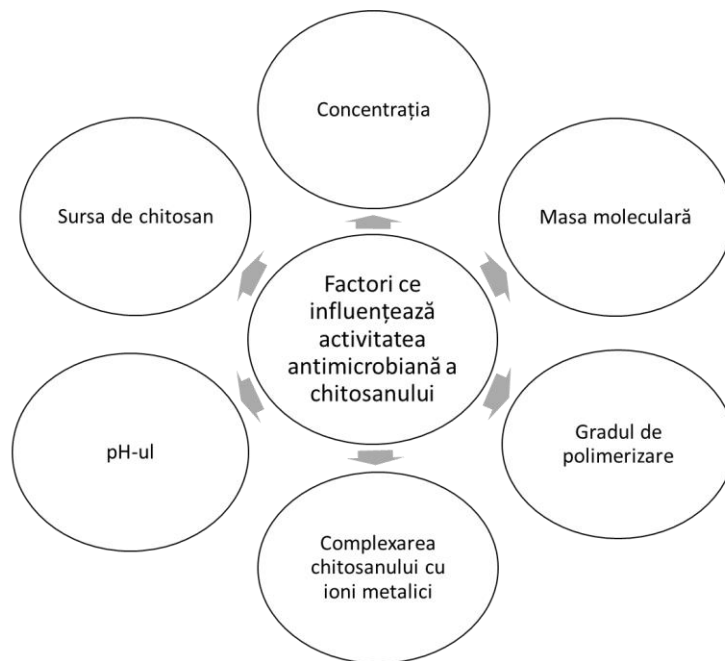
Celuloza bacteriană are valori ridicate ale gradului de polimerizare (DP), în timp ce celuloza lemnoasă din reziduurile agricole (spre exemplu din paie de grâu) are DP mai mic ( $DP \sim 1000$ ) față de cea de origine lemnoasă, care posedă DP mai mare ( $DP \sim 4000-5500$ ), iar celuloza din fibrele de bumbac are  $DP \sim 10000$ . Când celuloza este supusă hidrolizei acide, gradul de polimerizare scade rapid până ajunge la așa-numita „nivelare”. Gradul de polimerizare al unei probe de celuloză se reduce rapid la o valoare relativ constantă la tratamente severe de hidrolizare. Fragmentele de celuloză rezultate vor avea lungimea maximă care le va permite acestora să se dizolve în mediul de hidroliză utilizat. Faza inițială de degradare rapidă, cu modificarea gradului de polimerizare, corespunde hidrolizei regiunii amorfe reactive a celulozei; în timp ce faza cu viteză de platou, mai lentă, corespunde hidrolizei fracției cristaline a celulozei care reacționează lent [237].

Depolimerizarea controlată a celulozei constituie un avantaj, deoarece aceasta permite diverse aplicații ale derivaților celulozei, pe baza diferitelor lor proprietăți [238].

### 1.6.2. Factori care influențează activitatea antimicrobiană a chitosanului

În Figura 1.9. sunt prezentați factorii care influențează activitatea antibacteriană a chitosanului.





**Figura 1.9.** Factori care influențează activitatea antibacteriană a chitosanului

#### **a. Sursa de chitosan**

Chitina este cea mai abundentă polizaharidă de pe pământ, după celuloză; fiind principalul polimer structural găsit în peretele celular fungic [239, 240]. Este prezentă, de asemenea, în exoscheletele artropodelor și insectelor. Chitosanul, principalul derivat al chitinei, poate proveni așadar din fungi și din exoscheletul crustaceelor sau insectelor. Unele studii au menționat cultivarea anumitor ciuperci pentru a oferi o sursă eficientă de chitosan cu aplicații industriale [240, 241]. Mulți cercetători au ajuns la concluzia că chitosanul poate fi extras nu numai din ciupercile Zygomycete, ci și din ciupercile non-Zygomycete [240, 242].

Chien și colab. au raportat faptul că chitina brută din carapace de crab nu a prezentat nicio activitate antimicrobiană, dar chitina din ciuperci a prezentat un efect inhibitor asupra creșterii bacteriene, în comparație cu chitina din carapacea de crab [240]. Rezultatele lor au arătat faptul că activitatea antimicrobiană a chitosanului fungic a fost mai mică decât cea a chitosanului obținut din carapace de crustacee. Cu toate acestea, chitosanul fungic, similar celui din crustacee, a prezentat efecte inhibitoare mai bune împotriva bacteriilor Gram-pozitive comparativ cu bacteriile Gram-negative [222, 240].

A fost demonstrat de Byun faptul că, chitosanul preparat din întreaga carapace de crab și coaja pulpei de crab prezintă diferențe majore în ceea ce privește caracteristicile fizico-chimice și funcționale. De exemplu, chitosanul preparat din carapace de crab a avut un conținut semnificativ mai mare de azot, un grad de deacetilare, solubilitate și vâscozitate și o activitate antibacteriană îmbunătățită decât chitosanul preparat din coaja de picioare de crab [240].

Pe de altă parte, oligomerii de chitosan și polimerii derivați de chitosan, de proveniență diferită, prezintă activități antibacteriene diferite. Aceștia au fost testați împotriva agenților patogeni de origine alimentară, iar rezultatele demonstrează faptul că sursa, gradul de deacetilare și dimensiunea moleculară a chitosanului trebuie alese selectiv pentru a controla agenții patogeni țintă de origine alimentară [240].

#### **b. Concentrația chitosanului**

O mulțime de experimente au sugerat faptul că chitosanul poate inhiba creșterea bacteriilor la diferite concentrații [240, 243]. De obicei, concentrația necesară de chitosan pentru a inhiba creșterea bacteriană este corelată cu gradul de acetilare al chitosanului; o soluție care prezintă un grad de acetilare de 7,5% a fost mai eficientă decât cea care prezintă un grad de acetilare de 15% [240, 243, 244].

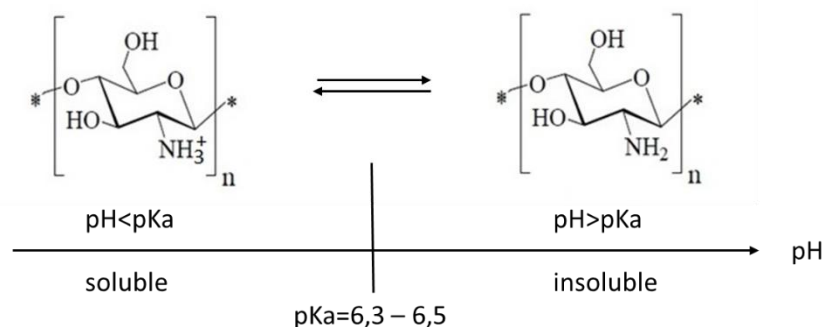
La concentrații mici, chitosanul se leagă de suprafața celulară bacteriană, în special la bacteriile Gram-negative. În acest caz, este perturbată permeabilitatea membranei celulare, iar componentele intracelulare părăsesc celula, ceea ce ulterior duce la moartea acesteia. Pe de altă parte, la concentrații mai mari, chitosanul care are sarcină pozitivă dată de grupările amino, poate acoperi suprafața celulei, iar componentele intracelulare sunt blocate în celulă. În plus, în cazul bacteriilor Gram- pozitive, celulele bacteriene încărcate pozitiv și chitosanul care sunt încărcate pozitiv, se resping reciproc și previn aglutinarea [240, 241, 245].

Liu și colab. a evaluat efectele greutatei moleculare și ale concentrației chitosanului împotriva *E. coli*. A fost utilizat chitosan cu greutate moleculară diferită ( $5,5 \times 10^4$  Da până la  $15,5 \times 10^4$  Da) în diferite concentrații (20 până la 1000 ppm). Toate probele de chitosan cu greutate moleculară de la  $5,5 \times 10^4$  Da până la  $15,5 \times 10^4$  Da au avut activități antimicrobiene bune la concentrații mari ( $>200$  ppm), iar toate probele la concentrație scăzută (20 ppm) au permis creșterea *E. coli* [240, 246]. Acest lucru a sugerat că mecanismul activității antibacteriene a chitosanului ar putea fi descris prin flocularea acestora, care în final a dus la moartea lor. La o concentrație scăzută, chitosanul nu a putut floclula și nu a omorât toate bacteriile din mediul de cultură, ceea ce permite supraviețuirea bacteriilor [240, 246, 247].

#### **c. Rolul pH-ului**

pH-ul mediului este unul dintre cei mai importanți factori care afectează activitatea antimicrobiană a chitosanului și a derivaților săi. pH-ul afectează în primul rând solubilitatea chitosanului, dar afectează și sarcinile electrice ale moleculei de chitosan. Această proprietate face chitosanul capabil de legare prin interacțiuni electrostatice [240, 248, 249].

Efectul pH-ului asupra solubilității chitosanului depinde de acidul utilizat în studiul experimental. Nativ, chitosanul este solubil în acizi organici diluați, când pH-ul  $< 6$  și este insolubil în apă și solvenți organici, când pH-ul este alcalin (Figura 1.10) [243].



**Figura 1.10.** Influența pH-ului asupra solubilității chitosanului [240]

Solubilitatea chitosanului în soluții apoase diluate poate fi corelată cu conversia unităților de glucozamină în forma solubilă de  $\text{R-NH}_3^+$ . Datele experimentale au demonstrat faptul că activitatea antimicrobiană a chitosanului se materializează în mediu acid, fiind adecvat pentru utilizare ca și conservant în alimente acide [240, 250].

La pH mai mic decât pKa, moleculele de chitosan sunt protonate datorită densității mari a grupărilor amino ( $-\text{NH}_3^+$ ), care se transformă în formă cuaternară, dând o sarcină pozitivă polimerului, ceea ce duce la creșterea respingerii electrostatice intermoleculare, rezultând o macromoleculă policationică [228]. Chitosanul are comportament policationic la  $\text{pH} < 6$ , ceea ce îl face solubil în apă.

S-a observat faptul că în timp ce pH-ul scade, adsorbția chitosanului pe suprafețele bacteriene crește. Aceasta este premisa pentru a interacționa cu substanțe încărcate negativ, cum ar fi proteine, acizi grași, fosfolipide din celula bacteriană [241, 251, 228]. Astfel, interacțiunea dintre moleculele de chitosan încărcate pozitiv cu reziduurile încărcate negativ de pe suprafața bacteriană este posibilă și, în acest fel, permeabilitatea celulei este perturbată, ceea ce duce în cele din urmă la moartea bacteriilor [210, 241, 252, 253]. În toate mecanismele care explică efectele antibacteriene ale moleculelor de chitosan, sarcina cationică este considerată a fi responsabilă pentru legarea eficientă a chitosanului de componentele anionice care sunt prezente la nivelul membranelor bacteriene [245, 250, 254-258]. Interacțiunea dintre chitosanul protonat și membranele celulare încărcate negativ este cel mai comun mecanism care explică moartea celulară, denumit „efectul antibacterian” al chitosanului [240].

Se pune problema diferenței de pH între pH-ul fiziologic al majorității celulelor bacteriene (care este un pH neutru) și pH-ul la care chitosanul este solubil. pH-ul fiziologic al celulei fiind neutru, moleculele de chitosan precipită. În acest caz, moleculele de chitosan rămân pe suprafața celulei bacteriene, fiind ca un strat care blochează canalele de schimb ionic din peretele celular, care sunt esențiale pentru supraviețuirea celulei microbiene. Acestea destabilizează peretele celular și provoacă daune grave constituenților celulari și, la final, celula va muri [240, 250]. Acest mecanism de acțiune nu este unic, efectul antibacterian al chitosanului poate fi considerat ca rezultatul unei secvențe de procese moleculare care provoacă daune multiple și, în cele din urmă, duc la moartea celulară.

Majoritatea studiilor ne determină să considerăm faptul că atunci când pH-ul mediului care conține chitosan scade sub pKa, polimerul are un efect antimicrobian sporit. Factorul critic pentru activitatea antimicrobiană este determinat de prezența sarcinii pozitive pe structura polimerului, mai puțin de solubilitatea sa. Pe de altă parte, nu doar prezența sarcinii pozitive este suficientă, ci un rol decisiv în exercitarea efectului bactericid al derivaților de chitosan îl joacă localizarea sarcinii cationice. Când au fost studiați o serie de compuși cu lungimi diferite a distanței dintre atomii de carbon substituiți, rezultatele au arătat că efectul inhibitor al compușilor a scăzut atunci când distanța dintre structura de bază (scheletul) a polimerului și poziția cationică a crescut. Majoritatea cercetărilor concluzionează faptul că efectul antimicrobian pare a fi cel mai mare atunci când fragmentele cationice, sau sarcina pozitivă, sunt mai apropiate de scheletul polimerului și tinde să scadă atunci când grupările funcționale sunt prezente la o distanță mai mare de scheletul polimeric. Acest efect este clar observat atunci când aceeași grupă funcțională este legată de polimer prin lanțuri de diferite lungimi [209, 240, 246, 259, 260].

La pH mai mare decât pKa, chitosanul tinde să-și piardă sarcina pozitivă și precipită din cauza deprotonării grupărilor amino, devenind insolubil. Acest lucru se explică prin faptul că majoritatea grupărilor amino devin neîncărcate la pH aproape de 7 [228, 261]. Deși la  $\text{pH} > \text{pKa}$  chitosanul este deprotonat, rămâne încă reactiv, având posibilitatea de a forma geluri sau pelicule protectoare [240, 258, 262].

Un alt studiu a concluzionat faptul că la  $\text{pH} = 6,2$ , a fost observat un efect biocid mai puternic, care este corelat cu pKa a chitosanului ( $\text{pKa} = 6,3-6,5$ ), evident foarte apropiat de un pH de 6,2. La acest pH, cantitatea de grupări amino încărcate pozitiv este de aproximativ 75% în chitosan, în timp ce la  $\text{pH} = 7,4$ , această cantitate reprezintă aproximativ 10% [240, 243].

#### d. Masa moleculară

Pe baza greutatei moleculare, există trei tipuri de chitosan: chitosan cu masă moleculară mică (LMw), chitosan cu masă moleculară mare (HMw) și oligo-chitosan (chitosan cu lanț scurt) [226, 228].

În aproape toate studiile s-a raportat faptul că există o corelație între efectul bactericid al chitosanului și greutatea sa moleculară. Oligozaharidele și D-glucozamina nu au activitate antibacteriană. În unele studii, se sugerează faptul că este necesară o greutate moleculară minimă de 10kDa pentru un efect bactericid [263].

Relația dintre efectul bactericid și greutatea moleculară este dependentă de tipul bacteriilor utilizate. Aceasta deoarece chitosanul HMw nu poate trece prin membrana microbiană și rămâne pe suprafața celulei, ceea ce blochează transportul nutrienților prin membrana celulară microbiană, rezultând liza celulară. Pe de altă parte, o soluție disociată de molecule de chitosan cu masă moleculară mare HMw se poate lega de membrana celulară pentru a-i modifica permeabilitatea. Pe de altă parte moleculele de chitosan cu masă moleculară mică, LMw (<5000kDa) disociate în soluție s-ar putea lega cu ADN, ceea ce ar inhiba sinteza ARNm și a proteinelor prin penetrare către nucleul microorganismelor [11, 226, 240, 264, 265].

#### e. Gradul de polimerizare și gradul de deacetilare

Gradul de polimerizare (DP) și gradul de deacetilare (DD) reprezintă doi parametri intrinseci care influențează direct structura lanțului chitosanului. Aceștia

sunt parametri fizico-chimici de bază care determină utilizarea chitosanului în diferite aplicații.

Gradul de acetilare (DA) poate fi scris în felul următor [206, 240]:

$$\%DA = \frac{8,695 - \%N}{8,695 - 6,896} * 100$$

unde: 8,695 = procentul de azot din chitosanul complet deacetilat,  
6,896 = procentul de azot din chitina complet acetilată,

$$\%DA = 100 - \%DD$$

$$\%DD = 100 - \%DA$$

Chitosanul, fiind de fapt un amestec de unități omoloage de monomer N-acetil-d-glucozamină și unități monomer d-glucozamină, la un grad diferit de polimerizare, nu este un polimer pur, fiind insolubil în apă până când este descompus în oligomeri [227]. În acest context, prin polimerizare, este posibilă creșterea treptată a greutatei moleculare a chitosanului, iar aceasta influențează vâscozitatea și solubilitatea chitosanului [226, 266, 267]. Solubilitatea în apă crește odată cu scăderea gradului de polimerizare, DP și odată cu creșterea gradului de deacetilare, DD. În mediu acid, grupările amino au o sarcină pozitivă, iar acest lucru duce la diolvarea ușoară a chitosanului deacetilat în mediu apos, ușor acid [205, 250].

Deoarece chitosanul poate fi obținut din chitină, studiile s-au concentrat și pe gradul de polimerizare a chitinei. Un grad de polimerizare mai mic de patru pentru chitină nu pare să aibă un rol biologic important, în timp ce chitina cu DP > 6 pare să fie mult mai activă [202, 268, 269].

Pe de altă parte este posibilă copolimerizarea chitinei și a chitosanului. Folosind această procedură, este posibilă generarea unor modele diferite ale moleculei, generând noi tipuri de materiale prin copolimerizarea între polizaharide naturale și polimeri sintetici [203]. Proprietățile acestor noi materiale pot fi controlate, cu ajustarea structurii moleculei, prin lungimea și numărul de lanțuri laterale atașate. De exemplu, reticularea afectează caracteristicile de permeabilitate, iar prin interacțiuni covalente sau ionice rezultă formarea de hidrogeluri de chitosan care sunt utilizate în sistemele de administrare a medicamentelor [254, 270, 271].

De asemenea, s-a demonstrat că o activitate antimicrobiană crescută necesită un anumit număr de unități monomerice, iar această valoare depinde de alți factori, precum natura substituenților care sunt atașați și tipurile de microorganisme care sunt testate [240, 259].

Oligomerii de chitosan au o solubilitate excelentă. În plus, chitosanul oligomeric (pentameri și heptameri) are o activitate antifungică mai bună decât unitățile mai mari [243]. Polimerii mai lungi ai chitosanului sunt solubili în apă în soluții la pH=7 sau mai mic și sunt, de asemenea, solubili în acizi organici diluați, cum ar fi acizii lactic și acetic [240, 268].

#### **g. Complexarea cu ioni metalici**

Deși este unanim acceptat faptul că centrul activ de coordonare a ionilor de metale tranzitionale este atomul de azot al grupării amino din chitosan, de-a lungul timpului, mai mulți autori au investigat posibilitatea participării la formarea

complexelor și a altor fragmente funcționale de chitosan, precum grupările hidroxil (în special cele în poziția C3) sau atomul de oxigen al legăturii glicozidice [272, 273].

Adăugarea unui ion metalic la chitosan crește activitatea sa antimicrobiană în comparație cu chitosanul nativ [274]. De exemplu, activitatea antimicrobiană a chitosan-Zn<sup>2+</sup> sau chitosan-Ag<sup>+</sup> este mai mare decât cea a chitosanului nativ [249, 275]. Încărcarea chitosanului cu ioni de Cu<sup>2+</sup> și Mn<sup>2+</sup> crește activitatea sa antibacteriană împotriva *S. aureus*, *E. coli* și *S. enterica* [276, 277]. Nanoparticulele de argint pe bază de chitosan prezintă o activitate antibacteriană mai mare împotriva *B. subtilis*, *E. coli* și *S. aureus* decât chitosanul nativ [249, 256, 278].

Pentru a explica aceste rezultate, au fost propuse mai multe tipuri de reacții ca posibile mecanisme: adsorbția, schimbul de ioni sau formarea de chelați cu diverși ioni metalici. Cu toate acestea, tipul de interacțiune depinde de compoziția soluției, de pH-ul soluției și de tipul de ioni metalici [240]

## CAPITOLUL 2.

### MATERIALE FUNCȚIONALIZATE PRIN IMPREGNARE. OBȚINERE ȘI CARACTERIZARE

Noile clase de materiale dezvoltate de către cercetători au rolul de a optimiza diverse aplicații industriale din punct de vedere economic, energetic, dar și al protecției mediului. Totodată se dorește proiectarea unor clase de materiale care să prezinte activitate antimicrobiană sau cel puțin cu activitate bacteriostatică în contextul rezistenței tulpinilor microbiene în cazul celor mai mulți agenți bactericizi.

Pentru îmbunătățirea activității antimicrobiologice este necesară funcționalizarea diferitelor suporturi, de natură organică sau anorganică, sintetice sau naturale cu grupări active, precum N, P, S, -CHO sau -COOH [279-281].

Modificarea chimică sau fizică se poate realiza prin diferite tehnici. Metodele de imobilizare fizică, cum ar fi impregnarea simplă, obținerea de materiale dopate, permite fixarea unui strat de extractant pe suprafața suportului solid prin forțe electrostatice. Metodele chimice de imobilizare modifică structura suprafeței suportului prin fixarea extractantului pe suport. Modificarea chimică este metoda preferată ca urmare a formării unor legături stabile, permanente, între extractant și suport [282].

Pentru caracterizarea unei game largi de materiale în general se utilizează analiza microscopică și spectroscopică. Analiza microstructurală este efectuată utilizând microscopia optică, microscopie electronică cu scanare (SEM) sau microscopia electronică cu transmisie (TEM). Pentru analiza compoziției chimice sunt utilizate diferite tehnici precum: rezonanță magnetică, RMN, spectroscopie Raman, spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FTIR, difracție de raze X, XRD, fluorescență de raze X, XRF și spectroscopie de raze X cu dispersie de energie, EDX [283].

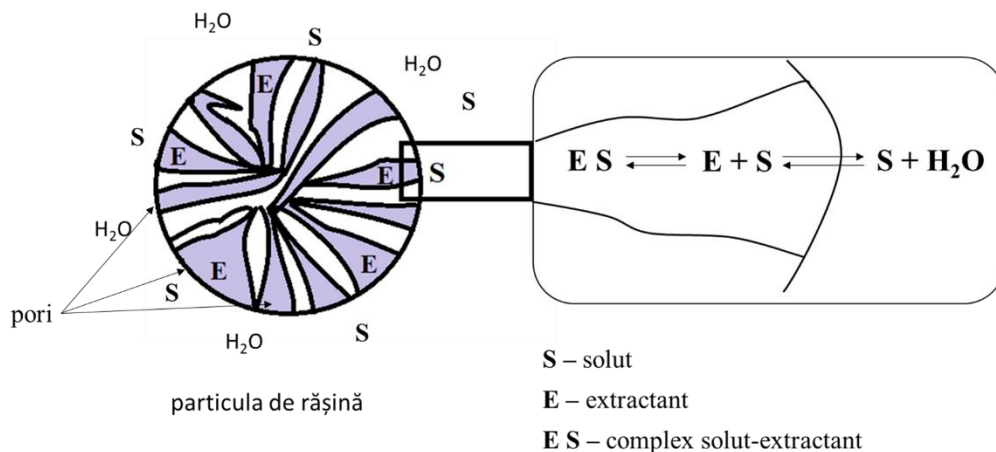
#### 2.1. Metode de obținere a materialelor prin funcționalizare prin impregnare

##### 2.1.1. Impregnarea rășinii cu solvent (SIR)

Rășinile impregnate cu solvent (SIR-solvent impregnated resin) sunt rășini (macro) poroase disponibile comercial, impregnate cu un solvent sau un extractant. În acest sens, un extractant, de regulă lichid organic, este reținut în porii particulelor existenți la suprafața suportului, prin procese de adsorbție.

Principiul metodei SIR a fost studiat pentru prima dată în 1971 de Abraham Warshawsky cu scopul de a extrage metale [284]. Multe cercetări în ceea ce privește metoda SIR au fost realizate de către J.L Cortina, de N. Kabay, A.Trochimczuk, A. sau M. Streat [285].

În Figura 2.1. este prezentat schematic principiul de bază al metodei SIR, în care extractantul organic, *E*, este reținut în porii unei particule poroase [286, 287].



**Figura 2.1.** Principiul de bază al metodei SIR (Solvent Impregnated Resin) [286, 287].

Avantajul major al metodei SIR este faptul că, în timpul impregnării se reduce pierderea de extractant din faza apoasă. Dezavantaje ale metodei SIR pot fi scurgerea extractantului sau colmatarea patului fix prin uzura particulelor. Aceste dezavantaje pot fi remediate prin alegerea adecvată a extractantului. Aceasta implică selectarea unui extractant cu solubilitate scăzută în apă, care poate fi reținut în interiorul porilor, dar și alegerea unui suport inert din punct de vedere chimic, stabil din punct de vedere mecanic [288, 289].

Principalele tehnici de impregnare sunt impregnarea umedă și impregnarea uscată. În timpul *impregnării umede*, particulele poroase ale suportului sunt lăsate să se înmoaie cu fluidul în care este dizolvat extractantul [290]. Particulele de suport pot fi puse în contact cu o cantitate precalculată de extractant, care pătrunde în matricea poroasă, fie particulele de suport sunt puse în contact cu un exces de extractant. După impregnare, excesul de solvent este evaporat.

*Metoda uscată de impregnare* este o metodă frecvent utilizată pentru obținerea materialelor cu aplicații în cataliza eterogenă. Datorită acțiunii forțelor capilare extractantul este atras în pori. Excesul de extractant adăugat face ca transportul soluției să se schimbe de la un proces cu acțiune capilară la un proces de difuzie, care este mai lent. Proprietățile suportului impregnat depind de condițiile de transfer de masă din interiorul porilor, în timpul impregnării și uscării [291- 293].

O tehnică suplimentară, deși nu atât de frecvent utilizată, este *metoda de adăugare a modificatorilor*. Această tehnică se bazează pe utilizarea unui sistem extractant/solvent/modificator. Modificatorul suplimentar ar trebui să îmbunătățească pătrunderea extractantului în porii particulelor solide [290]. Solventul este ulterior evaporat, lăsând extractantul și modificatorul în porii particulelor.

În plus, mai poate fi utilizată *metoda impregnării în regim dinamic prin coloană*. Particulele solide sunt puse în contact cu extractantul dizolvat într-un solvent până când sunt complet înmuiate [290, 294, 295].

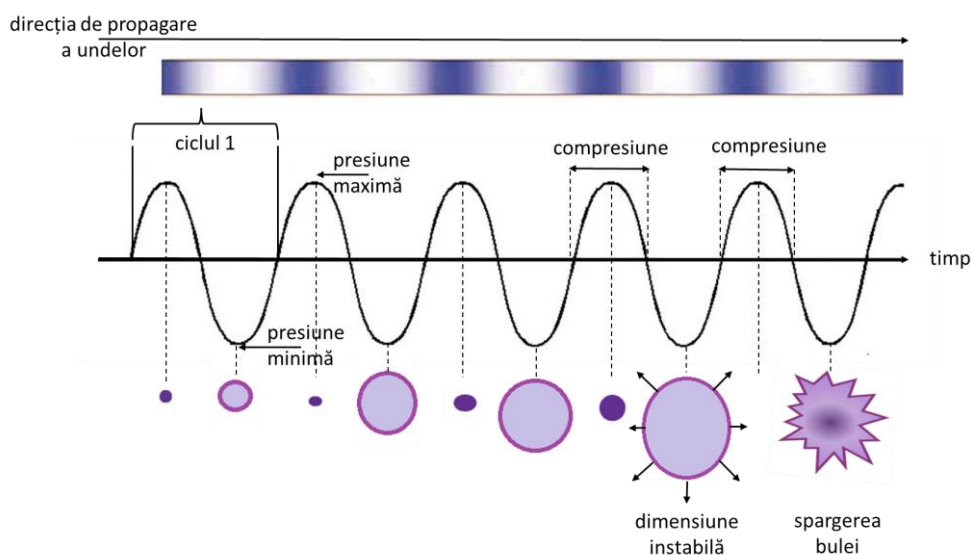
Recent au fost investigate și alte aplicații ale metodei SIR și anume funcționalizarea unor suporturi inerte organice sau anorganice, sintetice sau naturale, cu grupări pendante precum N, S, P, carbonil, carboxil, fenil etc. [240].



Prin metoda SIR se pot prepara o multitudine de materiale pornind de la suporturi polimerice sintetice, sau naturale, sau de la compuși anorganici și extractanți precum: aminele, lichidele ionice, acizii fosforici, fosfonici, tiofosfonici, esteri, acid bis (2,4,4-trimetilfenil)monotiofosfonic sau tributilfosfat (TBP), oxid trioctilfosfin (TOPO), acid bis(2-etilhexil) fosforic (DEHPA), acid (2-etilhexil)fosfonic, mono(2-etilhexil)ester (EHPNA), oxid octil(fenil)-N,N-di-sobutilcarboil-metil-fosfină (CMPO) sau dimetil-dibutil-tetradecil-1,3-malon-amidă (DMDBDMA) etc. [285]

### 2.1.2. Impregnarea prin ultrasonare

O metodă nouă care poate fi utilizată pentru funcționalizarea prin impregnare a suporturilor este ultrasonarea. Scopul acestei metode este de a menține în contact suportul și extractantul cu ajutorul undelor ultrasonice (> 20 kHz) [296]. Aplicarea ultrasunetelor la sistemele lichide provoacă cavitația acustică, care generează creșterea și eventual spargerea bulelor (Figura 2.2.).



**Figura 2.2.** Cavitația acustică cauzată de undele ultrasonice [296]

Funcție de frecvența ultrasunetelor, presiunile pozitive sau negative alternante produse local, provoacă expansiunea sau compresia materialului, ducând la spargerea bulei. Ultrasunetele determină hidroliza apei în interiorul bulelor oscilante, ducând la formarea de radicali liberi  $H^+$  și  $OH^-$  care pot fi capturați în unele reacții chimice, de ex. radicalii liberi. În timpul ultrasonării, bulele produse sunt împărțite în două tipuri, funcție de structura lor: (i) *bule neliniare*, care formează nori cu bule mari cu dimensiuni de echilibru în timpul ciclurilor de presiune, cunoscute sub numele de cavitații stabile și (ii) *bule nestabile*, care se dezintegrează în bule mai mici, cunoscute ca bule interne (tranzitorii) sau cavitații cu bule [296, 297].

Ultrasonarea prezintă o multitudine de aplicații în diverse domenii: medical, procesarea minereurilor, nanotehnologie, alimentație, ingineria mediului, sudură industrială sau curățarea suprafețelor etc. [298].

Aplicațiile în care se utilizează ultrasunete oferă numeroase avantaje după cum urmează: (i) undele cu ultrasunete sunt netoxice, sigure și ecologice [299]; (ii) ultrasunetele nu necesită utilaje sofisticate și o gamă largă de tehnologii [300]; (iii) utilizarea ultrasunetelor oferă un randament mai mare și o rată de impregnare mai mare în comparație cu celelalte metode convenționale de impregnare.

În ciuda faptului că are multe avantaje, utilizarea ultrasunetelor are și multe dezavantaje, precum: (i) aport mai mare de energie [301]; (ii) undele cu ultrasunete induc efecte fizico-chimice care pot fi responsabile de deteriorarea calității suprafeței suportului; (iii) frecvența undelor ultrasonice poate impune rezistență la transferul de masă [302].

### 2.1.3. Impregnarea prin evaporare controlată a solventului la presiune scăzută

O altă metodă nouă care permite impregnarea prin funcționalizare a suporturilor inerte este evaporarea controlată a solventului la presiune scăzută. În acest caz extractanții dizolvați în solvenți pătrund în structura poroasă a suportului, urmat de evaporarea solventului în care a fost dizolvat extractantul. Agitația moleculară termică este cea care stă la baza acestei schimbări, prin urmare creșterea temperaturii este un factor favorizant [302].

Două metode eficiente de completare sau înlocuire a încălzirii în procesele de evaporare a solventului sunt: (i) adăugarea prin amestecare / omogenizare sau (ii) crearea condițiilor de vid. Aceste tehnici fie măresc cantitatea de energie introdusă în sistem, fie reduc pragul energetic de evaporare. Metode de evaporare a solventului sunt:

- a. **Evaporizarea sub vid (rotavapor)** – utilizată când solventul trebuie îndepărtat controlat. Procesul funcționează prin rotirea amestecului sub vid pentru a crește suprafața, reducând presiunea în vederea scăderii punctului de fierbere a solventului și încălzirea soluției. Procesul permite o evaporare ușoară.



Figura 2.3 Rotavapor

- b. **Evaporarea în tub** – implică evaporarea solvenților din tuburi paralele. Este o metodă rapidă și eficientă. Evaporarea prin tub permite concentrarea solvenților cu punct de fierbere ridicat, fără a-i încălzi la temperaturi ridicate.



**Figura 2.4** Evaporare în tub

**c. Evaporarea centrifugală** – este utilizată atunci când mai mulți solvenți lichizi diferiți trebuie evaporati la temperaturi scăzute. O pompă de vid este utilizată pentru a susține evaporarea solvenților și eliminarea acestora din probe; totuși, datorită faptului că aceasta se realizează sub vid [303, 304].



**Figura 2.5** Evaporarea centrifugală

Impregnarea prin evaporare controlată a solventului are loc în două etape: în prima etapă, suportul poros este imersat într-o soluția lichidă formată din solventul în care se găsește dizolvat extractantul și este expus la presiuni scăzute, timp relativ scurt (zeci de minute), pentru a îndepărta aerul existent în porii suportului, apoi în a doua etapă se crește presiunea pentru a facilita pătrunderea soluției în structura poroasă a suportului [302]. Metoda se utilizează în special pentru îndepărtarea solvenților cu punct de fierbere scăzut, cum ar fi n-hexanul sau acetatul de etil, la

temperatura camerei și presiuni uzuale. Avantajul acestei metode este că permite evaporarea rapidă a solventului din probă, materialul astfel obținut putând fi utilizat imediat.

## 2.2. Metode de caracterizare a materialelor obținute prin funcționalizare fizico-chimică prin impregnare

Având în vedere provocările în cercetare și dezvoltare, sunt necesare tehnici de caracterizare eficiente. Cercetătorii au nevoie de diverse tehnici de caracterizare pentru analiza materialului, importanța acestor tehnici fiind legată de structura microscopică a materialelor. Prin utilizarea acestor tehnici pot fi caracterizate diferite tipuri de materiale cu o varietate de aplicații. Diferitele intrări interacționează cu materialul investigat și oferă rezultatele (ieșiri) (Figura 2.6.)

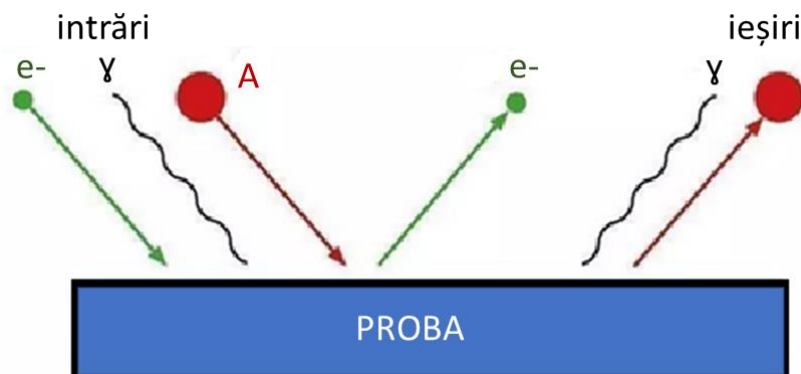


Figura 2.6. Prezentarea schematică a investigației unui material [305]

Caracterizarea materialelor este procesul prin care se studiază proprietățile fizice, electrice și chimice ale materialelor [305]. Tehnicile avansate de caracterizare a materialelor pot fi utilizate pentru a analiza o gamă largă de proprietăți. Cu aceste tehnici, se poate optimiza proiectarea pentru a îmbunătăți performanța și fiabilitatea, prin înțelegerea caracteristicilor materialelor componente dintr-un sistem. Acest lucru ajută la luarea deciziilor cu privire la modul în care să fie utilizate pentru a crea produse sigure și eficiente, precum și materiale noi care se comportă într-un mod specific în funcție de utilitatea lor.

Caracterizarea fizico-chimică, atunci când este utilizată în știința materialelor, se referă la procesul larg și general prin care structura și proprietățile unui material sunt testate și cuantificate [306, 307].

În timp ce multe tehnici de caracterizare au fost practicate de secole, cum ar fi microscopia optică de bază, noi tehnici și metodologii apar în mod constant. În special, apariția microscopului electronic și a spectrometriei de masă cu ioni secundari în secolul al XX-lea a revoluționat domeniul, permițând imagistica și analiza structurilor și compozițiilor la scară mult mai mică decât era posibil anterior.

**Microscopia** cuprinde o categorie de tehnici de caracterizare care sondează și cartografiază suprafața și structura unui material. Aceste tehnici pot folosi fotoni,

electroni, ioni pentru a colecta date despre structura unei probe. Câteva exemple comune de tehnici de microscopie includ: microscopia optică, microscopie electronică cu scanare (SEM), microscopia electronică cu transmisie (TEM), microscopie cu ioni de câmp (FIM), microscopie cu sondă de scanare (SPM), microscopie cu forță atomică (AFM), microscopie de scanare cu efect tunel (STM), topografie cu difracție de raze X (XRT) etc. [308].

**Spectroscopia** cuprinde o categorie de tehnici de caracterizare care utilizează o serie de principii pentru a dezvălui compoziția chimică, variația compoziției, structura cristalină și proprietățile fotoelectrice ale materialelor. Câteva exemple comune de tehnici de spectroscopie includ: radiația optică, spectroscopie ultraviolet-vizibil (UV-VIS), spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), termoluminescență (TL), fotoluminescență (PL), difracția cu raze X (XRD), difuzarea razelor X cu unghi mic (SAXS), spectroscopie cu raze X cu dispersie de energie (EDX, EDS), spectroscopie cu raze X cu dispersie pe lungime de undă (WDX, WDS), spectroscopie cu pierderi de energie electronică (EELS), spectroscopia fotoelectronilor cu raze X (XPS), spectroscopie electronică Auger (AES), spectroscopie de corelare a fotonilor cu raze X (XPCS), spectrometrie de masă, spectrometrie de masă cu ionizare termică (TI-MS) MALDI-TOF, spectrometrie de masă cu ioni secundari (SIMS), spectroscopie nucleară, spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (RMN), spectroscopie Mössbauer (MBS), spectroscopie de corelație fonică/Dynamic light scattering (DLS), rezonanță paramagnetică a electronilor/spin (EPR, ESR), împrăștierea neutronilor în unghi mic (SANS), spectrometrie cu retrodifuzare Rutherford (RBS) [309].

O gamă largă de tehnici sunt utilizate pentru a caracteriza diferite proprietăți macroscopice ale materialelor, inclusiv: analiză termică diferențială (DTA), analiză termică dielectrică (DEA, DETA), analiza termogravimetrică (TGA), calorimetrie cu scanare diferențială (DSC), tehnica excitației impulsurilor (IET), tehnici cu ultrasunete, inclusiv spectroscopie cu ultrasunete rezonante etc. [310].

## PARTEA A II-A. PARTEA EXPERIMENTALĂ. CONTRIBUȚII ORIGINALE

### CAPITOLUL 3.

### STRATEGIA CERCETĂRII

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 polimeri naturali studiați în această teză de doctorat, chitosanul și celuloza, prezintă simetrie structurală, având aceleași legături  $\beta$ -glicozidice, diferența principală fiind prezența grupărilor amino primare la C2 în chitosan, în locul grupărilor hidroxil din structura celulozei.

În stare nativă ambii polimeri naturali discutați 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. Chiar dacă chitosanul are, prin gruparea amino pe care o conține, o activitate antibacteriană intrinsecă, prin modificarea chitosanului nativ, se pot obține derivați ai chitosanului cu proprietăți antimicrobiene remarcabile, cum sunt derivații chitosanului obținuți prin funcționalizarea cu săruri cuaternare de amoniu, săruri de fosfoniu, compuși cu sulf și azot. În privința potențialului antimicrobian al celulozei, acesta poate fi pus în evidență numai prin intermediul derivaților celulozei, celuloza nativă neavând efect antimicrobian semnificativ. De aceea utilizarea acestor polimeri naturali pentru obținerea unor materiale cu proprietăți avansate sunt justificate în principal prin această activitate antibacteriană sporită împotriva microorganismelor patogene. Chitosanul are un spectru larg de activitate și o rată mare de distrugere a tulpinilor bacteriene Gram-pozitive și Gram-negative. Acțiunea antibacteriană a chitosanului deși depinde de mai mulți factori (grad de deacetilare, greutate moleculară, pH-ul mediului, solubilitate, temperatură, caracterul hidrofilic/hidrofobic al substratului), un rol foarte important în manifestarea acestuia este imprimat de gruparea amino din structura sa, care poate altera morfologia suprafeței bacteriene, fie prin creșterea permeabilității membranei la unele bacterii, fie prin scăderea permeabilității membranei în cazul altor bacterii.

Așadar, particularitatea chitosanului 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 hidrogen intramoleculare și intermoleculare puternice.

Datorită prezenței grupării  $-NH_2$ , care acționează ca un nucleofil puternic, chitosanul poate fi funcționalizat cu o gamă largă de grupări active/pendante pentru a se modula structura pentru aplicații specifice/proiectate. Ca urmare a abundenței grupărilor hidroxil pe suprafața celulozei, este permisă modificarea cu ușurință a

suprafeței celulozei cu o serie de grupări chimice, care imprimă și acesteia proprietăți specifice.

Pornind de la aceste deziderate **obiectivul general** al tezei de doctorat este de a obține materiale prin funcționalizare prin impregnare, cu proprietăți antimicrobiene.

**Obiectivele specifice** ale tezei de doctorat au fost: (i) obținerea materialelor funcționalizate prin impregnare; (ii) caracterizarea fizico-chimică și testarea materialelor obținute, prin teste microbiologice pe inocul heterotrof; (iii) stabilirea condițiilor optime de sinteză; (iv) stabilirea rapoartelor optime de lucru; (v) studiul comportamentului microbiologic al materialelor asupra tulpinilor bacteriene specifice (bacterii Gram-negative - tulpinile de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; bacterii Gram-pozitive - tulpinile de *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923). Pentru observarea activității antifungice a fost utilizată tulpina de *Candida parapsilosis* ATCC 22019).

Pentru a atinge obiectivele acestei teze de doctorat au fost întreprinse următoarele **activități**:

- obținerea unor materiale cu proprietăți antimicrobiene;
- caracterizarea fizico-chimică a noilor materiale în vederea evidențierii prezenței grupărilor active pe suprafața suporturilor, celuloză și chitosan;
- selectarea materialelor prin teste microbiologice pe inocul heterotrof;
- studiul comportamentului microbiologic al materialelor obținute prin funcționalizarea prin impregnare a celulozei asupra culturilor specifice (bacterii Gram-negative - tulpinile de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; bacterii Gram-pozitive - tulpinile de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; tulpini fungice *Candida parapsilosis* ATCC 22019 sau *Candida albicans* ATCC 10231;
- studiul comportamentului microbiologic al materialelor obținut prin funcționalizarea prin impregnare a chitosanului asupra culturilor specifice (bacterii Gram-negative - tulpinile de *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; bacterii Gram-pozitive - tulpinile de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; tulpini fungice *Candida parapsilosis* ATCC 22019 sau *Candida albicans* ATCC 10231.

### 3.1. Obținerea materialelor

Materialele sunt obținute (**135 materiale**) prin funcționalizare prin impregnare, prin metoda SIR (Solvent Impregnated Resin), a **suporturilor**: (i) **celuloză** (CE) (pudră, Avicel PH-101, Sigma-Aldrich, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) și (ii) **chitosan** (CH) (40 mesh, 90% grad de deacetilare și masa moleculară  $1-3 \times 10^5$ , Acros Organics, Waltham, MA, USA) cu **extractanții**: (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-butil-hexadecil-fosfoniu (HDTBPBr)) sau (iii) **săruri cu sulf și azot** (tiouree (Thio) și mercaptobenzotiazol (MBT)). Firma producătoare a extractanților este pentru DDTMABr—Acros Organics, Waltham, MA, USA, pentru TDTMABr—ThermoFisher, Waltham, MA, USA, purity 98%, pentru HDTMACl—ThermoFisher, Germany, purity 98%, pentru DDTPPBr—ThermoFisher, Germany purity 98%, pentru HDTBPBr—ThermoFisher, Germany, purity 98%, pentru MBT—Janssen Chemistry, Bucharest, Romania) și pentru Thio—Fluka AG, Charlotte, NC,

USA. 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-HDTMACl, 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.

### 3.1.1. Suporturi

#### 3.1.1.1. Celuloza (CE)

Celuloza este un compus organic aparținând categoriei polizaharidelor, fiind un polimer format din subunități de glucoză, care se găsește în pereții celulari ai celulelor vegetale sau poate fi produsă de unele celulele bacteriene.

Celuloza este formată din mii de subunități D-glucoză. Subunitățile de glucoză din celuloză sunt legate prin legături glicozidice  $\beta$  (1-4). Spre deosebire de celelalte polizaharide, orientarea moleculelor de glucoză în celuloză este inversată. Ele au orientare „ $\beta$ ” în care gruparea hidroxil a carbonului anomic (C1) este îndreptată deasupra planului inelului de glucoză. Grupările hidroxil ale restului atomilor de carbon sunt direcționate sub planul inelului. Pentru a face legături glicozidice  $\beta$  (1-4), fiecare moleculă alternativă de glucoză din celuloză are orientare inversată. Gruparea hidroxil a carbonului C1 este îndreptată în sus, iar cea a carbonului C4 este îndreptată în jos. Acum, pentru a face o legătură glicozidică  $\beta$  (1-4), una dintre aceste molecule ar trebui inversată, astfel încât ambele grupări hidroxil să vină în același plan. Acesta este motivul inversării fiecărei molecule alternative de glucoză din celuloză. Celuloza este o moleculă neramificată. Lanțurile polimerice de glucoză sunt aranjate într-un model liniar. Spre deosebire de amidon sau glicogen, aceste lanțuri nu suferă nicio înfășurare, formare de elice sau ramificare. Mai degrabă, aceste lanțuri sunt aranjate paralel unul cu celălalt. Legăturile de hidrogen se formează între aceste lanțuri datorită atomilor de hidrogen și grupărilor hidroxil care țin ferm lanțurile împreună. Acest lucru are ca rezultat formarea de microfibrile de celuloză care sunt ferme și puternice.

Proprietățile unice ale celulozei se datorează structurii sale unice, dar depind și de numărul de subunități de glucoză prezente în celuloză. Principalele proprietăți sunt: (i) Celuloza este cel mai abundent carbohidrat prezent în natură; (ii) Este insolubilă în apă; (iii) Este un solid cristalin având un aspect alb de pulbere; (iv) Are o rezistență ridicată la tracțiune datorită legăturilor de hidrogen ferme dintre lanțurile individuale din microfibrile de celuloză; (v) Rezistența la tracțiune a microfibrilelor de celuloză este comparabilă cu cea a oțelului; (vi) Aranjamentul alternativ al moleculelor de glucoză în celuloză contribuie, de asemenea, la rezistența ridicată la tracțiune a celulozei; (vi) Este solubilă în solvenți organici [311]

Structura celulozei este prezentată în Figura 3.1



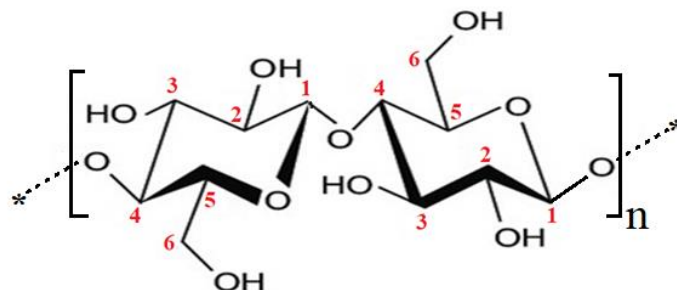


Figura 3.1. Structura celulozei [311]

### 3.1.1.2. Chitosanul (CH)

Chitosanul este o polizaharidă derivată din chitină, chitina fiind a doua cea mai abundentă polizaharidă din lume, după celuloză. Chitosanul este biocompatibil, biodegradabil și non-toxic, astfel încât poate fi utilizat în aplicații medicale, cum ar fi biomateriale antimicrobiene și pentru vindecarea rănilor. De asemenea, este utilizat ca agent de chelatare datorită capacității sale de a se lega de colesterol, grăsimi, proteine și ioni metalici.

Grupările amino din structura chitosanului pot fi protonate, oferind solubilitate în soluții apoase acide diluate, astfel încât aceste proprietăți remarcabile ale chitosanului au oferit oportunități unice pentru dezvoltarea aplicațiilor biomedicale. Activitatea hemostatică a chitosanului poate fi legată și de prezența sarcinilor pozitive pe scheletul chitosanului. Datorită sarcinilor sale pozitive, chitosanul poate interacționa cu segmentele încărcate negativ din membrana celulară, ceea ce poate duce la reorganizarea și la deschiderea proteinelor de joncțiune, explicând proprietatea de îmbunătățire a permeabilității membranelor prin acțiunea polizaharidelor [312, 313].

Structura chitosanului este prezentată în Figura 3.2.

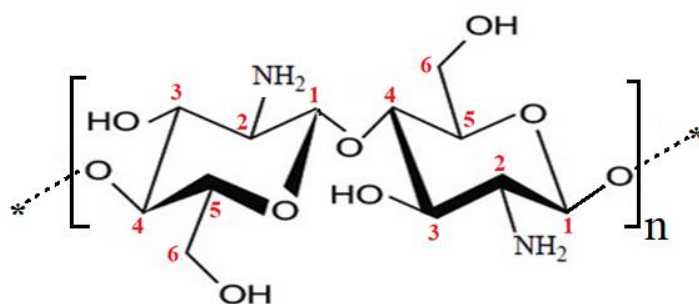


Figure 3.2. Structura chitosanului [314]

### 3.1.2. Extractanți

#### 3.1.2.1. Săruri cuaternare de amoniu

a. Bromură de dodecil-trimetil-amoniu (DDTMABr)

Bromura de dodecil-trimetil-amoniu (DDTMABr) este un cation de amoniu cuaternar având un substituent dodecil și trei substituenți metil în jurul azotului central. Are rol de surfactant [315].

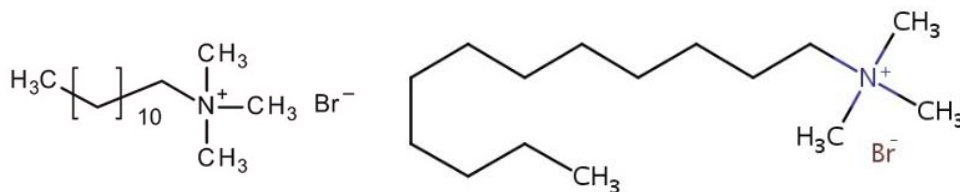
#### Proprietăți chimice și fizice

În Tabelul 3.1. sunt prezentate câteva proprietăți ale bromurii de dodecil-trimetil-amoniu, DDTMABr, iar în Figura 3.3. este prezentată structura sării.

**Tabelul 3.1.** Proprietăți ale bromurii de dodecil-trimetil-amoniu, DDTMABr [315]

Caracteristici	Valoare/Specificitate
Stare de agregare	Pulbere inodoră de culoare albă până la galben deschis; higroscopică
Tip de compus	Amină cuaternară
Formula moleculară	$C_{15}H_{34}BrN$
Greutate moleculară	308,34
Număr de donatori de legături de hidrogen	0
Număr de acceptori de legături de hidrogen	1
Număr de legături rotative	11
Masa exactă	307,18746 g
Masa monoizotopică	307,18746 g
Suprafața topologică polară	$0 \text{ \AA}^2$
Număr de atomi grei	17
Număr de atomi de izotopi	0

- Structura



**Figura 3.3.** Structura chimică a bromurii de dodecil-trimetil-amoniu, DDTMABr [316]

b. Bromură de tetradecil-trimetil-amoniu (TDTMABr)

Bromura de tetradecil-trimetil-amoniu (TDTMABr) este un surfactant cationic care inhibă activitatea celulelor bacteriene prin interacțiuni cu proteine - receptor ai sistemului imunitar. S-a demonstrat că această moleculă are eficacitate antibacteriană împotriva tulpinilor de *S. aureus* rezistente la clorură de benzalconiu. Bromura de tetradecil-trimetil-amoniu suprimă, de asemenea, creșterea celulelor HI-60 prin inhibiția activității ADN polimerazei [317].

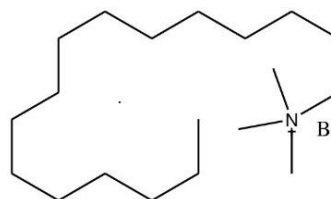
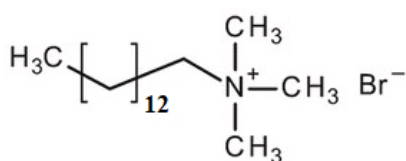
**Proprietăți chimice și fizice**

În Tabelul 3.2. sunt prezentate câteva proprietăți ale bromurii de tetradecil-trimetil-amoniu, TDTMABr, iar în Figura 3.4. este prezentată structura sării.

**Tabelul 3.2.** Proprietăți ale bromurii de tetradecil-trimetil-amoniu, TDTMABr [318]

<b>Caracteristici</b>	<b>Valoare/Specificitate</b>
Stare de agregare	Pulbere cristalină albă
Tip de compus	Amină cuaternară
Formulă moleculară	$C_{17}H_{38}BrN$
Greutate moleculară	365,57
Număr de donatori de legături de hidrogen	0
Număr de acceptori de legături de hidrogen	1
Număr de legături rotative	13
Masa exactă	364,40079 g
Masa monoizotopică	364,40079 g
Suprafața topologică polară	0 Å <sup>2</sup>
Număr de atomi grei	19
Număr de atomi de izotopi	0

- Structura



**Figura 3.4.** Structura chimică a bromurii de tetradecil-trimetil-amoniu, TDTMABr [319]

c. Clorură de hexadecil-trimetil-amoniu (HDTMACl)

Clorura de hexadecil-trimetil-amoniu (HDTMACl) este incoloră până la galben pal, cu miros de alcool. Plutește sau se scufundă în apă. Clorura de cetil-trimetil-amoniu este sarea organică de clorură a cetil-trimetil-amoniului. Are rol de surfactant [320].

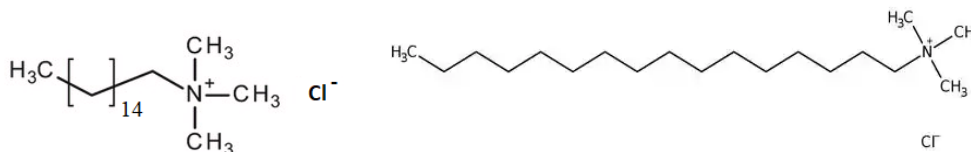
### Proprietăți chimice și fizice

În Tabelul 3.3. sunt prezentate câteva proprietăți ale clorurii de hexadecil-trimetil-amoniu, HDTMACI, iar în Figura 3.5. este prezentată structura sării.

**Tabelul 3.3.** Proprietăți ale clorurii de hexadecil-trimetil-amoniu, HDTMACI [320]

<b>Caracteristici</b>	<b>Valoare/Specificitate</b>
Stare de agregare	Pulbere incoloră până la galben pai
Tip de compus	Amină cuaternară
Formula moleculară	$C_{19}H_{42}ClN$
Greutate moleculară	320,0
Număr de donatori de legături de hidrogen	0
Număr de acceptori de legături de hidrogen	1
Număr de legături rotative	15
Masa exactă	319.3005780 g
Masa monoizotopică	319.3005780 g
Suprafața topologică polară	$0 \text{ \AA}^2$
Număr de atomi grei	21
Număr de atomi de izotopi	0

- Structura



**Figura 3.5.** Structura chimică a clorurii de hexadecil-trimetil-amoniu, HDTMACI [320]

### 3.1.2.2. Săruri cu fosfoniu

a. Bromură de dodecil-trifenil fosfoniu (DDTPPBr)

Bromura de dodecil-trifenil-fosfoniu (DDTPPBr) este o sare organică care conține un număr egal de cationi de dodecil-trifenil-fosfoniu și anioni de bromură [321].

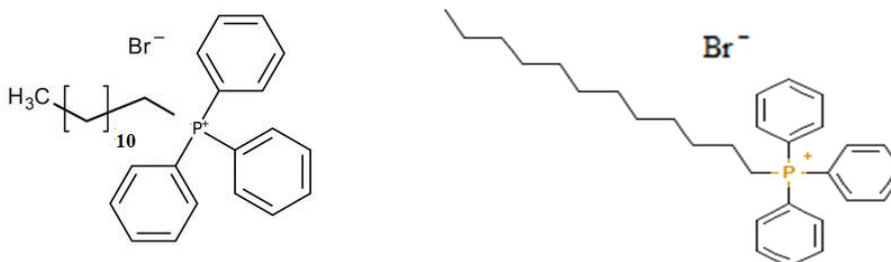
#### Proprietăți chimice și fizice

În Tabelul 3.4. sunt prezentate câteva proprietăți ale bromurii de dodecil-trifenil-fosfoniu, DDTPPBr, iar în Figura 3.6. este prezentată structura sării.

**Tabelul 3.4.** Proprietăți ale bromurii de dodecil-trifenil-fosfoniu, DDTPPBr [321]

<b>Caracteristici</b>	<b>Valoare/Specificitate</b>
<i>Stare de agregare</i>	Pudră albă până la galben deschis, higroscopică
<i>Tip de compus</i>	Compus organofosforic, sare cuaternară de fosfină
<i>Formula moleculară</i>	$C_{30}H_{40}BrP$
<i>Greutate moleculară</i>	511,5
<i>Număr de donatori de legături de hidrogen</i>	0
<i>Număr de acceptori de legături de hidrogen</i>	1
<i>Număr de legături rotative</i>	14
<i>Masa exactă</i>	510,20510
<i>Masa monoizotopică</i>	510,20510
<i>Suprafața topologică polară</i>	$0 \text{ \AA}^2$
<i>Număr de atomi grei</i>	32
<i>Număr de atomi de izotopi</i>	0

- Structura

**Figura 3.6.** Structura chimică a bromurii de dodecil-trifenil-fosfoniu, DDTPPBr [322]

*b. Bromură de tri n-butil-hexadecil fosfoniu (HDTBPBr)*

Bromura de tributil-hexadecil-fosfoniu, HDTBPBr, este o soluție de hidroxid care este utilizată ca și catalizator în producerea agenților antimicrobieni. Poate fi utilizat pentru a pregăti un efect de matrice pentru probele de testare, care sunt apoi supuse formării de acid. Acest produs a demonstrat rezistență ridicată la hidroliză, oxidare și proprietăți biologice. Bromura de tributil-hexadecil-fosfoniu este cunoscută și ca agent de legare intermoleculară de hidrogen și agent tensioactiv cationic. Poate fi utilizat în soluție de hidroxid de sodiu pentru a prepara ionul de nitrit, care poate fi adăugat la alimentarea cu apă în scopuri de dezinfecție [323].

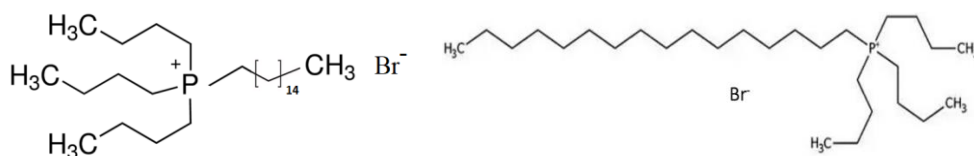
### Proprietăți chimice și fizice

În Tabelul 3.5. sunt prezentate câteva proprietăți ale bromurii de tributil-hexadecil-fosfoniu, HDTBPBr, iar în Figura 3.7. este prezentată structura sării.

**Tabelul 3.5.** Proprietăți ale bromurii de tributil-hexadecil-fosfoniu, HDTBPBr [324]

<b>Caracteristici</b>	<b>Valoare/Specificitate</b>
Stare de agregare	Pulbere albă, higroscopică
Tip de compus	Compus organofosforic
Formula moleculară	$C_{28}H_{60}BrP$
Greutate moleculară	507,7
Număr de donatori de legături de hidrogen	0
Număr de acceptori de legături de hidrogen	1
Număr de legături rotative	24
Masa exactă	506,36160 g
Masa monoizotopică	506,36160 g
Suprafața topologică polară	$0 \text{ \AA}^2$
Număr de atomi grei	30
Număr de atomi de izotopi	0

- Structura



**Figura 3.7.** Structura chimică a bromurii de tri-n-butil-hexadecil-fosfoniu, HDTBPBr [325]

### 3.1.2.3. Săruri cu sulf și azot

#### a. 2-Mercaptobenzotiazol (MBT)

2-mercaptobenzotiazolul (MBT) este o pulbere cristalină de culoare galben pal până la cafeniu, cu miros neplăcut [326] 2-mercaptobenzotiazolul este alergen chimic standardizat. Efectul fiziologic al 2-mercaptobenzotiazolului este prin intermediul eliberării crescute de histamină și al imunității mediate celular [326].

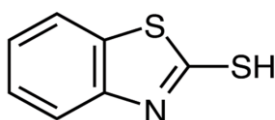
### Proprietăți chimice și fizice

În Tabelul 3.6. sunt prezentate câteva proprietăți ale 2-mercaptobenzotiazolului, MBT, iar în Figura 3.8. este prezentată structura sării.

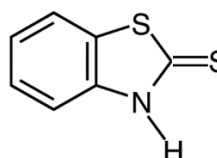
**Tabelul 3.6.** Proprietăți ale 2-mercaptobenzotiazolului, MBT [326]

<b>Caracteristici</b>	<b>Valoare/Specificitate</b>
<i>Stare de agregare</i>	Pudră cristalină
<i>Tip de compus</i>	Compuși cu sulf
<i>Formulă moleculară</i>	$C_7H_5NS_2$
<i>Greutate moleculară</i>	167,3
<i>Număr de donatori de legături de hidrogen</i>	1
<i>Număr de acceptori de legături de hidrogen</i>	2
<i>Număr de legături rotative</i>	0
<i>Masa exactă</i>	166,98634151 g
<i>Masa monoizotopică</i>	166,98634151 g
<i>Suprafața topologică polară</i>	0 Å <sup>2</sup>
<i>Număr de atomi grei</i>	10
<i>Număr de atomi de izotopi</i>	0

- Structura



Forma enol



Forma keto

**Figura 3.8.** Structura chimică a 2-mercaptobenzotiazolului, MBT [326]

*b. Tiouree (Thio)*

Tioureea (Thio) este un solid alb cristalin, care este solubil în apă, soluție de tiocianat de amoniu și etanol. În trecut, a fost utilizat ca agent de tonifiere fotografică, componentă a preparatelor pentru păr și ca agent de curățare uscată. În prezent, este utilizat pentru fluidifierea lipiciului de origine animală și pentru îndepărtarea petelor de argint. Când este încălzită până la descompunere, tioureea degajă vapori toxici de oxizi de azot și oxizi de sulf. Expunerea pe termen lung la tiouree, a oamenilor, poate provoca leziuni ale măduvei osoase, ducând la scăderea nivelului de globule roșii, globule albe și trombocite [327].

Tioureea este un compus organic care conține atomi de carbon, azot, sulf și hidrogen, similar cu ureea, cu excepția faptului că atomul de oxigen este înlocuit cu un atom de sulf. Proprietățile ureei și tioureei diferă semnificativ din cauza electronegativităților sulfurii și oxigenului [327].

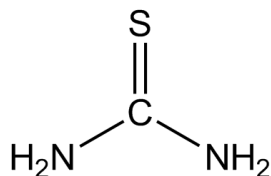
**Proprietăți chimice și fizice**

În Tabelul 3.7. sunt prezentate câteva proprietăți ale tioureei, Thio, iar în Figura 3.9. este prezentată structura sării.

**Tablelul 3.7.** Proprietăți ale tioureei [327]

<b>Caracteristici</b>	<b>Valoare/Specificitate</b>
<i>Stare de agregare</i>	Solidă, pulbere albă
<i>Tip compus</i>	Compus organosulfuric
<i>Formula moleculară</i>	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S
<i>Greutate moleculară</i>	76.12
<i>Număr de donatori de legături de hidrogen</i>	2
<i>Număr de acceptori de legături de hidrogen</i>	1
<i>Număr de legături rotative</i>	0
<i>Masa exactă</i>	76.00951931 g
<i>Masa monoizotopică</i>	76.00951931 g
<i>Suprafața topologică polară</i>	84.1 Å <sup>2</sup>
<i>Număr de atomi grei</i>	4
<i>Număr de atomi de izotopi</i>	0

- Structura

**Figura 3.9.** Structura chimică a tioureei, Thio [327]

S-au obținut 135 materiale prin funcționalizare prin impregnare. Metoda constă prin punerea în contact a extractantului dizolvat într-un solvent (apă distilată sau alcool etilic) cu suportul solid, la 298K, timp de 24 h. Suspensia obținută a fost filtrată, spălată, uscată timp de 24 de ore, la temperatura de 323 K.

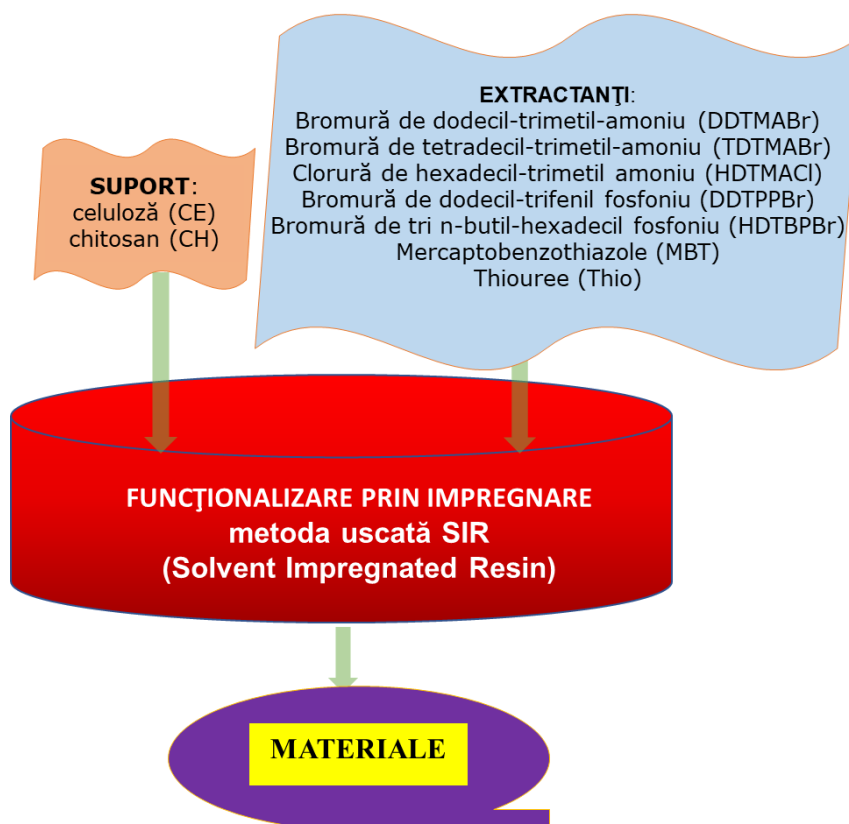
Reprezentarea schematică a modului în care au fost obținute materialele, utilizând metoda SIR (Solvent Impregnated Resin) [285] este prezentată în Figura 3.10.

Scopul acestor materiale sintetizate este de a fi utilizate ca materiale cu proprietăți antimicrobiene sau cel puțin bacteriostatice.

Pentru a putea stabili dacă materialul prezintă proprietăți bactericide, am procedat la efectuarea unor analize microbiologice, care să evidențieze comportamentul acestor materiale în prezența unui consorțiu de bacterii obținut din apa prelevată din râul Bega.

Analizele microbiologice au fost efectuate prin tehnici convenționale de cultivare, urmărind dezvoltarea microorganismelor.





**Figura 3.10.** Schema procesului de obținere a materialelor

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 [328].

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

#### *Mediul de cultură*

Pentru a fi corespunzător, mediul de cultură bacterian trebuie: (i) să conțină substanțe energetice necesare cultivării microorganismului însămânțat, adică să asigure sursa de hidrați de carbon, săruri minerale, vitamine și alți factori de creștere necesari dezvoltării și reproducerii celulelor bacteriene; (ii) să asigure cerințele de aerobioză sau anaerobioză ale agentului microbial. Această cerință este decisivă pentru dezvoltarea bacteriilor, pentru că, în timp ce bacteriile aerobe pot folosi oxigenul molecular, cele anaerobe nu se pot dezvolta în prezența oxigenului liber; (iii) să aibă pH optim și (iv) să fie steril.

Pentru toate însămânțările s-a folosit mediu de cultură complet deshidratat și s-au urmat instrucțiunile producătorului.

Mediul de cultură folosit în acest caz este: Plate Count Agar – produs de Merck.

Compoziția mediului de cultură (g pentru 1 L apă distilată) este următoarea:

- Peptonă de cazeină: 5,0 g
- Extract de drojdie: 2,5 g
- Glucoză: 1,0 g
- Agar-agar: 14,0 g.

Pentru 1 L de mediu de cultură se dizolvă 22,5 g mediu deshidratat în 1 L apă distilată. Aceasta se agită și se menține pe baia de apă până se dizolvă complet. Ulterior se sterilizează în autoclav, timp de 15 minute la 121°C.

Înainte de sterilizare se verifică pH-ul mediului de cultură, iar dacă trebuie acesta se reglează cu ajutorul soluțiilor de NaOH sau HCl până la obținerea pH-ului corespunzător, astfel încât după sterilizare pH-ul să fie circa 7,2-7,5 la 25°C. De menționat faptul că la fiecare sterilizare, pH-ul scade cu 0,2 unități de pH.

Pentru utilizare, după ce se prepară, mediul de cultură se răcește și se menține la 45±1°C cu ajutorul unei băi de apă. Mediul gata preparat nu trebuie păstrat mai mult de 4 h la 45°C.

#### *Pregătirea cutiilor Petri*

Cutiile Petri trebuie să fie spălate bine și sterilizate la autoclav.

Se folosesc doar cutii Petri uscate, perfect curate și sterilizate în prealabil.



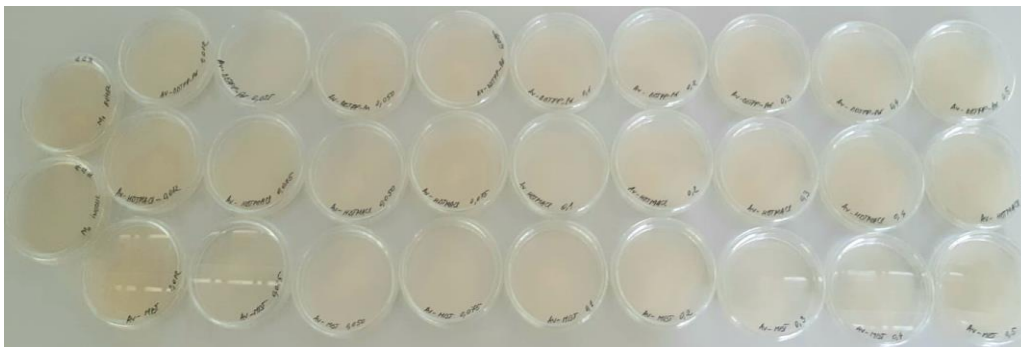
**Figura 3.11** Pregătirea cutiilor Petri pentru inoculare (sterilizare)

#### *Însămânțarea plăcilor*

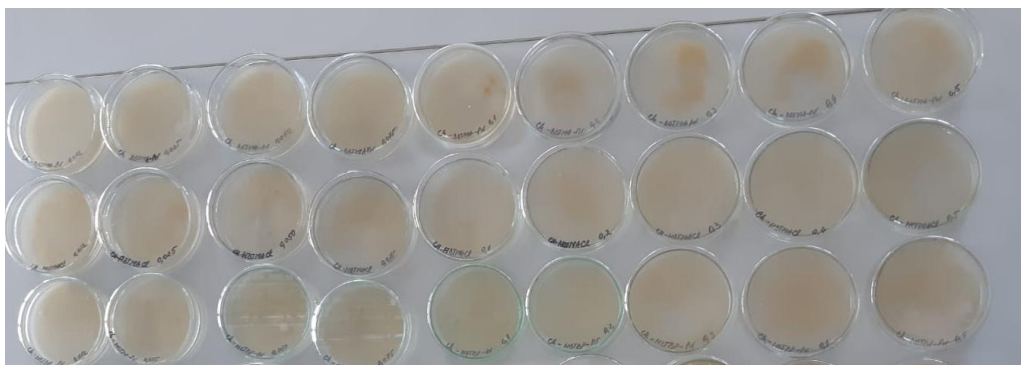
Inoculul bacterian prelevat din Bega a fost turnat pe mediul de cultură lichid, apoi a fost înglobat prin încorporare (ISO 8199). De fiecare dată s-a folosit 1 mL inocul bacterian, prelevat cu o pipetă sterilă, care a fost turnat peste mediul de cultură topit și răcit la 45°C. Cu mișcări de rotație ușoare, conținutul cutiei Petri se omogenizează pentru a fi amestecat bine. Se lasă să se solidifice și se incubează în termostat la temperatura necesară.

La fiecare set de experimente a fost însămânțată o placă Petri ce conține proba martor, constând în mediu de cultură și 1 mL inocul bacterian (M0). De asemenea, a fost însămânțată o placă Petri conținând mediu de cultură, inocul bacterian și suportul (CE sau CH) nefuncționalizat (M1). S-a folosit de fiecare dată o cantitate de suport nefuncționalizat de circa 0,2 g și 1 mL inocul bacterian. Astfel, avem asigurate condiții reale de interpretare a rezultatelor, prin raportarea datelor experimentale obținute pentru plăcile Petri însămânțate cu materialele sintetizate, la numărul total de germeni aferenți probei martor (M0), respectiv din proba care conține suport nefuncționalizat (M1).

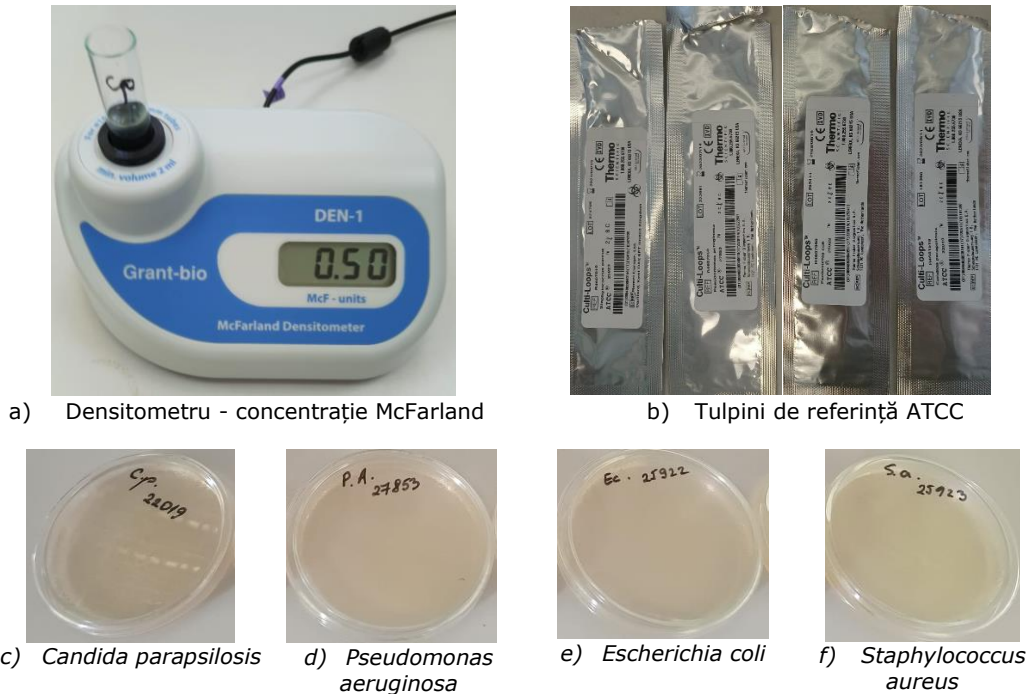
Pentru fiecare material s-au însămânțat câte trei plăci Petri. La fiecare set de experimente a fost luată în lucru o cantitate de aproximativ 0,2 g material, care a fost distribuit cât mai uniform în mediul de cultură. Pentru însămânțarea mediilor de cultură s-a utilizat de fiecare dată un inocul bacterian cu o concentrație de 0,5 McFarland (aproximativ  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL).



**Figura 3.12.** Materiale obținute prin funcționalizarea CE și testate în plăci Petri cu inocul heterotrof



**Figura 3.13.** Materiale obținute prin funcționalizarea CH și testate în plăci Petri cu inocul heterotrof



**Figura 3.14.** Pregătirea probelor pentru inoculare cu tulpini de referință

#### *Incubarea probelor*

Incubarea a constat în menținerea plăcilor Petri cu mediile de cultură însămânțate în condiții optime de temperatură. Culturile au fost incubate pentru 48 h, la o temperatura optimă de 37°C, conform SR EN ISO 6222:2004.

După inocularea și incubarea plăcilor, respectând condițiile necesare creșterii, au fost numărate coloniile de bacterii, dezvoltate pe mediul solid, cu ajutorul numărătorului automat de bacterii, YUL Flash &Go, Spania.

#### *Interpretarea rezultatelor.*

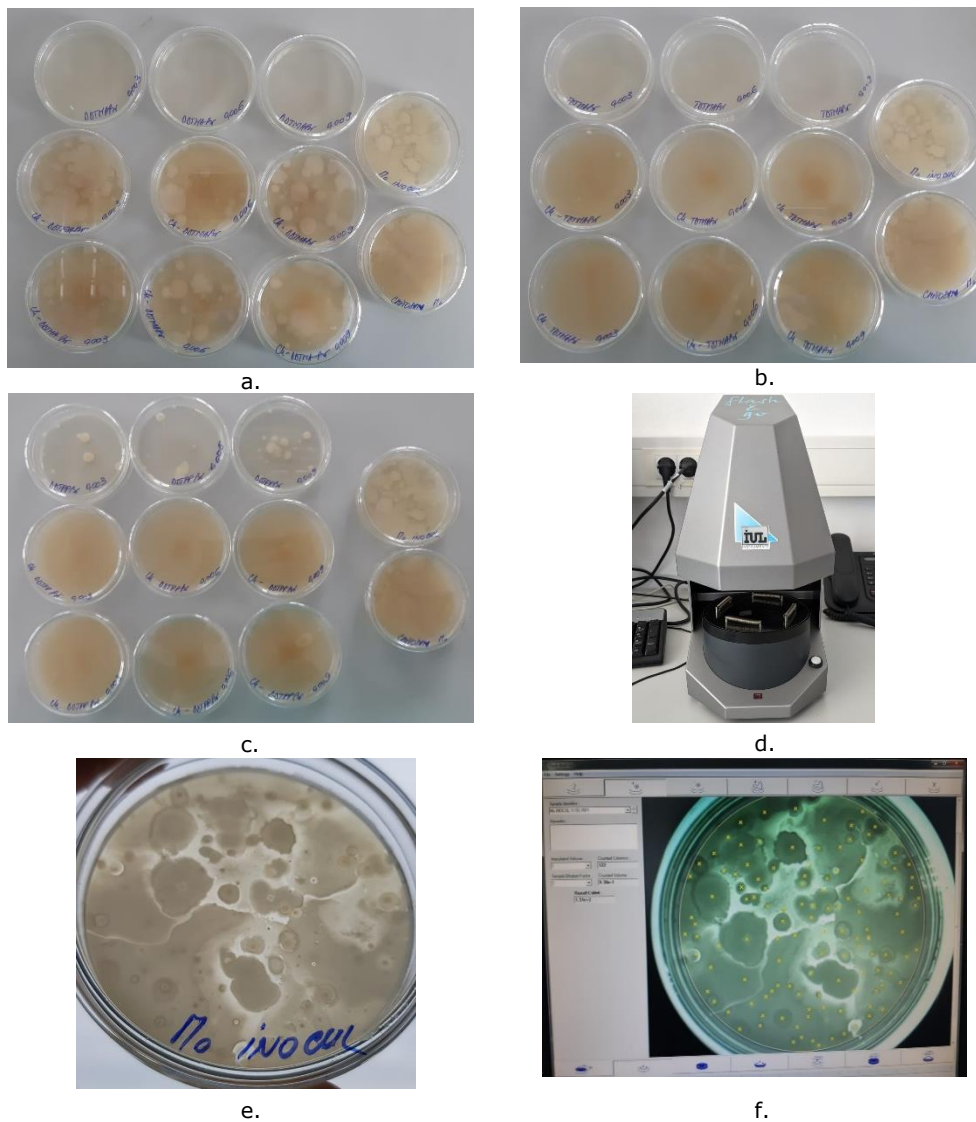
Fiecare cutie Petri însămânțată și incubată a fost analizată astfel încât să se poată face observațiile necesare cu privire la creșterea bacteriană observată.



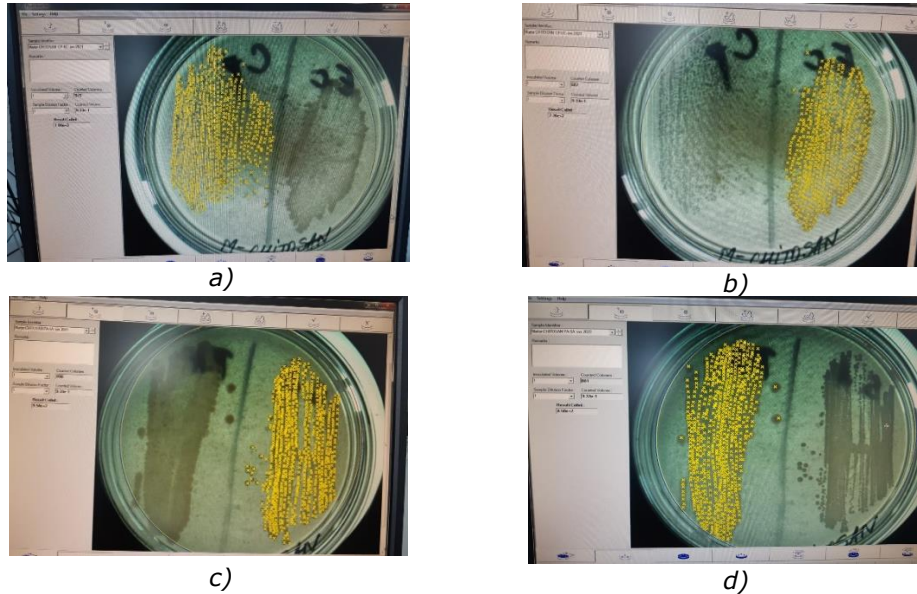
**Figura 3.15.** Materiale obținute prin funcționalizarea CE, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof și incubate



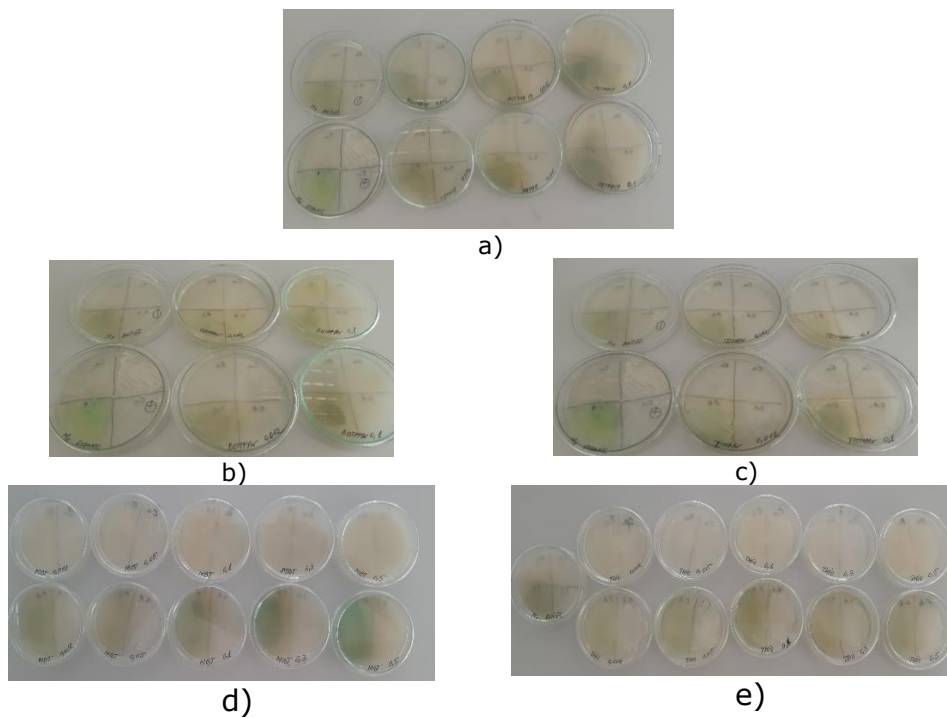
**Figura 3.16.** Materiale obținute prin funcționalizarea CH, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof și incubate



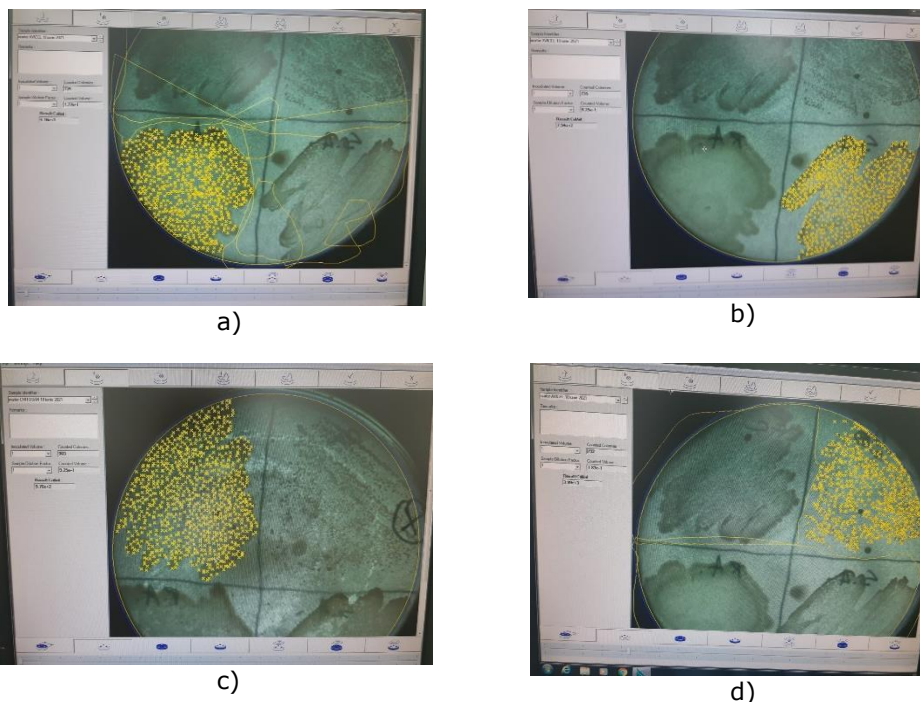
**Figura 3.17.** Materiale obținute prin funcționalizarea CH, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof după 48 h.



**Figura 3.18.** Imagini obținute cu numărătorul automat de colonii YUL Flash&Go pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH, testate în plăci Petri cu tulpini de referință



**Figura 3.19.** Materiale obținute prin funcționalizarea CE, testate în plăci Petri cu inocul heterotrof și incubate



**Figura 3.20** Imagini obținute cu numărătorul automat de colonii YUL Flash&Go pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE, testate în plăci Petri cu tulpini de referință

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 inhibiție a creșterii microbiene** [247] calculată ca raportul între numărul de unități formatoare de colonii pe materialul sintetizat ( $UFC_{test}$ ) și suportul nefuncționalizat ( $UFC_{control}$ ), exprimată ca și raport procentual, conform ecuației:

$$\text{Rata de inhibiție} = \frac{[UFC_{control} - UFC_{test}]}{UFC_{control}} \times 100$$

$UFC_{control}$  = numărul de colonii de pe placa de control

$UFC_{test}$  = numărul de colonii de pe placa de testat

Rezultatele vor fi prezentate în **CAPITOLUL 4**, respectiv **CAPITOLUL 5**.



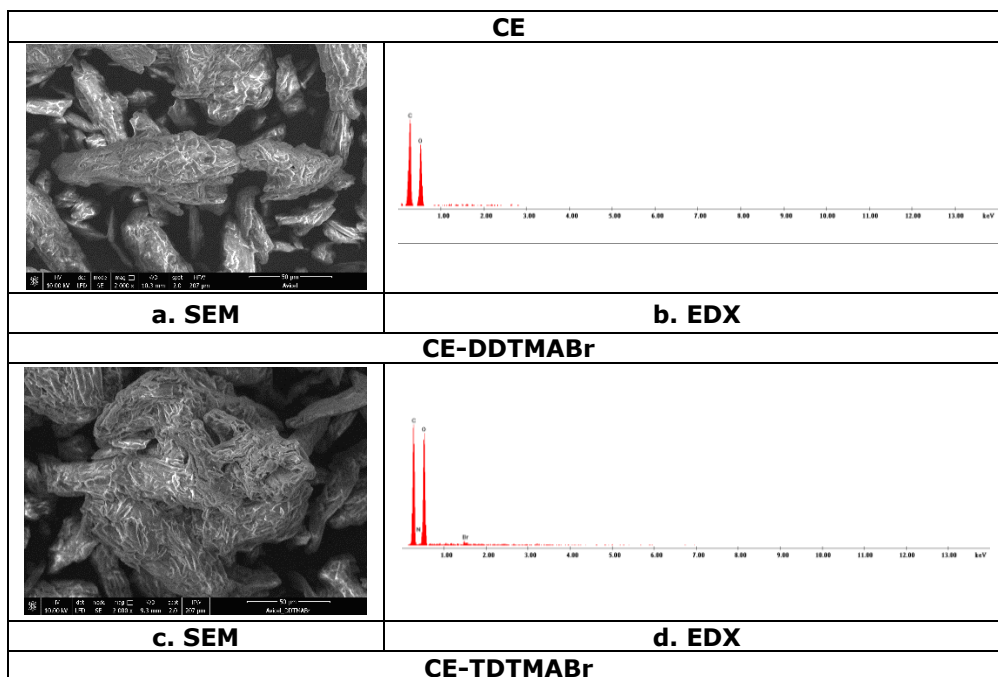
## 3.2. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor

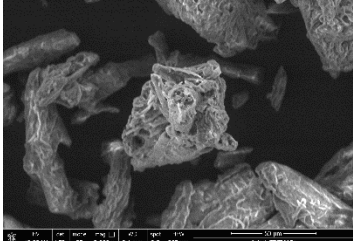
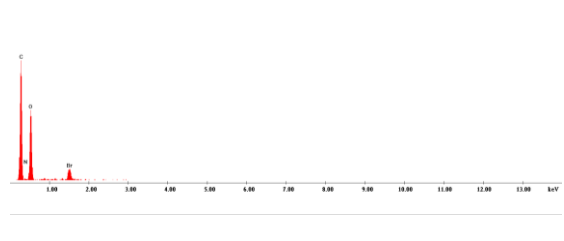
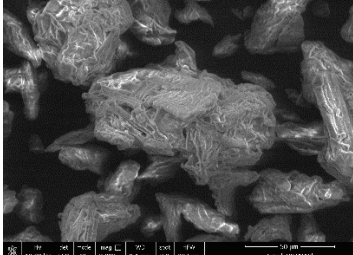
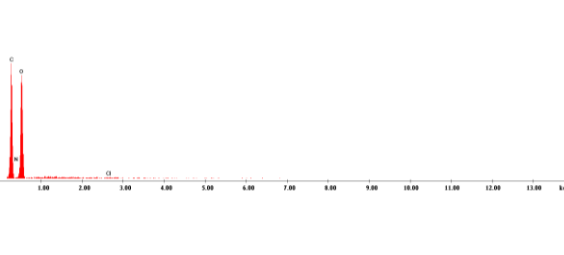
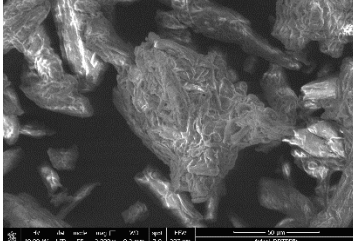
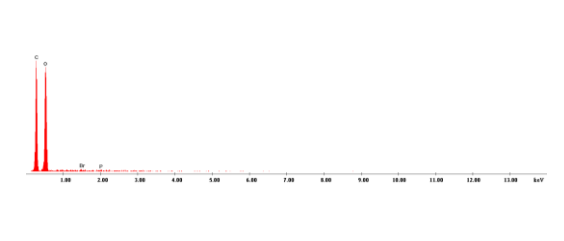
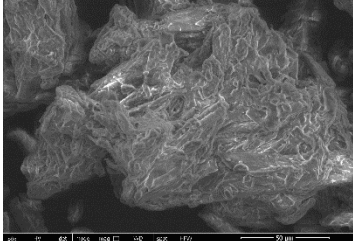
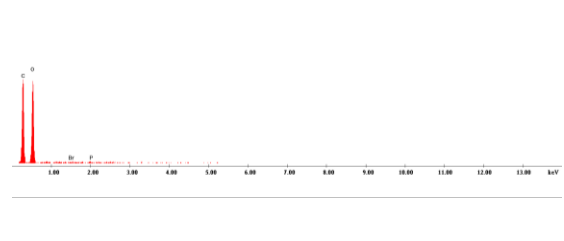
### 3.2.1. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei

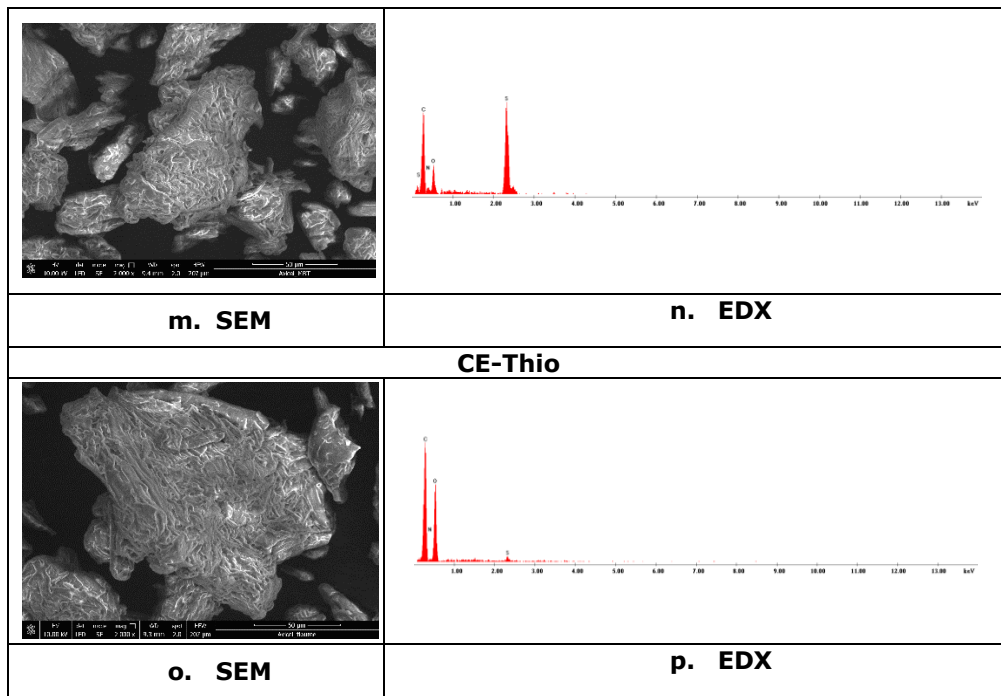
Materialele obținute prin funcționalizarea, prin impregnare a celulozei cu o serie de extractanți, în raportul masic suport:extractant=10:1, au fost caracterizate prin microscopie electronică de scanning, SEM, dispersie de energie de raze X, EDX și spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR pentru a pune în evidență prezența extractantului (DDTMABr, TDTMABr, HDTMACl, DDTPPBr, HDTBPBr, MBT și Thio) pe suprafața suportului (CE). De asemenea, s-a determinat și suprafeța specifică, diametru porilor și volumul total al porilor pentru materialele sintetizate [329, 330].

#### 3.2.1.1. Microscopie electronică de scanning, SEM și dispersie de energie de raze X, EDX

În Figura 3.21 sunt prezentate imaginile SEM și spectrele EDX pentru cele șapte materiale obținute prin funcționalizarea CE cu cei șapte extractanți, dar și pentru suport (CE).



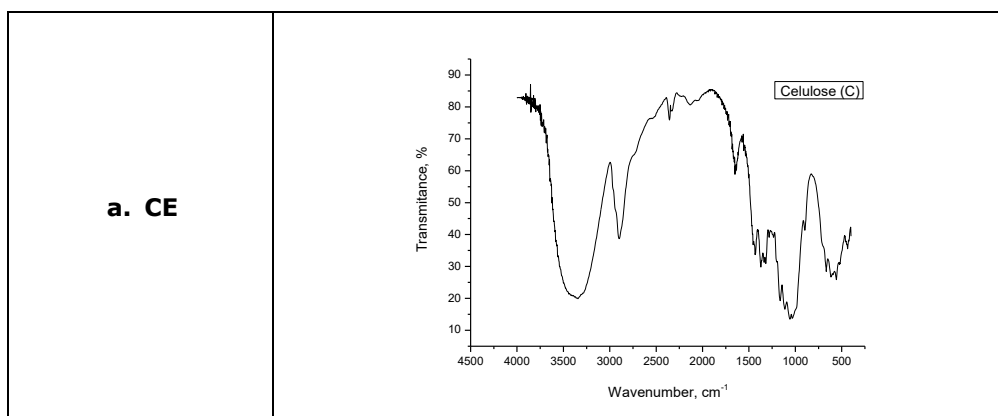
 <p><b>e. SEM</b></p>	 <p><b>f. EDX</b></p>
<b>CE-HDTMACI</b>	
 <p><b>g. SEM</b></p>	 <p><b>h. EDX</b></p>
<b>CE-DDTPPBr</b>	
 <p><b>i. SEM</b></p>	 <p><b>j. EDX</b></p>
<b>CE-HDTBPBr</b>	
 <p><b>k. SEM</b></p>	 <p><b>l. EDX</b></p>
<b>CE-MBT</b>	

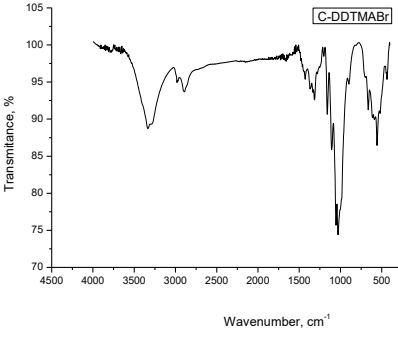
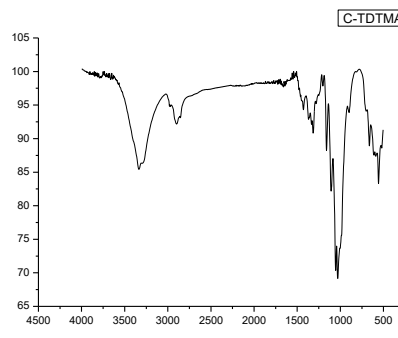
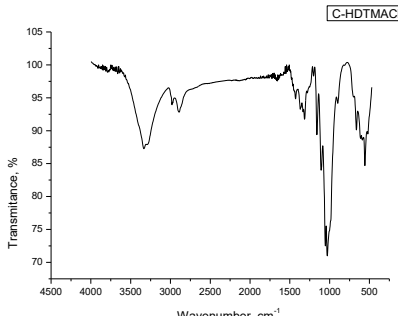
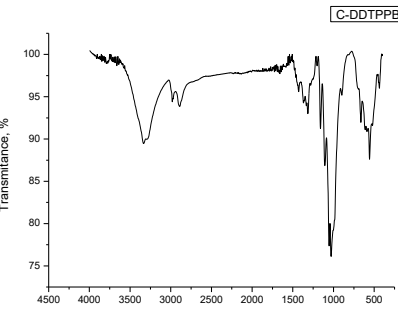


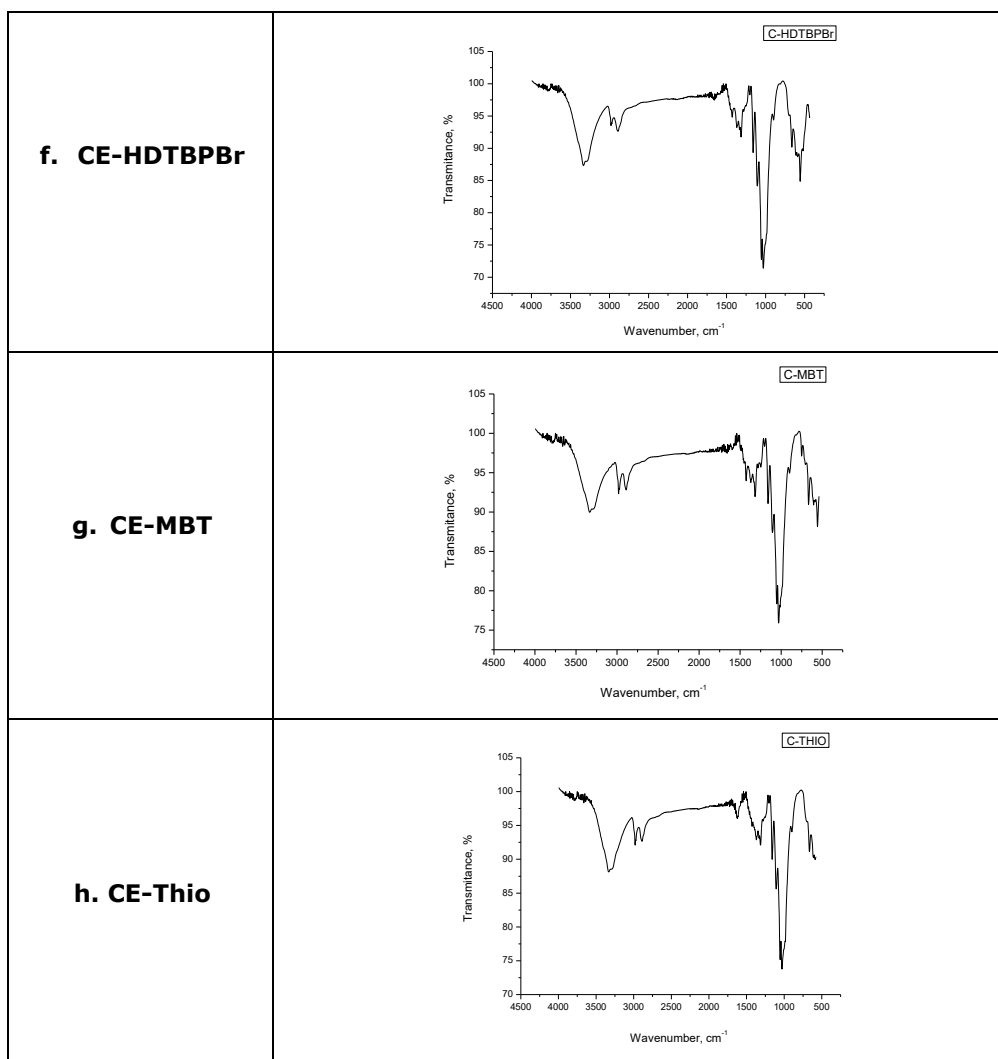
**Figura 3.21.** Microscopie electronică de scanning, SEM la magnificația de 2000 X și dispersie de energie de raze X, EDX pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți [329, 330]

### 3.2.2.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR

Spectrele FT-IR ale CE nefuncționalizată și ale materialelor obținute prin funcționalizarea prin impregnare a CE cu diferiți extractanți sunt prezentate în Figura 3.22.



<b>b. CE-DDTMABr</b>	 <p>IR spectrum of CE-DDTMABr. The y-axis is Transmittance, % (70 to 105) and the x-axis is Wavenumber, cm<sup>-1</sup> (4500 to 500). The spectrum shows characteristic absorption bands, including a broad peak around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>
<b>c. CE-TDTMABr</b>	 <p>IR spectrum of CE-TDTMABr. The y-axis is Transmittance, % (65 to 105) and the x-axis is Wavenumber, cm<sup>-1</sup> (4500 to 500). The spectrum shows characteristic absorption bands, including a broad peak around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>
<b>d. CE-HDTMACl</b>	 <p>IR spectrum of CE-HDTMACl. The y-axis is Transmittance, % (70 to 105) and the x-axis is Wavenumber, cm<sup>-1</sup> (4500 to 500). The spectrum shows characteristic absorption bands, including a broad peak around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>
<b>e. CE-DDTPPBr</b>	 <p>IR spectrum of CE-DDTPPBr. The y-axis is Transmittance, % (75 to 100) and the x-axis is Wavenumber, cm<sup>-1</sup> (4500 to 500). The spectrum shows characteristic absorption bands, including a broad peak around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>



**Figura 3.22.** Spectre FT-IR pentru CE nefuncționalizată și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți [329, 330]

În vederea identificării grupărilor funcționale specifice extractanților utilizați pentru funcționalizarea celulozei s-au efectuat spectre FT-IR celulozei și materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei cu extractanți care sunt prezentate în Figura 3.22.

Spectrul FT-IR al celulozei este suprapus cu fiecare spectru FT-IR obținut pentru materialele sintetizate. Se observă mici diferențe, datorate prezenței grupărilor active din extractanți. În Tabelul 3.8. sunt prezentate benzile specifice grupărilor din celuloză și din extractanți [334, 335].

**Tablelul 3.8.** Benzile FT-IR specifice grupărilor în CE și în materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți [329, 330]

Grupări	Benzi FT-IR (cm <sup>-1</sup> )	Observații
<b>Celuloză (CE)</b>		
O-H	3660	Bandă largă Platou mic; vibrație de stretching prezent în polizaharide
C-H	2893	
CH <sub>2</sub>	1428; 1367	Vibrații specifice structurii cristaline a celulozei
C-O	1334; 1158	
O-C-O	1104; 1027	Zonă amorfă în structura celulozei
	897	
OH <sub>2</sub>	1600-900	Vibrații specifice moleculelor de apă
	1633	
<b>CE-DDTMABr</b>		
>N-CH <sub>2</sub>	2700-2800	Legătură specifică e <sup>-</sup> neparticipanți din N
<b>CE-TDTMABr</b>		
>N-CH <sub>2</sub>	2700-2800	Legătură specifică e <sup>-</sup> neparticipanți din N
<b>CE-HDTMACI</b>		
>N-CH <sub>2</sub>	2700-2800	Legătură specifică e <sup>-</sup> neparticipanți din N
<b>CE-DDTPPBr</b>		
P-O-Aril	1190-1240	
C-O (fenil)	1200	
O-H	3500-3200	
<b>CE-HDTBPBr</b>		
P-O-Alchil	1150-1180; 1080	
<b>CE-MBT</b>		
S-C-S	568-600	Inel torsionat aromatic Vibrație de stretching
C-N	1030-1074	
C-H; N-H	1250-1320	
	750	
<b>CE-Thio</b>		
-NH <sub>2</sub>	3395	vibrație asimetrică; vibrație simetrică;
	1627	
N-H	3179; 1520	vibrație de elongație;  vibrație puternică influențată de efectele intramoleculare
C=S	1425; 1395	
	1350; 1290	
	1074	

Pe baza datelor prezentate se poate afirma faptul că celuloza a fost funcționalizată cu succes cu cei 7 extractanți luați în studiu.

### 3.2.2.3. Determinarea suprafeței specifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller)

Prin determinarea suprafeței specifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller), se obțin informații despre distribuția dimensiunii porilor, suprafața specifică a materialului studiat, dar și despre volumul total al porilor. Echipamentul utilizat este Quantachrome Nova 1200E. Probele au fost degazate în vid, timp de 5 ore, la temperatura camerei. Izotermele de adsorbție-desorbție obținute pentru toate materiale obținute prin funcționalizarea celulozei sunt prezentate în Tabelul 3.9.

**Tabelul 3.9.** Valorile ariei suprafeței specifice, diametru porilor și volumul total al porilor pentru CE și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu diferiți extractanți

Material	Suprafața specifică, m <sup>2</sup> /g	Diametrul porilor, nm	Volumul total de pori, cm <sup>3</sup> /g
CE	0,091	66,0	2,563·10 <sup>-4</sup>
CE-DDTMABr	0,002	176	6,278·10 <sup>-4</sup>
CE-TDTMABr	0,168	36,5	1,738·10 <sup>-3</sup>
CE-HDTMACI	0,082	35,1	2,335·10 <sup>-4</sup>
CE-DDTPPBr	0,574	4,96	7,536·10 <sup>-3</sup>
CE-HDTBPBr	5,429	3,08	8,529·10 <sup>-3</sup>
CE-MBT	1,356	3,84	3,968·10 <sup>-3</sup>
CE-Thio	0,773	4,36	1,077·10 <sup>-3</sup>

Din datele privind suprafața specifică, diametrul porilor și volumul total de pori a CE și a materialelor obținute prin funcționalizarea CE, prezentate în Tabelul 3.10., se poate afirma faptul că:

- suprafața specifică a materialelor CE-DDTMABr (0,002 nm) și CE-HDTMACI (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);
- 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);
- volumul total al porilor al materialului CE-DDTMABr (6,278e-04 cm<sup>3</sup>/g) este mai mic decât al CE (2,563e-04 cm<sup>3</sup>/g), iar iar a celorlalte materiale este mai mare (între 2,335e-04 cm<sup>3</sup>/g și 1,077e-03 cm<sup>3</sup>/g);

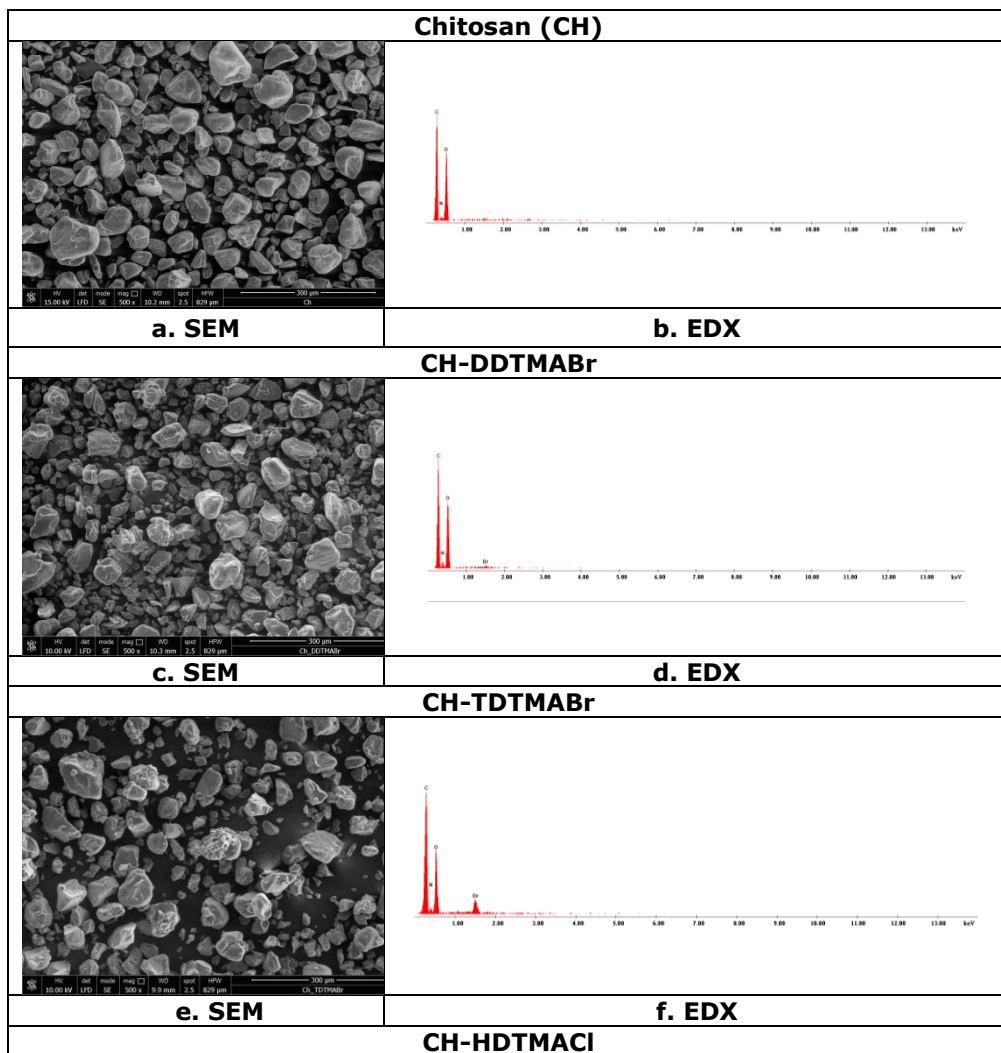
### 3.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor obținute prin funcționalizarea chitosanului

Materialele obținute prin funcționalizarea, prin impregnare, a chitosanului cu o serie de extractanți, în raportul masic support: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 (CH). De asemenea, s-a determinat

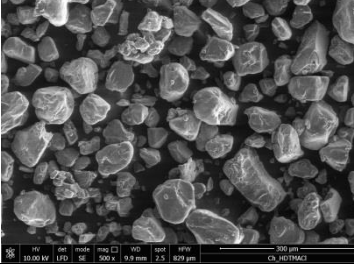
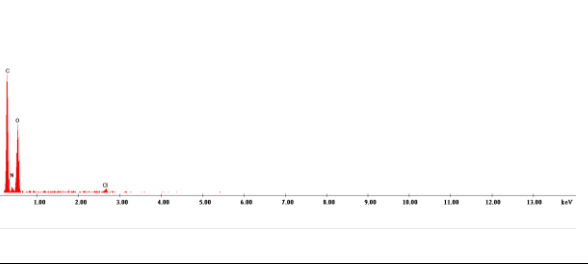
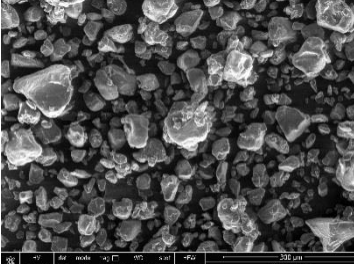
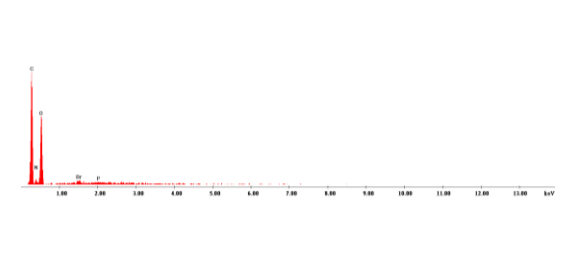
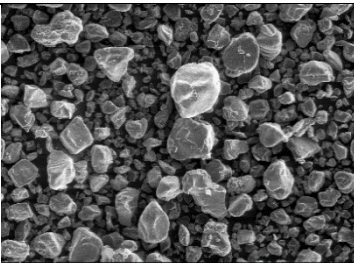
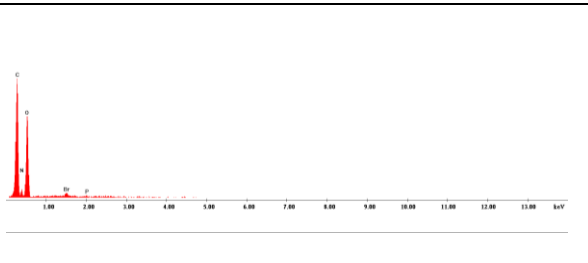
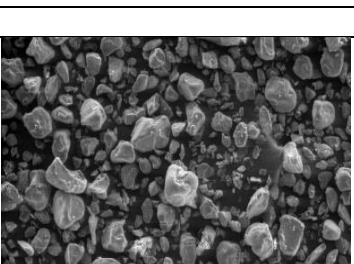
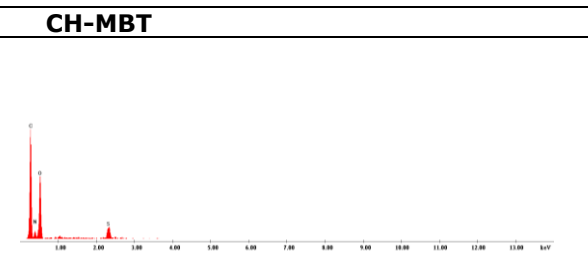
și suprafața specifică, diametru porilor și volumul total al porilor pentru materialele sintetizate [329, 330].

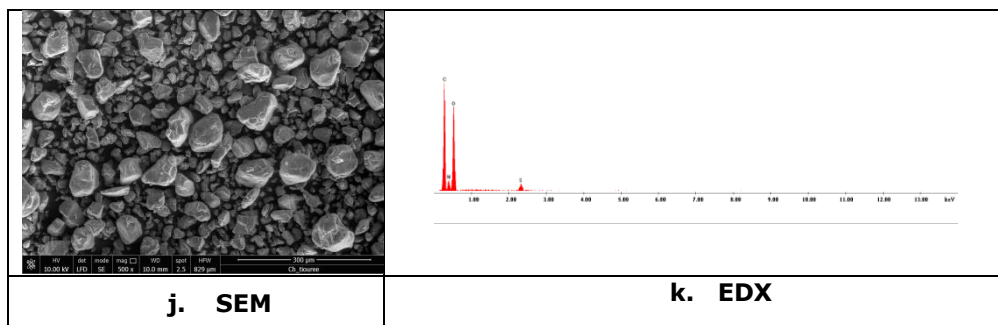
### 3.2.2.1. Microscopie electronică de scanning, SEM și dispersie de energie de raze X, EDX

În Figura 3.23 sunt prezentate imaginile SEM și spectrele EDX spectrele pentru cele șapte materiale obținute, dar și pentru suport (CH).





	
<p><b>g. SEM</b></p>	<p><b>h. EDX</b></p>
<p><b>CH-DDTPPBr</b></p>	
	
<p><b>i. SEM</b></p>	<p><b>j. EDX</b></p>
<p><b>CH-HDTBPBr</b></p>	
	
<p><b>h. SEM</b></p>	<p><b>i. EDX</b></p>
<p><b>CH-MBT</b></p>	
	
<p><b>j. SEM</b></p>	<p><b>k. EDX</b></p>
<p><b>CH-Thio</b></p>	



**Figura 3.23.** Microscopie electronică de scanning, SEM la magnificația de 2000 X și dispersie de energie de raze X, EDX pentru CH și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu diferiți extractanți [329]

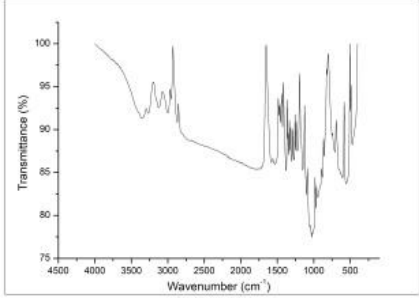
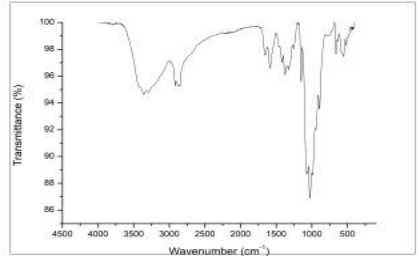
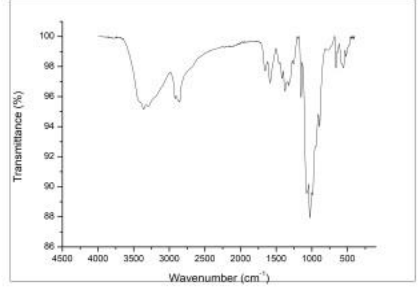
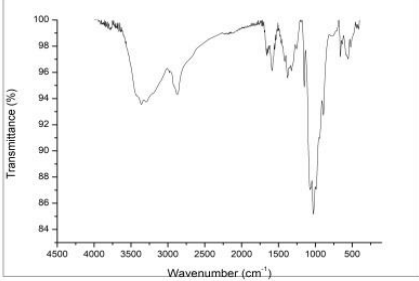
Din imaginile SEM, prezentate în Figura 3.23 se observă morfologia materialului suport, (CH), dar și a materialelor obținute în urma funcționalizării chitosanului cu cei șapte extractanți: DDTMABr, TDTMABr, HDTMACI, DDTPPBr, HDTBPBr, MBT și Thio. Imaginile SEM sunt asemănătoare, ceea ce confirmă faptul că în urma funcționalizării CH nu își schimbă morfologia. Prezintă formă grăunțoasă.

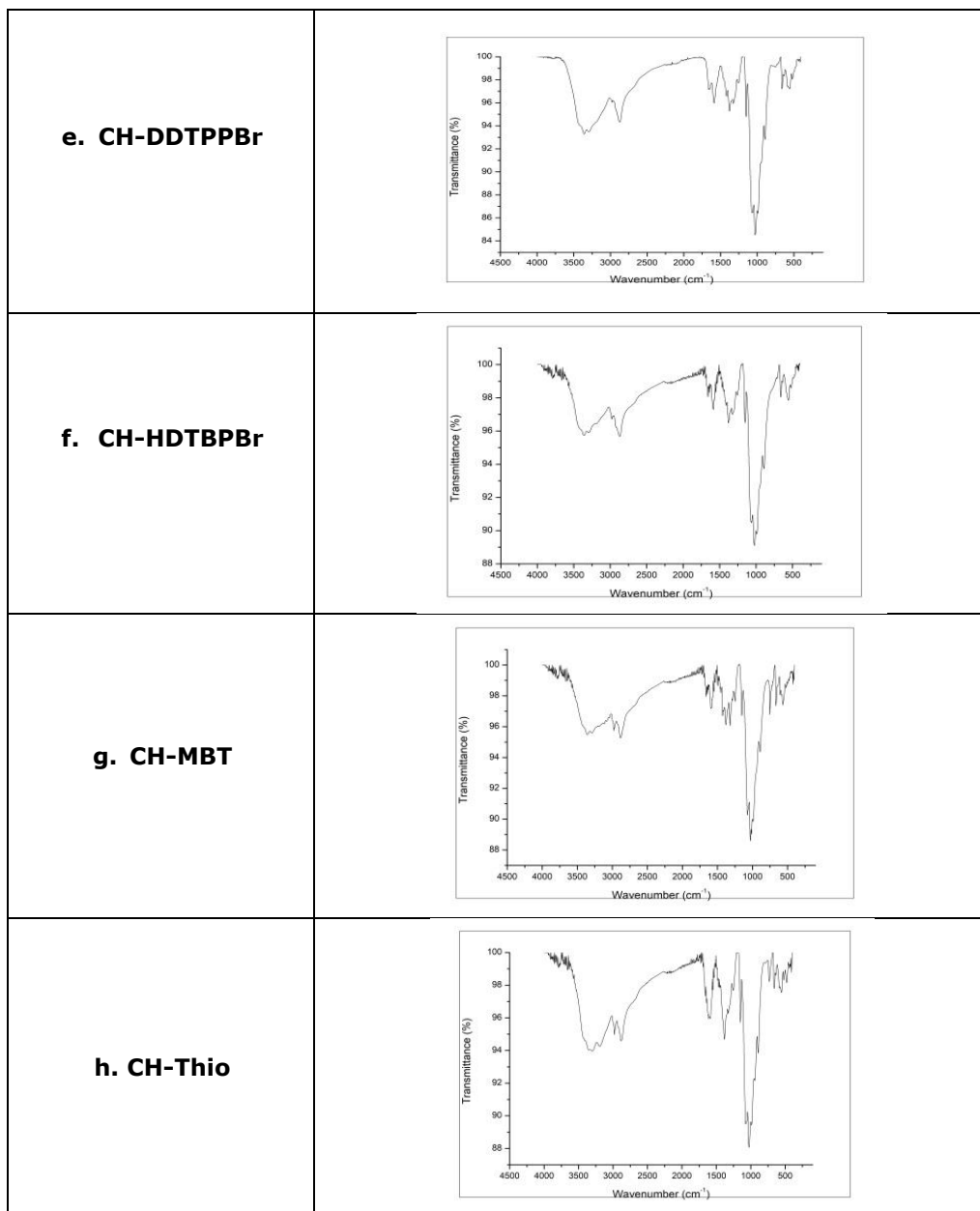
Din spectrele de dispersie de energie de raze X, EDX prezentate în Figura 3.23. se observă prezența peak-urilor specifice C, N și O, din structura chitosanului. De asemenea, se observă prezența elementelor N, P sau S specifice grupărilor existente în structura extractanților. Astfel:

- prezența DDTPPBr și a HDTBPBr pe suprafața CH este pusă în evidență prin apariția pick-urilor specifice pentru P și Br;
- prezența TDTMABr, a HDTMACI și a DDTMABr pe suprafața CH este pusă în evidență prin apariția pick-rilor specifice pentru N și Br sau N și Cl funcție de compus;
- prezența MBT și a Thio pe suprafața CH este pusă în evidență prin apariția pick-urilor specifice N și S.
- aceste pick-uri sunt de dimensiuni mici, deoarece cantitatea de extractant cu care se face funcționalizarea este relativ mică, raportul CH: extractant este 10:1.
- principalul obiectiv al obținerii spectrelor în infraroșu cu transformata Fourier constă în determinarea grupărilor funcționale ale materialelor obținute. Aceste grupări funcționale adsorb radiații IR la frecvențe caracteristice, fapt pentru care aceste spectre pun în evidență grupările funcționale specifice.

### 3.2.2.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, FT-IR

Spectrele FT-IR pentru CH și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu diferiți extractanți sunt prezentate în Figura 3.2.

<b>a. CH</b>	 <p>FTIR spectrum showing Transmittance (%) on the y-axis (75 to 100) and Wavenumber (cm<sup>-1</sup>) on the x-axis (4500 to 500). The spectrum shows a broad absorption band around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>
<b>b. CH-DDTMABr</b>	 <p>FTIR spectrum showing Transmittance (%) on the y-axis (86 to 100) and Wavenumber (cm<sup>-1</sup>) on the x-axis (4500 to 500). The spectrum shows a broad absorption band around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>
<b>c. CH-TDTMABr</b>	 <p>FTIR spectrum showing Transmittance (%) on the y-axis (86 to 100) and Wavenumber (cm<sup>-1</sup>) on the x-axis (4500 to 500). The spectrum shows a broad absorption band around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>
<b>d. CH-HDTMACl</b>	 <p>FTIR spectrum showing Transmittance (%) on the y-axis (84 to 100) and Wavenumber (cm<sup>-1</sup>) on the x-axis (4500 to 500). The spectrum shows a broad absorption band around 3400 cm<sup>-1</sup>, a sharp peak at approximately 1650 cm<sup>-1</sup>, and several peaks in the fingerprint region between 1500 and 500 cm<sup>-1</sup>.</p>



**Figura 3.24.** Spectre FT-IR pentru CH și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu diferiți extractanți [329]

În Tabelul 3.10 sunt prezentate benzile specifice grupărilor chitosanului și extractanților.

**Tabelul 3.10.** Benzile IR specifice grupărilor prezente în CH și în materialele obținute prin funcționalizarea CH cu extractanți [329]

Grupări	Benzi FT-IR (cm <sup>-1</sup> )	Observații
<b>Chitosan (CH)</b>		
CH <sub>2</sub> -OH N-H C=O C-H O-H	1350-1420 1570 1660 2870; 2924 3430	
<b>CH-DDTMABr</b>		
>N-CH <sub>2</sub>	2700-2800	specific e <sup>-</sup> neparticipanți de la N
<b>CH-DDTMABr</b>		
>N-CH <sub>2</sub>	2700-2800	specific e <sup>-</sup> neparticipanți de la N
<b>CH-HDTMACI</b>		
>N-CH <sub>2</sub>	2700-2800	specific e <sup>-</sup> neparticipanți de la N
<b>CH-DDTPPBr</b>		
P-O-Aril C-O (fenil) O-H	1190-1240 1200 3500-3200	
<b>CH-HDTBPBr</b>		
Fosfați de alchil	1150-1180; 1080	
<b>CH-MBT</b>		
Inel aromatic - torsiune S-C-S C-N întindere C-H; N-H	568-600 1030-1074 1250-1320 750	
<b>CH-Thio</b>		
N-H C=S	1520 1074	

Pe baza datelor prezentate se poate afirma faptul că chitosanul a fost funcționalizat cu succes cu cei 7 extractanți luați în studiu.

### 3.2.2.3. Determinarea suprafeței specifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller)

Prin determinarea suprafeței specifice prin metoda BET (Brunauer, Emmett, Teller), se obțin informații despre distribuția dimensiunii porilor, suprafața specifică a materialului studiat, dar și despre volumul total al porilor. Echipamentul utilizat este Quantachrome Nova 1200E. Probele au fost degazate în vid, timp de 5 ore, la temperatura camerei. Izotermele de adsorbție-desorbție obținute pentru toate materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului sunt prezentate în Tabelul 3.11.

**Tabelul 3.11.** Valorile ariei suprafeței specifice, diametru porilor și volumul total al porilor pentru CH și pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu diferiți extractanți

Material	Suprafața specifică, m <sup>2</sup> /g	Diametrul porilor, nm	Volumul total de pori, cm <sup>3</sup> /g
CH	15,2	3,414	1,493·10 <sup>-2</sup>
CH-DDTMABr	4,05	3,077	4,992·10 <sup>-3</sup>
CH-TDTMABr	3,30	3,076	3,948·10 <sup>-3</sup>
CH-HDTMACl	3,20	3,086	3,823·10 <sup>-3</sup>
CH-DDTPPBr	4,69	3,123	2,907·10 <sup>-4</sup>
CH-HDTBPBr	0,47	3,072	5,938·10 <sup>-4</sup>
CH-MBT	3,36	3,440	5,103·10 <sup>-3</sup>
CH-Thio	4,96	3,434	5,723·10 <sup>-3</sup>

Din datele privind suprafața specifică, diametrul porilor și volumul total de pori a CH și a materialelor obținute prin funcționalizarea CH, prezentate în Tabelul 3.12., se poate afirma faptul că:

- suprafața specifică a materialelor este mai mică decât a CH;
- diametrul porilor materialelor este aproximativ asemănător cu al CH;
- volumul total al porilor materialelor este mai mic decât al CH;

## Concluzii

Pornind de la **obiectivul general** al tezei de doctorat care este de a obține noi materiale prin funcționalizare prin impregnare, cu proprietăți antimicrobiene, **obiectivele specifice** ale acestui capitol al tezei de doctorat au fost: (i) obținerea materialelor funcționalizate prin impregnare; (ii) caracterizarea fizico-chimică și testarea materialelor obținute, prin teste microbiologice pe inocul heterotrof; (iii) stabilirea condițiilor optime de sinteză și (iv) stabilirea rapoartelor optime de lucru;

Astfel, s-au obținut 135 materiale prin funcționalizare prin impregnare, prin metoda SIR (Solvent Impregnated Resin), a **suporturilor**: (i) **celuloză** (CE) și (ii) **chitosan** (CH) cu **extractanții**: (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 cu fosfoniu** (bromură de dodecil-trifenil-fosfoniu (DDTPPBr), bromură de tri n-butyl-hexadecil-fosfoniu (HDTBPBr)) sau (iii) **săruri cu sulf și azot** (tiouree (Thio), 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 în care suportul a fost chitosanul, iar extractanți au fost sărurile de amoniu, respectiv DDTPPBr, s-au sintetizat materiale la rapoarte masice 1:0,003; 1:0,006; 1:0,009, întrucât rezultatele analizelor microbiologice au necesitat scăderea conținutului de extractant, pentru atingerea unui raport la care să poată fi observată creștere microbiană.

Pentru a putea stabili dacă materialul prezintă proprietăți bactericide, s-a procedat la efectuarea unor studii microbiologice, care să evedențieze 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 inhibiție a creșterii microbiene**.

**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, HDTMACl, DDTPPBr, HDTBPBr, MBT și Thio) pe suprafața suportului (CE sau CH). De asemenea, s-a determinat și suprafața specifică, diametru porilor și volumul total al porilor pentru materialele sintetizate. Astfel:

- În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE 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 morfologiei suprafeței.
- În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea, prin impregnare a CH s-au constatat din imaginile SEM faptul că morfologia materialelor obținute în urma funcționalizării CH nu se modifică semnificativ față de materialului suport, (CH). Prezintă formă grăunțoasă.
- Din spectrele EDX se observă peak-urile specifice compoziției CE și anume C și O, sau peak-urile specifice C, N și O, din structura CH. Totodată sunt prezentate spectrele EDX caracteristice materialelor sintetizate prin funcționalizarea CE, în care se observă peak-urile specifice elementelor prezente în compoziția CE, 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 pentru 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 CE cât și CH au fost funcționalizați cu succes cu cei 7 extractanți luați în studiu.

Din datele privind suprafața specifică, diametrul porilor și volumul total de pori a CE și a materialelor obținute prin funcționalizarea CE, se poate afirma faptul că:

- suprafața specifică a materialelor CE-DDTMABr (0,002 nm) și CE-HDTMACI (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);
- 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);
- volumul total al porilor al materialului CE- DDTMABr ( $6,278e-04 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) este mai mic decât al CE ( $2,563e-04 \text{ cm}^3/\text{g}$ ), iar a celorlalte materiale este mai mare (între  $2,335e-04 \text{ cm}^3/\text{g}$  și  $1,077e-03 \text{ cm}^3/\text{g}$ ).

Din datele privind suprafața specifică, diametrul porilor și volumul total de pori a CE și a materialelor obținute prin funcționalizarea CH, se poate afirma faptul că:

- suprafața specifică a materialelor este mai mică decât a CH;
- diametrul porilor materialelor este aproximativ asemănător cu al CH;
- volumul total al porilor al materialelor este mai mic decât al CH.



## CAPITOLUL 4.

### APLICAȚII MICROBIOLOGICE ALE CELULOZEI FUNCȚIONALIZATE

Materialele polimerice antimicrobiene sunt alternative bune la substanțele antimicrobiene moleculare convenționale, datorită caracteristicilor lor unice.

Polimerii și derivații polimerici cu proprietăți antimicrobiene intrinseci prezintă un mare interes pentru dezvoltarea de noi antibiotice atât pentru a combate tendința de creștere a rezistenței antimicrobiene a organismelor, cât și pentru a găsi materiale utile pentru tratamentul infecțiilor patogene cu mai multe caracteristici specifice.

Biomaterialele vegetale au diverse avantaje, cum ar fi regenerabilitatea, biodegradabilitatea și respectarea mediului, prin urmare, ele pot fi folosite ca înlocuitori adecvați pentru materialele pe bază de petrol, ca mijloc de depășire a problemelor de mediu. Astfel, celuloza este cel mai abundent tip de materie organică regenerabilă de pe Pământ.

Materialele vegetale pe bază de bio au diverse avantaje, cum ar fi regenerabilitatea, biodegradabilitatea și respectarea mediului, prin urmare, ele pot fi folosite ca înlocuitori adecvați pentru materialele pe bază de petrol, ca mijloc de depășire a problemelor de mediu.

Structurarea versatilă a celulozei prin diferite căi de modificare, inclusiv metode fizice și chimice, a permis utilizarea acestora într-o varietate de aplicații, de exemplu, materiale de umplutură, materiale de construcție și acoperire, laminate, hârtie, textile, filme optice, medii de sorbție, regulatori de vâscozitate și chiar materiale funcționalizate avansate [174, 192].

#### 4.1. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cuaternare de amoniu [329], [240]

##### 4.1.1. Studii pentru stabilirea raportului optim celuloză: săruri cuaternare de amoniu

Pentru stabilirea **raportului optim celuloză: săruri cuaternare de amoniu**, în vederea obținerii unor materiale care să prezinte activitate antimicrobiană foarte bună ( $R.I > 95\%$ ) s-au efectuat analize microbiologice, prin tehnici convenționale de cultivare, urmărind dezvoltarea microorganismelor pe mediu de creștere neselectiv. După incubarea corespunzătoare, a fost evaluată creșterea cantitativă a coloniilor bacteriene, prin determinarea numărului total probabil de colonii bacteriene dezvoltate pe mediul de cultură (UFC/mL).

Pentru a putea stabili dacă CE, respectiv materialele obținute prin funcționalizarea CE prezintă proprietăți bactericide, am procedat la efectuarea unor studii microbiologice, care să evidențieze comportamentul acestor materiale în prezența unui consorțiu de bacterii heterotrofe, Gram-pozitive și Gram-negativ. Utilizarea unui inocul bacterian complex, cu bacterii heterotrofe, a fost preferată pentru testarea materialelor deoarece studiul comportamentului unui consorțiu bacterian provenit din mediu natural este preferabil în cazul studiului preliminar pe

un material nou sintetizat, față de efectul obținut asupra unei singure specii bacteriene.

Pentru a stabili raportul cel mai mic dintre CE și extractantul utilizat, cu activitate bactericidă asupra inoculului bacterian heterotrof, fiecare material a fost inoculat în mediu de cultură și incubat timp de 48 h la 310 K, după care s-a determinat numărul total de colonii, raportat la proba de control, M1, corespunzătoare CE nefuncționalizată, respectiv proba martor, M0, corespunzătoare inoculului microbian. Testele au fost efectuate în 3 repetări.

Raportul la care a fost observată absența completă a creșterii microbiene a fost considerat **raportul optim**, minim necesar, care produce efect bactericid total. În situația în care totuși a fost observată creștere microbiană pe mediile de cultură, efectul antimicrobian semnificativ, respectiv raport optim CE:extractant a fost considerat cel la care rata de inhibiție microbiană calculată a avut cea mai mare valoare.

Efect bactericid total a fost considerat acolo unde rata de inhibiție a creșterii bacteriene a fost de 100%.

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.1. și Figurile 4.1.- 4.3.

**Tabelul 4.1.** Influența raportului CE: săruri cuaternare de amoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu

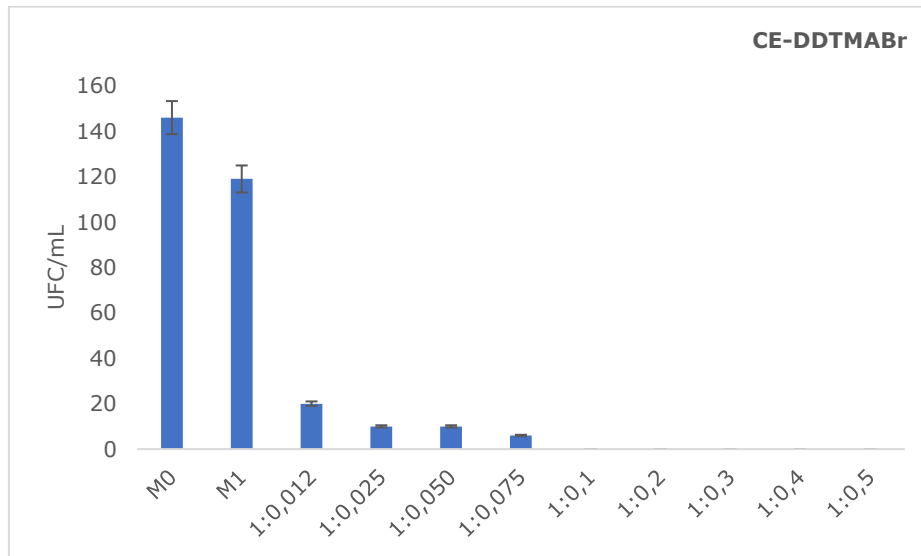
Raport CE:sare cuaternară de amoniu	Număr unități formatoare de colonii		
	CE-sare cuaternară de amoniu		
	Bromură de dodecil-trimetil- amoniu (DDTMABr)	Bromură de tetradecil- trimetil-amoniu (TDTMABr)	Clorură de hexadecil- trimetil amoniu (HDTMACl)
1:0,012	20	16	25
1:0,025	10	7	21
1:0,05	10	7	16
1:0,075	6	5	11
<b>1:0,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
1:0,2	0	0	0
1:0,3	0	0	0
1:0,4	0	0	0
1:0,5	0	0	0
<b>MARTOR (M0) inocul</b>	145		
<b>CE nefuncționalizată (M1)</b>	119		

Din analiza Tabelului 4.1 se constată faptul că proba de CE nefuncționalizată (M1) prezintă efect antimicrobian nesemnificativ, de circa 17,9%, comparativ cu proba martor (M0).

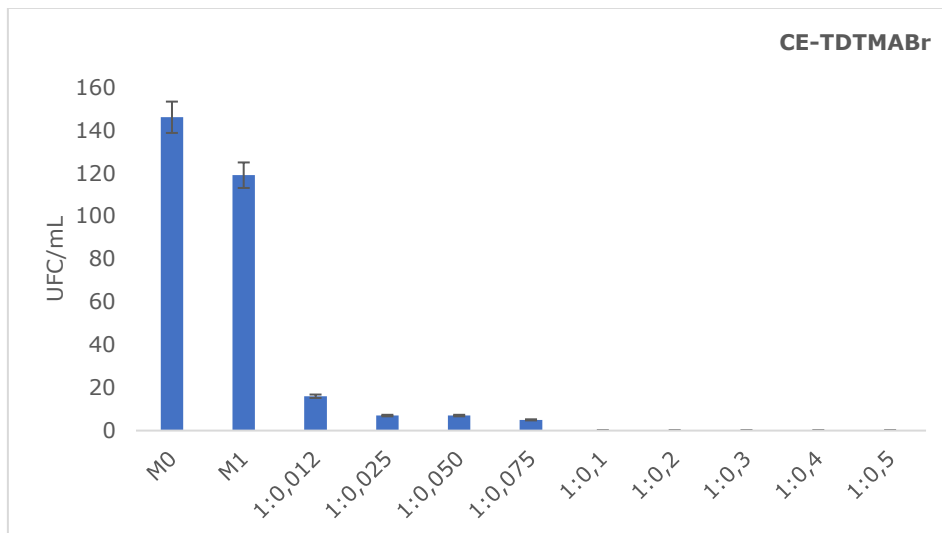
În cazul celor trei materiale obținute prin funcționalizarea CE cu sărurile cuaternare de amoniu (DDTMABr, TDTMABr și HDTMACl), raportul optim CE: săruri

4.1. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei  
cu săruri cuaternare de amoniu | 83

cuaternare de amoniu, la care s-a observat activitate antimicrobiană maximă a fost raportul CE: săruri cuaternare de amoniu = 1:0,1 când rata de inhibiție a creșterii bacteriene a fost de 100%.

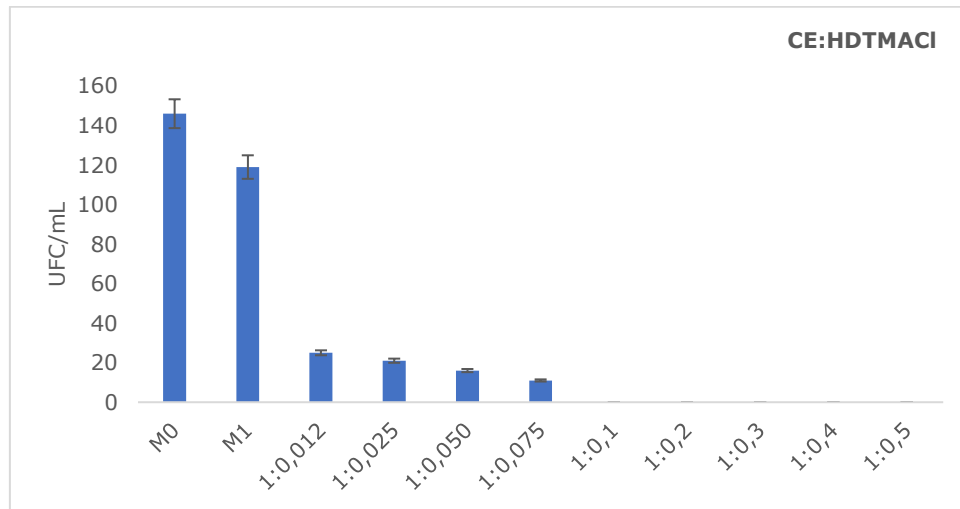


**Figura 4.1.** Comparație între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materiale CE-DDTMABr la diferite rapoarte de funcționare



**Figura 4.2.** Comparație între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materiale CE-TDTMABr la diferite rapoarte de funcționare

Rata de inhibiție a creșterii bacteriene în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu DDTMABr și cu TDTMABr la rapoarte CE: DDTMABr și CE:TDTMABr mai mici de 1:0,1 este comparabilă pentru ambele materiale CE-DDTMABr și CE-TDTMABr.



**Figura 4.3.** Comparație între proba martor (M0) – CE nefuncționalizată (M1)- materiale CE-HDTMACl la diferite rapoarte de funcționalizare

Materialul CE-HDTMACl a manifestat efect bactericid total, la raportul de funcționalizare CE:HDTMACl = 1:0,1. Însă, rata de inhibiție a creșterii bacteriene calculată pentru materialul CE-HDTMACl, la toate rapoartele de funcționalizare mai mici de 1:0,1 a fost ușor mai scăzută comparativ cu cea calculată pentru materialul CE-TDTMABr și respectiv materialul CE-DDTMABr.

În consecință, **raport optim CE: săruri cuaternare de amoniu** pentru ca materialele să prezinte efect bactericid total în cazul extractanților săruri cuaternare de amoniu a fost considerat **raportul CE: săruri cuaternare de amoniu = 1:0,1**.

#### 4.1.2. Efectul antimicrobian al materialelor cu săruri cuaternare de amoniu asupra tulpinilor microbiene de referință

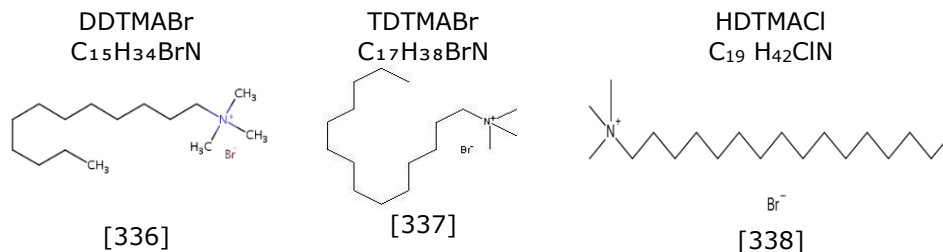
Au fost testate efectele materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cuaternare de amoniu asupra a patru tulpini de referință, în tabelul 4.2 fiind prezentată rata de inhibiție a creșterii microbiene, calculată pentru fiecare material testat.

**Tabelul 4.2.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu

Material	Raport CE: sare cuaternară de amoniu	Rata de inhibiție (%)			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Celuloză (CE)	-	2,8	7,7	20	12,2
CE-DDTMABr	1:0,012	100	40,8	100	100
	1:0,1	100	52,8	100	100
CE-TDTMABr	1:0,012	100	49,9	100	100
	1:0,1	100	54,8	100	100
CE-HDTMACI	1:0,012	100	17,0	53,4	100
	1:0,05	100	34,3	58,1	100
	1:0,1	100	40,8	67,5	100

Celuloza (CE) nefuncționalizată a manifestat efect bactericid ușor mai bun asupra bacteriilor Gram-negative, comparativ cu cele Gram-pozitive. Toate materialele obținute prin funcționalizarea CE cu sărurile cuaternare de amoniu (DDTMABr, TDTMABr, HDTMACI), au arătat activitate antibacteriană foarte bună asupra *S. aureus* și *C. albicans*, indiferent de raportul CE: săruri cuaternare de amoniu. Posibil ca acest efect să se datoreze comportării similare a peretelui celular de la *S. aureus* cu celula fungică a speciei *C. albicans*. Extractantul 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 [329].

De asemenea asupra tulpinii de *E. coli* efectul bactericid a fost maxim în cazul utilizării materialelor CE-DDTMABr și CE-TDTMABr, în timp ce pentru materialul CE-HDTMACI cea mai mare rată de inhibiție a fost de 67,5 %, corespunzătoare raportului de funcționalizare CE:HDTMACI = 1:0,1. O posibilă explicație ar fi aceea că un rol deosebit de important în exercitarea efectului antibacterian îl are componenta hidrofobă dată de radicalul alchil al sării cuaternare de amoniu. Pe de altă parte intervine distanța de la sarcina pozitivă dată de azotul din sarea cuaternară, până la scheletul de bază al CE, respectiv conformația brațului alchil care formează catena extractantului și distanțează gruparea pendentă (Figura 4.4.). Lungimea brațului alchil, deși diferă doar prin câte 2 atomi de carbon, în ordinea dodecil, tetradecil, hexadecil, tinde să adopte conformații diferite [240] și implicit distanța pe care o determină brațul alchil față de scheletul celulozei crește în ordinea: TDTMABr > DDTMABr > HDTMACI. De aceea, cel mai puternic efect antibacterian are materialul CE- TDTMABr, indiferent de raportul de funcționalizare, CE: sare cuaternară de amoniu, luat în studiu.



**Figura 4.4.** Comparație conformeri, extractanți săruri cuternare de amoniu

În privința efectului asupra *P. aeruginosa*, toate materialele testate au prezentat efect bactericid, direct proporțional cu raportul CE:sare cuaternară de amoniu utilizat pentru obținerea materialelor. Nu a fost atinsă rata de inhibiție maximă, pentru niciun material, probabil fiind necesară o cantitate de biocid/extractant mult mai mare. Membrana externă a celulei bacteriene la *P. aeruginosa* este o barieră selectivă importantă, ceea ce determină o adsorbție redusă a biocidului în celulă datorită susceptibilității reduse a acestei specii pentru agenți biocizi.

Astfel, materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu pot fi utilizate cu succes ca materiale cu proprietăți antibacteriene.

## 4.2. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu extractanți care conțin săruri de fosfoniu

### 4.2.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CE: sare de fosfoniu

Pentru stabilirea **raportului optim celuloză: sare de fosfoniu**, în vederea obținerii unor materiale care să prezinte activitate antimicrobiană foarte bună (R.I > 95%) s-au efectuat analize microbiologice, prin tehnici convenționale de cultivare, urmărind dezvoltarea microorganismelor pe mediu de creștere neselectiv. După incubarea corespunzătoare, a fost evaluată creșterea cantitativă a coloniilor bacteriene, prin determinarea numărului total probabil de colonii bacteriene dezvoltate pe mediul de cultură (UFC/mL).

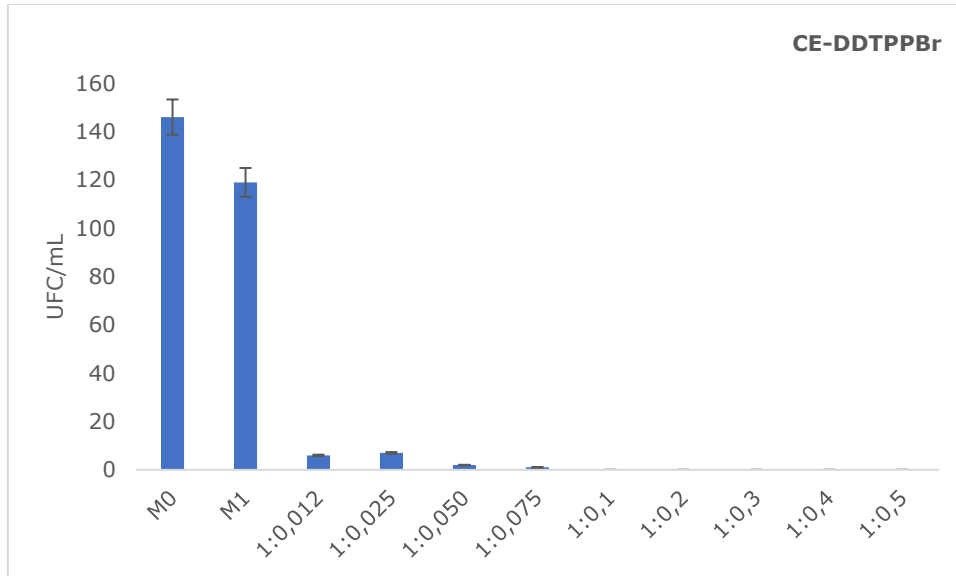
Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.3. și Figurile 4.5.- 4.7.

**Tabelul 4.3.** Influența raportului CE:sare de fosfoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu

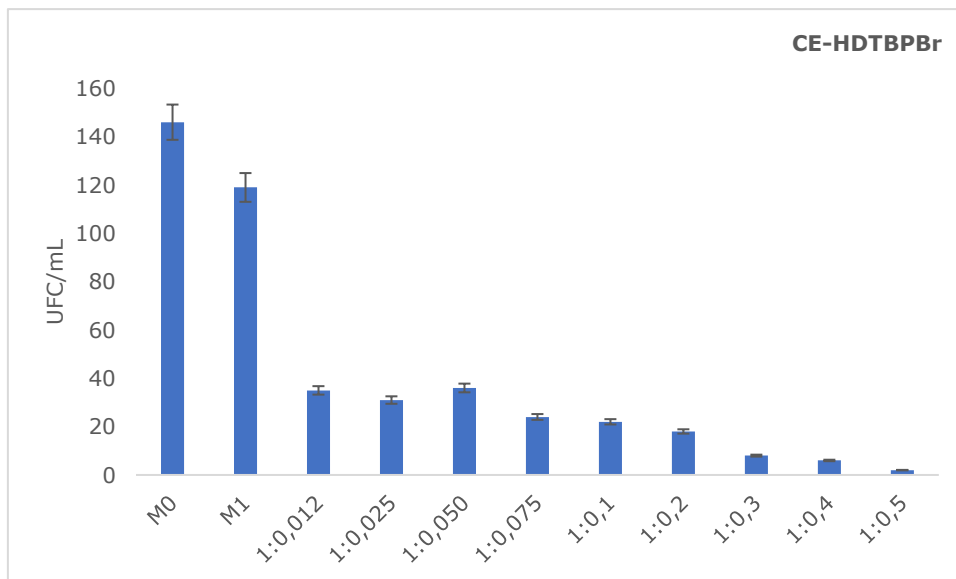
Raport CE:sare de fosfoniu	Număr unități formatoare de colonii	
	CE-sare de fosfoniu	
	Bromură de dodecil-trifenil fosfoniu (DDTPPBr)	Bromură de tri n-butil-hexadecil fosfoniu (HDTBPBr)
1:0,012	6	35
1:0,025	7	31
1:0,05	2	26
1:0,075	1	24
<b>1:0,1</b>	<b>0</b>	22
1:0,2	0	18
1:0,3	0	8
1:0,4	0	6
1:0,5	0	<b>2</b>
<b>MARTOR (M0) inocul</b>	145	
<b>CE nefuncționalizată (M1)</b>	119	

Indiferent de sarea de fosfoniu utilizată pentru funcționalizarea CE, se constată că activitatea antimicrobiană a materialului obținut este direct proporțională cu creșterea raportului CE:sare de fosfoniu.

În cazul utilizării ca și extractanți, săruri de fosfoniu, materialul CE-DDTPPBr a manifestat efect antimicrobian total la raportul de funcționalizare CE:DDTPPBr = 1:0,1 (Figura 4.5.), în timp ce materialul CE-HDTBPBr a manifestat efect antimicrobian foarte bun începând cu raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr = 1:0,3, însă nu a prezentat efect bactericid total nici la raportul CE:HDTBPBr = 1:0,5 (Figura 4.6).



**Figura 4.5.** Comparație între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-DDTPPBr la diferite rapoarte de funcționizare



**Figura 4.6.** Comparație între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-HDTBPBr la diferite rapoarte de funcționizare



În consecință, pentru a obține activitate antimicrobiană bună în cazul materialului CE-DDTPPBr, **raport optim** este considerat raportul **CE:DDTPPBr = 1:0,1**, iar pentru materialul CE-HDTBPBr raportul optim este **CE:HDTBPBr = 1:0,5**.

#### 4.2.2.Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu asupra tulpinilor microbiene de referință

În cazul extractanților săruri de fosfoniu, acestea diferă atât prin lungimea lanțului substituentului alchil grefat pe structura de bază a celulozei (dodecil și hexadecil), cât și prin substituentul de cuaternizare diferit (trifenil, respectiv tributil). Ratele de inhibiție microbiană calculate pentru fiecare material studiat sunt prezentate în Tabelul 4.4.

**Tabelul 4.4.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu

Material	Raport CE: sare de fosfoniu	Rata de inhibiție (%)			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Celuloză (CE)	-	2,8	7,7	20	12,2
CE-DDTPPBr	1:0,012	100	32,0	100	100
	1:0,1	100	39,8	100	100
CE-HDTBPBr	1:0,012	30,7	8,4	42,7	65,3
	1:0,05	58,7	20,7	44,9	67,0
	1:0,1	69,7	21,6	52,6	77,9
	1:0,3	100	26,6	87,3	100
	1:0,5	100	42,6	89,1	100

În cazul materialului CE-DDTPPBr efectul antibacterian și antifungic s-a manifestat cu rata de inhibiție de 100%, indiferent de raportul de funcționalizare, CE:DDTPPBr, cu excepția plăcilor inoculate cu specia *P. aeruginosa*. În acest caz, creșterea raportului de funcționalizare de ~10 ori nu a determinat și o mărire substanțială a ratei de inhibiție bacteriene, care a crescut doar de la 32% la 39,8%. Acest aspect poate fi explicat prin rezistența speciei de *P. aeruginosa* [339], la numeroși agenți cu efect bactericid, dar și prin necesitatea utilizării unei cantități foarte mari de extractant pentru funcționalizare ceea ce nu se justifică din punct de vedere economic.

În cazul utilizării materialelor CE-HDTBPBr cu rapoare diferite CE:HDTBPBr, efect bactericid total a fost obținut pentru tulpina de *S.aureus* la raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr = 1:0,3. Efect antifungic total a fost obținut în cazul materialului CE-HDTBPBr, tot la raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr = 1:0,3. Acest aspect ar putea fi explicat prin asemănarea pereților celulari de la bacteriile Gram-pozitive cu peretele fungic, cel puțin în ceea ce privește structura peretelui speciei de *C. albicans*.

De asemenea, s-a constatat din studiile efectuate, faptul că rata de inhibiție a creșterii bacteriene, respectiv fungice este direct proporțională cu raportul de funcționalizare. În cazul ambelor bacterii Gram-negative testate, materialul CE-HDTBPBr nu a reușit să atingă rata de inhibiție maximă. Astfel, asupra *P. aeruginosa*, chiar dacă raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr a fost mărit de 10 ori, de la 0,01 la 0,1, rata de inhibiție a materialului CE-HDTBPBr a crescut de la 6% la 21,6%. Respectiv, la creșterea raportului de funcționalizare de la 0,1 la 0,5, rata de inhibiție a materialului CE-HDTBPBr a crescut de la 21,6% la 42,6%. Același efect al materialului CE-HDTBPBr s-a observat și asupra tulpinii de *E. coli*, când creșterea raportului de funcționalizare de 50 ori (de la 0,01 la 0,5) a determinat abia o dublare a creșterii ratei de inhibiție, de la 42,7 % la 89,1%.

DDTPPBr este extractantul a cărui hidrofobicitate este mult mai mare față de cea a HDTBPBr, întrucât chiar dacă substituentul alchil este mai scurt în cazul DDTPPBr, substituentul fenil cu care este cuaternizat acest extractant are grad mare de hidrofobicitate comparativ cu substituentul butil. Pe de altă parte, fiind mai scurt, segmentul alchil determină o distanță mai mică a grupării pendante față de structura de bază a CE, ceea ce din nou sporește efectul antimicrobian. Astfel, este subliniat rolul balanței hidrofil – hidrofobe a peretelui celular bacterian și hidrofobicitatea agentului antibacterian în manifestarea efectului bactericid. De asemenea, atracțiile electrostatice între materialele sintetizate și membrana celulară bacteriană au rol esențial în exercitarea efectului bactericid, întrucât forțele puternice de atracție electrostatică din polielectrolitul adsorbit și moleculele de lipide din membrana celulară bacteriană determină în final distrugerea celulei bacteriene [340, 341].

### 4.3. Materiale obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cu sulf și azot

#### 4.3.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CE: săruri cu sulf și azot

Pentru stabilirea **raportului optim celuloză: sare cu sulf și azot**, în vederea obținerii unor materiale care să prezinte activitate antimicrobiană foarte bună (R.I > 95%) s-au efectuat analize microbiologice, prin tehnici convenționale de cultivare, urmărind dezvoltarea microorganismelor pe mediu de creștere neselectiv. După incubarea corespunzătoare, a fost evaluată creșterea cantitativă a coloniilor bacteriene, prin determinarea numărului total probabil de colonii bacteriene dezvoltate pe mediul de cultură (UFC/mL).

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.5. și Figurile 4.7.- 4.9.

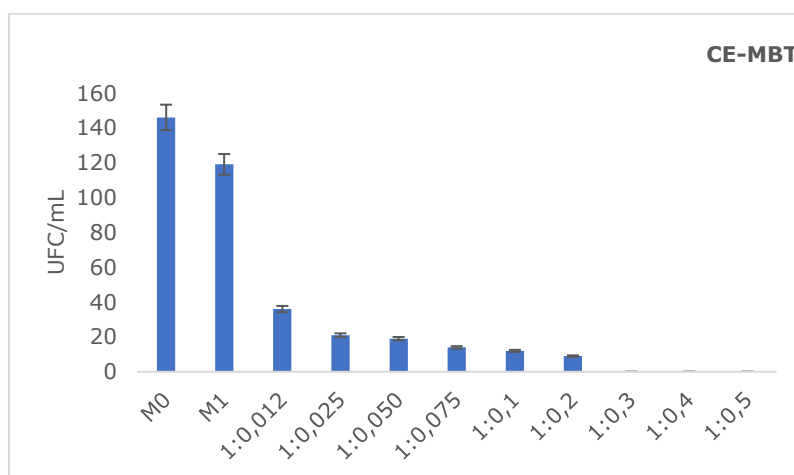
**Tabelul 4.5.** Influența raportului CE:săruri cu sulf și azot în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot

Raport CE: sare cu sulf și azot	Număr unități formatoare de colonii	
	CE-sare cu sulf și azot	
	Mercaptobenzotiazol (MBT)	Tiouree (Thio)
1:0,012	36	58
1:0,025	21	31
1:0,05	19	26

- Continuare Tabel 4.5 -

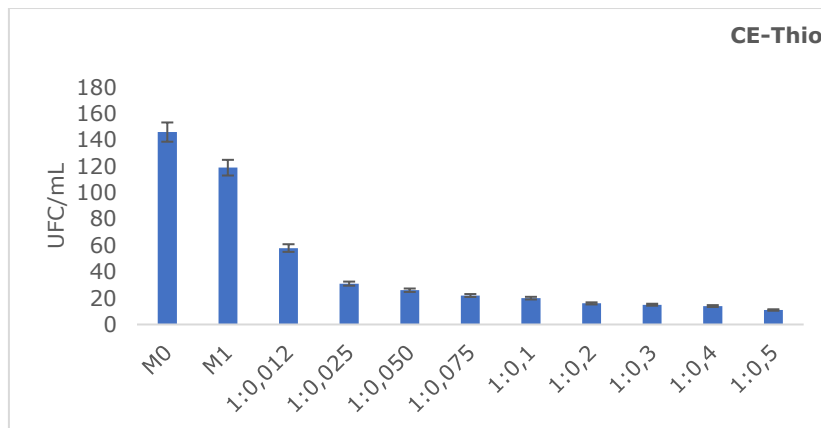
Raport CE: sare cu sulf și azot	Număr unități formatoare de colonii	
	CE-sare cu sulf și azot	CE-sare cu sulf și azot
	Mercaptobenzotiazol (MBT)	Tiouree (Thio)
1:0,075	14	22
<b>1:0,1</b>	12	20
1:0,2	9	16
1:0,3	<b>0</b>	15
1:0,4	0	14
1:0,5	0	<b>11</b>
<b>MARTOR (M0) inocul</b>	145	
<b>CE nefuncționalizată (M1)</b>	119	

Raportat la analiza probei de control M1, când celuloza nefuncționalizată a permis dezvoltarea bacteriilor pe suprafața mediului de cultură, se poate concluziona că prin funcționalizarea celulozei cu extractanții: MBT (Figura 4.7) și Thio (Figura 4.8.), odată cu creșterea raportului de funcționalizare, capacitatea bactericidă este influențată pozitiv.



**Figura 4.7.** Comparație între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-MBT la diferite rapoarte de funcționalizare

În urma examinării seriei de culturi microbiene la care s-a utilizat ca și extractant MBT, s-a constatat că la raportul CE:MBT = 1:0,3 nu a avut loc creștere microbiană. În consecință, raportul ce a prezentat efect bactericid total și este considerat **raport optim CE:MBT de este 1:0,3.**



**Figura 4.8.** Comparație între proba martor (M0) - CE nefuncționalizată (M1)- materialul CE-Thio la diferite rapoarte de funcționalizare

Pentru materialul CE-Thio, indiferent de raportul de funcționalizare studiat, nu a fost obținut efect bactericid total, dovedit prin rata maximă de inhibiție bactericidă calculată de 90,8% pentru raportul de funcționalizare CE:Thio=1:0,5. Pentru o activitate microbiologică optimă **raportul optim CE:Thio este 1:0,5**.

#### 4.3.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot asupra tulpinilor microbiene de referință

Eficiența materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cu sulf și azot este exprimată, sub forma ratei de inhibiție microbiană, în tabelul 4.6.

**Tabelul 4.6.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot

Material	Raport CE: sare cu sulf și azot	Rata de inhibiție (%)			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Celuloză (CE)	-	2,8	7,7	20	12,2
CE-MBT	1:0,012	25,6	10,0	20,5	54,0
	1:0,05	62,9	13,7	22,1	63,2
	1:0,1	100	19,5	50,4	100
	1:0,3	100	36,2	65,4	100
	1:0,5	100	41,0	100	100
CE-Thio	1:0,012	20,7	12,9	28,9	52,5
	1:0,05	27,7	20,7	49,6	55,8
	1:0,1	39,3	39,6	51,0	54,5
	1:0,3	75,3	44,5	52,4	60,1
	1:0,5	76,0	45,1	55,5	60,9

Funcționalizarea celulozei cu MBT sau Thio a determinat îmbunătățirea activității antibacteriene și antifungice a celulozei native, dovedit prin obținerea unei rate de inhibiție mai mare în cazul materialelor CE-MBT, respectiv CE-Thio comparativ cu celuloza nativă, chiar și pentru raportul minim de funcționalizare CE:extractant = 1:0,012.

Dacă vom compara eficiența materialului CE-MBT asupra speciilor testate, constatăm că efectul antimicrobian este mai bun în cazul bacteriilor Gram-pozitive și a speciei de fungi, dovedit prin rata de inhibiție de 100% atinsă pentru un raport de funcționalizare CE:MBT = 1:0,1 atât pentru specia *S.aureus*, cât și pentru specia *C.albicans*. Din nou este sugestiv modul similar de manifestare a efectului antimicrobian exercitat de cele două specii sub acțiunea materialelor CE-MBT cu diferite rapoarte CE:MBT testate, întrucât rata de inhibiție calculată pentru raportu de funcționalizare CE:MBT=1:0,05 este aproximativ egală (62,9% pentru specia *S.aureus* și 63,2% pentru specia *C. albicans*).

Când a fost studiat efectul acestor materiale obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot asupra bacteriilor Gram-negative, s-a constatat că eficiența acestora este direct proporțională cu creșterea cantității de MBT, respectiv cu creșterea raportului de funcționalizare, CE:MBT, însă rata de inhibiție bacteriană maximă a fost obținută doar pentru specia *E. coli*, la raportul CE:MBT = 1:0,5.

Materialul CE-Thio obținut prin funcționalizarea celulozei cu Thio, chiar și la cel mai mare raport de funcționalizare, nu a avut efect antimicrobian total. Se poate vorbi mai degrabă de efect bacteriostatic, respectiv fungistatic în cazul acestor materiale, CE-Thio. Dacă considerăm suficientă manifestarea efectului bacteriostatic sau fungistatic, se constată că biomaterialul nou sintetizat a împiedicat dezvoltarea bacteriilor, fără a le omorî neapărat, observându-se o inactivare a creșterii tulpinilor microbiene, așa cum reiese din analiza ratelor de inhibiție prezentate în tabelul 4.5.

## CONCLUZII

În contextul rezistenței tulpinilor microbiene la cei mai mulți agenți bactericizi cunoscuți până în acest moment, dezvoltarea de noi materiale antibacteriene sau măcar cu proprietăți bacteriostatice, pornind de la biomateriale, a deschis noi oportunități pentru inhibiția adeziunii microbiene și limitarea transmiterii acestora. Întrucât natura poliolică a celulozei îi permite să fixeze o serie de compuși cu funcționalități chimice care pot modula echilibrul hidrofил / lipofil astfel încât să-i poată oferi proprietăți îmbunătățite, ne determină să considerăm acest polimer natural, CE, ca fiind un bun material suport cu aplicabilitate în multiple domenii. Spre exemplu, în ceea ce privește întrebuițarea materialelor obținute din funcționalizarea celulozei cu grupări active cu azot, fosfor sau sulf, în tehnologia de conservare a alimentelor, identificarea unor noi biomateriale cu proprietăți antibacteriene reprezintă una din cele mai promițătoare tendințe. Este de dorit chiar să se poată obține astfel de materiale antibacteriene care să fie biodegradabile, motiv pentru care studiul celulozei reprezintă un desiderat.

Tehnica de funcționalizare prin impregnare utilizată în această teză de doctorat pentru funcționalizarea celulozei, este o modalitate ușoară de obținere a noi materiale, fără a implica obținerea unor produși secundari de reacție. Pe de altă parte, în cazul tuturor derivaților celulozei obținuți prin funcționalizare prin impregnare, au fost obținute proprietățile antimicrobiene sporite, comparativ cu celuloza nativă, ceea ce duce la concluzia că această tehnică poate fi folosită cu succes pentru obținerea de noi materiale, cu efect antimicrobian foarte bun.

Inhibiția creșterii tulpinilor *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Candida parapsilosis* a fost obținută prin utilizarea materialelor CE-DDTMABr, CE-TDTMABr și CE-DDTPPBr, indiferent de raportul de funcționalizare. Materialele obținute prin funcționalizarea celulozei cu săruri cuaternare de amoniu și 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. În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu, activitatea antibacteriană a fost dependentă de lungimea lanțului alchil care distanțează gruparea pendanță a sării cuaternare față de structura de bază a celulozei. În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu, activitatea antibacteriană a fost puternic influențată caracterul hidrofob al grupării pendante (fenil comparativ cu butil), la care s-a adăugat distanța dată de substituentul alchil al sării cuaternare (dodecil comparativ cu hexadecil). Materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot au manifestat în general efect bacteriostatic sau fungistatic. Excepție a fost în cazul CE-MBT când s-a atins rata de inhibiție maximă asupra speciilor *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans* la raport de funcționalizare CE:MBT = 1:0,3.

## CAPITOLUL 5.

### APLICAȚII MICROBIOLOGICE ALE CHITOSANULUI FUNCȚIONALIZAT

Abundența polizaharidelor care pot fi utilizate pentru a prepara în mod eficient materiale antibacteriene fie prin îmbunătățirea sau modularea proprietăților antibacteriene naturale, cum e cazul chitosanului, fie prin conferirea de novo a acestor proprietăți celulozei sau altor polimeri naturali, face ca aceste materiale naturale să fie tot mai des studiate, iar aplicabilitatea acestora tot mai variată. Combinarea activității antibacteriene cu alte proprietăți bine cunoscute ale acestor polizaharide deschid perspective bune pentru dezvoltarea viitoare a materialelor funcționale inovatoare.

#### 5.1. Materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului cu săruri cuaternare de amoniu

##### 5.1.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: săruri cuaternare de amoniu

Pentru a stabili raportul optim CH:săruri cuaternare de amoniu, care are efect bactericid asupra inoculului bacterian, fiecare material a fost inoculat după încorporarea în mediu de cultură și incubat timp de 48 h la 310 K, după care s-a determinat numărul total de colonii, raportat la proba de control, M1, corespunzătoare chitosanului nefuncționalizat (CH), respectiv proba martor, M0, corespunzătoare inoculului microbial. Acest raport, la care a fost observată absența completă a creșterii microbiene sau rata de inhibiție calculată a avut cea mai mare valoare, a fost considerat **raportul optim**, minim necesar, care produce efect bactericid total sau prezintă efect bactericid semnificativ.

Efect bactericid total a fost considerat acolo unde rata de inhibiție a creșterii bacteriene a fost de 100%.

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.

În ceea ce privește unitățile formatoare de colonii, situația centralizată, pentru fiecare material sintetizat la diferite rapoarte CH: săruri cuaternare de amoniu sunt prezentate în Tabelul 5.1.

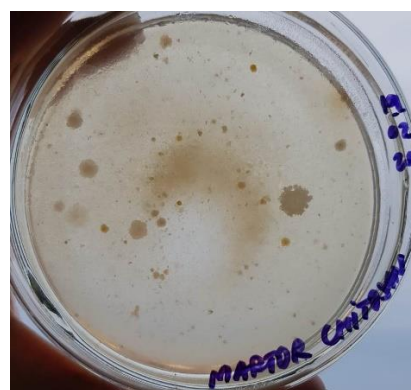
**Tabelul 5.1.** Influența raportului CH: săruri cuaternare de amoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu

Raport CH: sare cuaternară de amoniu	Număr unități formatoare de colonii		
	CH-sare cuaternară de amoniu		
	Bromură de dodecil-trimetil-amoniu (DDTMABr)	Bromură de tetradecil-trimetil-amoniu (TDTMABr)	Clorură de hexadecil-trimetil-amoniu (HDTMACl)
1:0,003	43	16	36
1:0,006	31	8	32
1:0,009	22	6	24
<b>1:0,012</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
1:0,025	0	0	0
1:0,05	0	0	0
1:0,075	0	0	0
1:0,1	0	0	0
1:0,2	0	0	0
1:0,3	0	0	0
1:0,4	0	0	0
1:0,5	0	0	0
<b>MARTOR (M0) inocul</b>	145		
<b>CH nefuncționalizat (M1)</b>	85		

Chitosanul, are el însuși activitate bactericidă (Figura 5.1.b.), întrucât dezvoltarea bacteriilor pe suprafața mediului de cultură a fost inhibată, cu o rată de inhibiție de circa 41,3%. Acest aspect a fost dovedit prin inocularea unei probe de control M1 (unde a fost adăugat CH nefuncționalizat), care a fost comparată cu proba martor M0 (Figura 5.1.a.) unde a fost inoculat doar inocul bacterian în mediu de cultură.



**Figura 5.1.a.** Cultură bacteriană martor (M0).

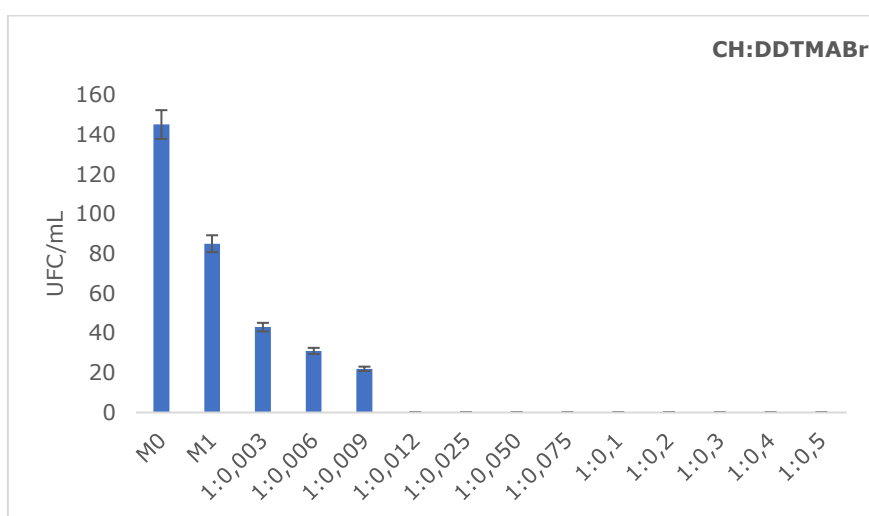


**Figura 5.1.b.** Probă control – CH nefuncționalizat (M1)



Nu este de neglijat faptul că în prezentul studiu a fost utilizat chitosan cu masa moleculară medie (1-3kDa) [266] și grad mare de deacetilare (90%), ale cărui proprietăți intrinseci sunt favorabile pentru manifestarea efectului bactericid [261], [265], [240].

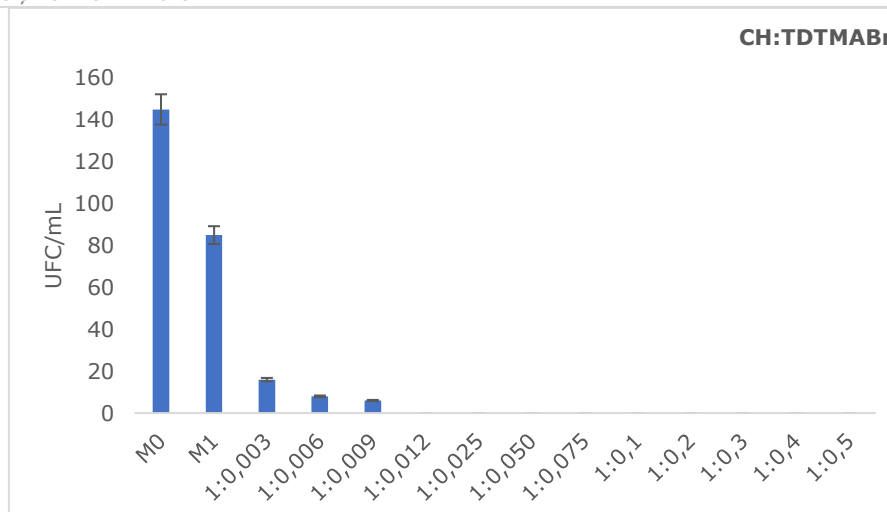
În urma examinării seriei de culturi bacteriene la care s-a utilizat materialul CH-DDTMABr, (Figura 5.2), s-a constatat că la rapoarte CH:DDTMABr mai mari de 1:0,012 nu a avut loc creștere bacteriană.



**Figura 5.2.** Comparație între proba martor (M0) - CH nefuncționalizat (M1) - materialul CH-DDTMABr la diferite rapoarte de funcționare

În consecință în cazul materialului CH-DDTMABr, **raportul optim de funcționare** CH:DDTMABr care produce efect bactericid total este **CH:DDTMABr = 1:0,012**.

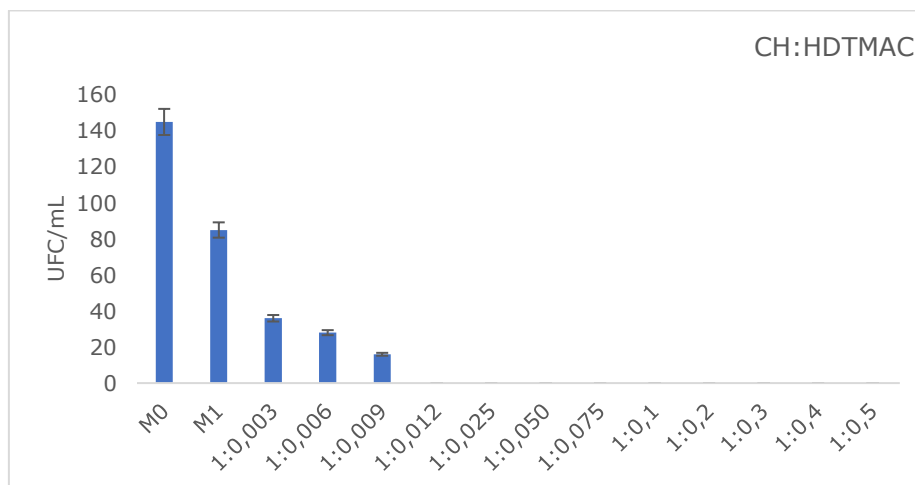
În ceea ce privește materialul CH-TDTMABr, în urma analizei plăcilor Petri au reieșit aceleași concluzii: prin funcționare capacitatea sa bactericidă este sporită, astfel încât, materialul CH-TDTMABr prezintă efect bactericid total la rapoarte de funcționare mai mari decât 1:0,009 (Figura 5.3.).



**Figura 5.3.** Comparație între proba martor (M0) - CH nefuncționalizat (M1)- materialul CH-TDTMABr la diferite rapoarte de funcționalizare

În consecință în cazul materialului CH-TDTMABr, **raportul optim de funcționalizare** CH:TDTMABr care produce efect bactericid total este **CH:TDTMABr = 1:0,012**.

În urma examinării seriei de culturi bacteriene în cazul materialului CH-HDTMACI, s-a constatat faptul că începând cu raportul CH:HDTMACI = 1:0,012 nu a avut loc creștere bacteriană (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Comparație între proba martor (M0) - CH nefuncționalizat (M1)- material CH-HDTMACI la diferite rapoarte de funcționalizar

În consecință pentru materialul CH-HDTMACI, **raportul optim de funcționalizare** CH:HDTMACI care produce efect bactericid total este **CH:HDTMACI = 1:0,012**.

Toți cei trei extractanți studiați (DDTMABr, TDTMABr, HDTMACI) sunt săruri cuaternare de amoniu cu care a fost funcționalizat chitosanul, la care diferă lungimea lanțului alchil care reprezintă brațul de distanțare a catenei extractantului (dodecil, tetradecil, hexadecil), dar care are catena pe gruparea pendentă, N, identică (metil).

Pentru acești extractanți, răspunsul bactericid este similar, fapt dovedit de rata de inhibiție totală a creșterii bacteriene, la rapoarte de funcționalizare CH:sare cuaternară de amoniu.

Hidrofobicitatea și sarcina cationică a substituentului introdus afectează puternic activitatea antibacteriană a materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu [9]. S-a demonstrat că, lungimea lanțului alchil care distanțează catena extractantului aduce aport hidrofob și contribuie prin sarcina cationică la manifestarea efectului bactericid total al CH funcționalizat, indiferent de sarea cuaternară de amoniu utilizată [342].

### **5.1.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu asupra tulpinilor de referință**

Pentru a stabili eficiența materialelor sintetizate asupra unor tulpini bacteriene de referință, care constituie de altfel cei mai întâlniți agenți patogeni, s-au efectuat teste microbiologice de control asupra tulpinilor de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) și *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). A fost utilizat un inocul cu o concentrație de  $1 - 2 \times 10^8$  UFC/mL (0,5 McFarland), din care s-a însămânțat 1 $\mu$ L, respectiv o concentrație bacteriană de  $1 \times 10^5$  UFC/mL pentru fiecare tulpină testată. Testele au fost efectuate în 3 repetări, utilizându-se atât **raportul optim** stabilit anterior, la testarea efectului antimicrobian asupra inoculului heterotrof, cât și alte rapoarte CH:sare cuaternară de amoniu, pentru a putea fi observat comportamentul microbian la diverse rapoarte, față de raportul optim, fiind astfel confirmat raportul optim necesar pentru efect bactericid/fungicid total.

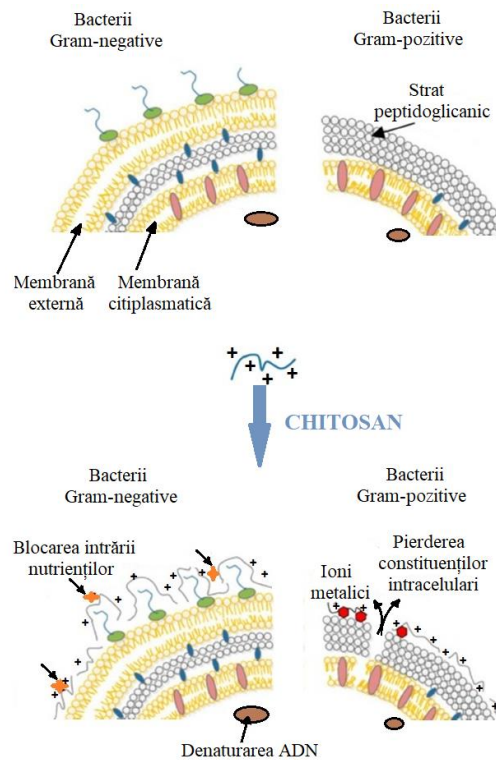
Datorită compoziției diferite a pereților la bacteriile Gram-pozitive și Gram-negative, interacțiunea materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu este diferită pentru aceste două tipuri de bacterii [7, 209, 240, 242, 253, 255, 342, 344-347].

Calculând rata de inhibiție a creșterii bacteriene pentru cele 4 tulpini specifice utilizate, sub acțiunea CH, raportat la proba martor (inocul ATCC), respectiv pentru materialele obținute prin funcționalizarea CH cu sărurile cuaternare de amoniu raportat la CH, datele sunt următoarele (Tabelul 5.2.).

**Tabelul 5.2.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene, în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu

Material	Raport CH: sare cuaternară de amoniu	Rata de inhibiție (%)			
		Staphylococcus aureus ATCC 25923	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Escherichia coli ATCC 25922	Candida parapsilosis ATCC 22019
Chitosan (CH)	-	13,1	18,5	24,5	17,7
CH-DDTMABr	1:0,012	100	31,7	25,8	76,0
	1:0,1	100	57,2	100	100
CH-TDTMABr	1:0,012	100	55,2	100	100
	1:0,1	100	60,3	100	100
CH-HDTMACI	1:0,012	100	13,1	52,7	100
	1:0,1	100	29,2	69,0	100

Diferențele în structura peretelui celular al bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, (Figura 5.5.), au determinat efecte inhibitorii ușor mai mici împotriva bacteriilor Gram-pozitive în comparație cu bacteriile Gram-negative pentru CH nefuncționalizat.



**Figura 5.5.** Diferențe între peretele celular la bacteriile Gram-negative și Gram-pozitive [10]

Experimental a fost dovedit faptul că locul de legare a CH nefuncționalizat este la suprafața membranei externe a bacteriilor Gram-negative, prin legare blocând permeabilitatea membranei, astfel că, funcția de barieră a acesteia este perturbată, ceea ce modifică viabilitatea celulei [10, 348, 349].

Pentru a obține materiale cu solubilitate ridicată în apă, mai ales la valori ale pH-ului fiziologic și activitate antibacteriană îmbunătățită, una dintre soluții sunt materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu [342]. Acest procedeu este preferat datorită potențialului bactericid al acestor săruri cuaternare de amoniu [7].

Referitor la manifestarea efectului antibacterian asupra speciei *Pseudomonas aeruginosa*, activitatea antibacteriană a materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu scade pe măsură ce distanța sarcinii pozitive față de scheletul polimerului (dată de azotul cuaternar) crește.

Analiza conformerilor stabili ai celor trei extractanți care au în compoziție săruri cuaternare de amoniu, arată faptul că cea mai apropiată sarcină pozitivă, dată de azotul cuaternar, față de structura de bază a CH este la TDTMABr, urmată de DDTMABr și HDTMACI. Acest lucru este în acord cu rata de inhibiție calculată pentru specia *Pseudomonas aeruginosa* corespunzătoare materialului CH-TDTMABr care are cea mai mare valoare, 60,3%, pentru un raport CH: TDTMABr = 1: 0,1. În ordinea creșterii lungimii lanțului substituentului alchil care distanțează sarcina pozitivă dată de azotul cuaternar, față de scheletul de bază al CH, celelalte două săruri sunt: DDTMABr, respectiv HDTMACI, cu rata de inhibiție calculată pentru materialul CH-DDTMABr la raportul CH: DDTMABr = 1:0,1 ca fiind 57,2%, respectiv pentru materialul CH-HDTMACI la același raport masic, 29,2%.

În cazul materialului CH-TDTMABr, chiar și la reducerea raportului suport:extractant de 10 ori rata de inhibiție se păstrează aproximativ la același ordin de mărime (55,2% pentru raportul CH:TDTMABr=1:0,012 față de 60,3% pentru raportul CH:TDTMABr=1:0,1).

În cazul materialului CH-DDTMABr, reducerea raportului CH:DDTMABr de 10 ori a determinat reducerea aproape la jumătate a eficienței bactericide, rata de inhibiție fiind redusă de la 57,2% la 31,7%.

În cazul materialului CH-HDTMACI, la reducerea raportului CH:HDTMACI de 10 ori, rata de inhibiție pentru specia *Pseudomonas aeruginosa* a scăzut de la 29,2% la 13,1%, ceea ce înseamnă o reducere substanțială a eficienței bactericide.

Raportat la tulpina de *Escherichia coli*, deși tot bacterie gram-negativ, materialul CH-TDTMABr a prezentat activitate bactericidă totală, cu o rată de inhibiție a creșterii bacteriene de 100%, în timp ce materialele CH-DDTMABr și CH-HDTMACI au o rată de inhibiție aproximativ egală, 54,9%, respectiv 52,7%. Și în cazul speciei *E.coli* ratele de inhibiție sunt invers proporționale cu lungimea brațului de distanțare a sarcinii pozitive față de scheletul polimerului de chitosan, așa cum este și în cazul speciei *Pseudomonas aeruginosa*.

Se constată astfel că activitatea antimicrobiană a celor trei materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu asupra celor două tulpini Gram-negative este invers proporțională cu distanța dată de lungimea brațului de distanțare a catenei de carbon față de structura de bază a CH. Așadar, activitatea antibacteriană a materialelor, având aceeași grupare funcțională legată de azotul cuaternar (în cazul de față gruparea metil), depinde de poziționarea sarcinii pozitive pe scheletul polimerului [342].

În concluzie, pentru aceeași grupare funcțională legată de polimer prin substituenți alchil de lungimi diferite, activitatea antibacteriană este mai mare atunci când sarcina pozitivă (sau segmentul cationic) este mai apropiată de structura de bază a polimerului și scade atunci când gruparea funcțională este prezentă la o distanță crescândă față de structura de bază a polimerului.

În acest caz, se pare că cea care afectează interacțiunea cu membrana externă a bacteriilor Gram-negative este conformația derivatului polimerului. Pe măsură ce lungimea lanțului substituentului alchil crește, polimerul probabil va avea tendința de a adopta o conformație care este mai puțin favorabilă pentru legarea eficientă cu componentele anionice ale membranei bacteriene și, prin urmare, activitatea antibacteriană se reduce.

*Pseudomonas aeruginosa* se cunoaște că este o tulpină rezistentă la cele mai multe antibiotice utilizate în mod frecvent pentru tratamentul infecțiilor [350, 351]. De aceea, probabil și răspunsul bactericid mai scăzut al celor trei materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu asupra acestei bacterii, comparativ cu răspunsul bactericid al aceluiași material asupra bacteriei *Escherichia coli*, de asemenea Gram-negativă.

Pentru *Staphylococcus aureus*, bacterie Gram-pozitivă, indiferent de raportul de lucru CH:sare cuaternară de amoniu, pentru toate cele trei materiale obținute prin funcționalizarea chitosanului cu săruri cuaternare de amoniu, rata de inhibiție a fost 100%, activitatea bactericidă fiind maximă. Astfel, lipsa membranei externe în cazul bacteriilor Gram-pozitive facilitează manifestarea efectului antibacterian. Un alt argument constă în prezența în structura peretelui bacterian Gram-pozitiv a acizilor teichoici (copolimeri bacterieni ai fosfatului de glicerol sau ribitolului și carbohidraților legați prin legături fosfo-di-ester), cu caracter anionic [255], care prezintă afinitate mare pentru derivații cu caracter cationic, cum sunt sărurile cuaternare.

În cazul *Staphylococcus aureus* relația de interdependență între poziția sarcinii pozitive a azotului cuaternar și scheletul de bază al CH nu a putut fi dovedită. Peretele bacteriilor Gram-pozitive având în componență un strat mai gros de peptidoglican, extractanții utilizați pe bază de săruri cuaternare de amoniu cu caracter cationic au aderat mult mai ușor la suprafața peretelui celular, deteriorându-i astfel structura, ceea ce determină ulterior scurgerea conținutului celular și implicit moartea celulelor bacteriene (Figura 5.5.).

Aceasta înseamnă că structura peretelui celular la bacteriile Gram-pozitive este distrusă și viabilitatea celulară este perturbată sub acțiunea unor compuși cu caracter hidrofob. În acest caz conformația substituentului alchil pare să joace un rol secundar, deoarece materialul nu trebuie să reușească să pătrundă prin porinele membranei externe (cum are loc la bacteriile Gram-negative), ci e suficientă adeziunea la suprafața celulei bacteriene. În acest caz, mai important este caracterul hidrofob dat de introducerea lanțului alchil din sarea cuaternară. Acest argument susține ipoteza că locul de acțiune al agenților antibacterieni este reprezentat de membrana citoplasmatică a bacteriilor [352], principalii constituenți ai membranei citoplasmatică fiind proteinele de membrană și fosfolipidele. Astfel, materialele obținute prin funcționalizarea chitosanului cu săruri cuaternare de amoniu, care au în structură o catenă alchil lungă interacționează puternic cu membranele citoplasmatică datorită unei afinități hidrofobe între lanțul alchilic introdus și fosfolipide, ducând la o activitate antibacteriană mai mare. Potențialul de interacțiune între derivații chitosanului (care au săruri cuaternare de amoniu în structură) și peretele celular bacterian este puternic influențat de echilibrul dintre caracterul

hidrofil al celulei bacteriene și caracterul hidrofob al materialului testat. În cazul bacteriilor Gram-negative, interacțiunile cu membrana citoplasmatică sunt condiționate de pătrunderea materialului prin porinele aflate în membrana externă, ceea ce face ca efectul antibacterian să fie încetinit comparativ cu cel manifestat asupra bacteriilor Gram-pozitive [347, 353].

În privința **activității antifungice** a chitosanului și a materialelor obținute prin funcționalizarea sa cu săruri cuaternare de amoniu, acestea au prezentat activitate antifungică deosebită asupra *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Manifestarea activității antifungice a chitosanului este corelată cu o cantitate mai mare de acizi grași nesaturați prezenți în membrana celulară a unor specii de fungi [354]. Conținutul de acizi grași nesaturați influențează pozitiv fluiditatea membranei, ceea ce mai departe influențează susceptibilitatea pentru acțiunea CH și a materialelor obținute prin funcționalizarea sa cu săruri cuaternare de amoniu [259]. Aceasta deoarece o fluiditate mai mare a membranei tinde să conducă la existența unei sarcini negative pe membrana celulară, facilitând astfel legarea CH cationic la membrana celulară fungică, ceea ce determină moartea celulei fungice. Pe de altă parte în peretele celular fungic la unele specii, printre care și *C. parapsilosis* sunt prezente manoproteine, ce au rol de integritate a peretelui celular, aderență la țesuturile gazdelor, virulență și în influențează stabilirea unui răspuns imun protector al celulei gazdei [355]. Aceste manoproteine conțin grupări fosfat care, de asemenea, influențează sarcina negativă a peretelui celular fungic [259, 356]. În acest caz, rolul decisiv în manifestarea proprietăților antifungice ale materialelor sintetizate în acest studiu poate fi pus pe seama caracterului hidrofob al acestora, care determină creșterea interacțiunii cu peretele celular fungic [342].

Așadar, în privința materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu asupra activității antifungice, aportul caracterului hidrofob este evident, reflectat în rata de inhibiție, indiferent de lungimea lanțului de atomi de carbon. Activitatea antifungică crescută a materialului poate fi explicată prin interacțiunea electrostatică între celula fungică și sarcina pozitivă permanentă datorată cuaternizării. Explicația este că, cu cât materialele studiate sunt mai puternic încărcate pozitiv (au caracter cationic mai pronunțat), cu atât pot interacționa mai puternic cu componente microbiene încărcate negativ, ceea ce duce la activitate antifungică [342].

Astfel, rata de inhibiție pentru *Candida parapsilosis* este maximă, mai puțin în cazul raportului CH:DDTMABr=1:0,012 pentru materialul CH-DDTMABr. Posibil ca în acest caz, extractantul, DDTMABr, având lanț de atomi de carbon mai scurt decât ceilalți extractanți, să putem aprecia că există un prag minim necesar a fi atins sub aspectul aportului hidrofob, astfel încât activitatea fungicidă să se poată manifesta. Așadar, pentru manifestarea activității antifungice totale pentru un material sintetizat (RI=100%), este necesar să se realizeze un echilibru între caracterul hidrofob al materialului testat și caracterul hidrofil al celulei fungice [342].

## **5.2. Materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu**

### **5.2.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: sare de fosfoniu**

În cazul materialului CH-DDTPPBr, întrucât la cel mai mic raport de funcționalizare CH:sare de fosfoniu = 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.

În ceea ce privește unitățile formatoare de colonii, situația centralizată, pentru fiecare material sintetizat la diferite rapoarte CH:sare de fosfoniu sunt prezentate în Tabelul 5.3.

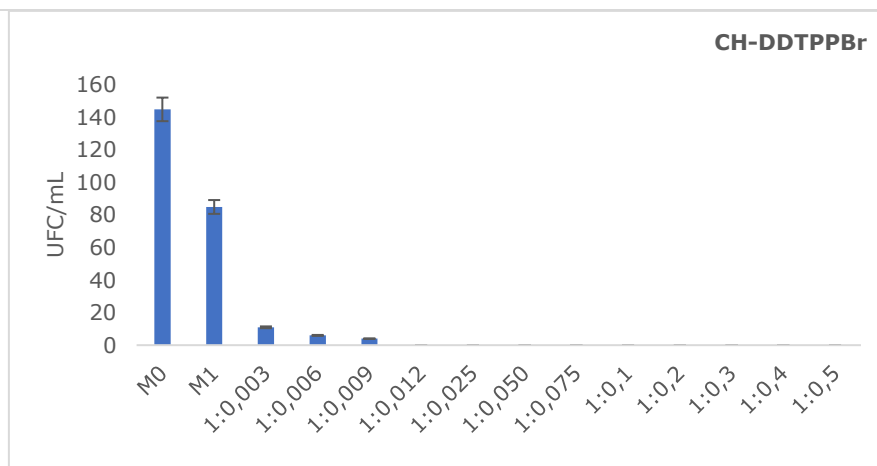
**Tabelul 5.3.** Influența raportului CH:sare de fosfoniu în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu

Raport CH:sare de fosfoniu	Număr unități formatoare de colonii	
	CH: sare de fosfoniu	
	Bromură de dodecil-trifenil-fosfoniu (DDTPPBr)	Bromură de tri n-butil-hexadecil-fosfoniu (HDTBPBr)
1:0,003	11	-
1:0,006	6	-
1:0,009	4	-
1:0,012	0	38
1:0,025	0	26
1:0,05	0	24
1:0,075	0	23
1:0,1	0	23
1:0,2	0	22
1:0,3	0	10
1:0,4	0	7
1:0,5	0	4
<b>MARTOR (M0) inocul</b>	145	
<b>CH nefuncționalizat (M1)</b>	85	

În urma examinării seriei de culturi bacteriene la care s-au utilizat materialele obținute prin funcționalizarea CH cu extractantul DDTPPBr, s-a constatat faptul că la rapoarte CH:DDTPPBr mai mari de 1:0,009 nu a avut loc creștere bacteriană. În consecință, materialul CH-DDTPPBr, a avut efect bactericid total începând cu raportul CH:DDTPPBr = 1:0,012.

Întrucât din analiza probei de control, M1, s-a observat faptul că doar CH nefuncționalizat permite dezvoltarea bacteriilor pe suprafața mediului de cultură, se poate concluziona faptul că pentru materialul CH-DDTPPBr, indiferent de rapoartele de funcționalizare, capacitatea bactericidă este influențată pozitiv (Figura 5.6).

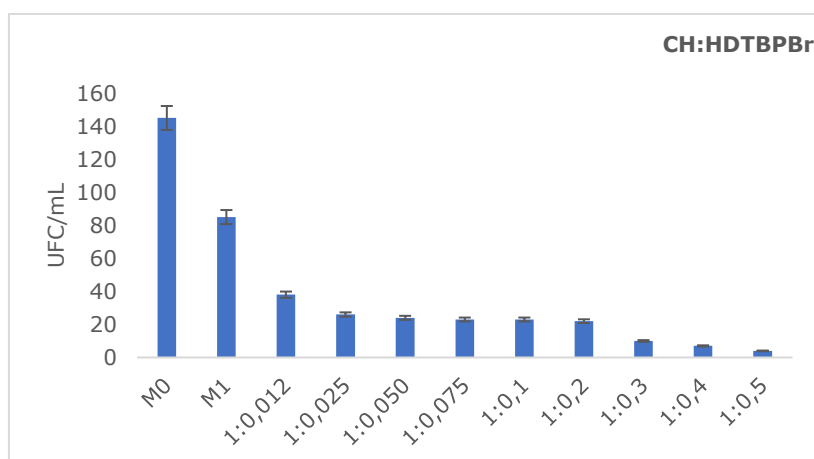




**Figura 5.6.** Comparație între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- materialul CH-DDTPPBr la diferite rapoarte de funcționalizare

La rapoarte de funcționalizare a CH cu DDTPPBr mai mari de 1:0,009 dezvoltarea bacteriilor nu a avut loc, ceea ce presupune o rată de inhibiție totală, respectiv efect antibacterian total. În consecință **raport optim de funcționalizare** pentru materialul CH-DDTPPBr a fost considerat raportul **CH:DDTPPBr = 1:0,012**.

În situația materialului CH-HDTBPBr, capacitatea bactericidă a fost modificată, fiind direct proporțională cu creșterea cantității de HDTBPBr adăugat. Se observă așadar că, prin adaos de extractant, capacitatea antibacteriană a materialului CH-HDTBPBr este îmbunătățită (Figura 5.7). La un raport CH:HDTBPBr=1:0,012, rata de inhibiție a creșterii bacteriene a fost de 55,3%, în timp ce pentru raportul CH:HDTBPBr=1:0,5, rata de inhibiție a creșterii bacteriene a fost de 95,3%.

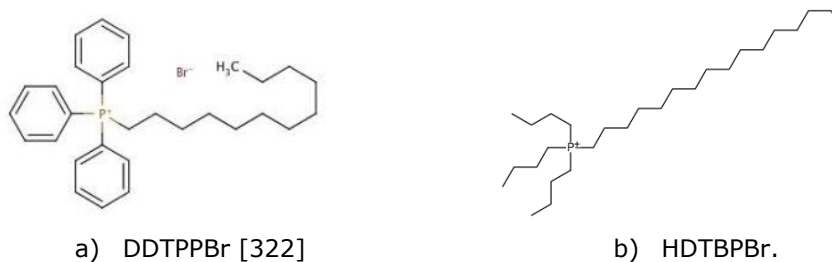


**Figura 5.7.** Comparație între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- CH:HDTBPBr la diferite rapoarte de funcționalizare

Întrucât efect bactericid total al materialului CH-HDTBPBr nu a fost obținut la niciunul dintre rapoartele de lucru, s-a considerat **raport optim CH:HDTBPBr = 1:0,5**.

### 5.2.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH-săruri de fosfoniu asupra tulpinilor de referință

Inhibiția creșterii tulpinii *Staphylococcus aureus* a fost obținută și prin utilizarea materialelor CH-DDTPPBr și CH-HDTBPBr, a căror structură chimică diferă atât prin lungimea lanțului substituentului alchil de la structura de bază a CH (dodecil și hexadecil) până la sarcina pozitivă a grupării active, fosfoniu, cât și prin substituentul de cuaternizare diferit (trifenil și, respectiv, tributil) (Figura 5.8).



**Figura 5.8.** Conformeri stabili pentru sărurile de fosfoni

Așa cum reiese din analiza celor două structuri chimice ale extractanților DDTPPBr și HDTBPBr (Figura 5.8.), este de așteptat ca activitatea bactericidă să fie mai bună în cazul DDTPPBr. Acest aspect se confirmă în cazul testelor asupra bacteriilor Gram-negative, unde atât pentru specia *Escherichia coli*, cât și pentru specia *Pseudomonas aeruginosa*, la același raport suport: extractant, independent de alegerea acestui raport, rata de inhibiție este mai mare pentru materialul CH-DDTPPBr, conform datelor din tabelul 5.4.

**Tabelul 5.4.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu

Material	Raport CH: sare de fosfoniu	Rata de inhibiție (%)			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
Chitosan (CH)	-	13,1	18,5	24,5	17,7
CH-DDTPPBr	1:0,012	100	31,0	100	100
	1:0,1	100	46,6	100	100
CH-HDTBPBr	1:0,012	100	29,3	20,2	100
	1:0,1	100	28,2	35,5	100
	1:0,5	100	48,6	40,4	100

Efectul antimicrobian al materialului CH-DDTPPBr determină o rată de inhibiție de 100 % asupra speciei *Escherichia coli* și 46,6 % asupra speciei *Pseudomonas aeruginosa*, pentru un raport CH:DDTPPBr = 1:0,1.

Pentru același raport CH:HDTBPBr = 1:0,1, în cazul acțiunii antimicrobiene a materialului CH-HDTBPBr asupra speciei *Pseudomonas aeruginosa* rata de inhibiție este de 28,2 %, iar prin creșterea raportului CH:HDTBPBr de 5 ori, rata de inhibiție ajunge să fie similară (48,6%) cu cea pentru materialul CH-DDTPPBr. În acest caz, justificarea alegerii raportului de lucru pentru stabilirea raportului optim suport: sare de fosfoniu ține de considerente economice, dar și de scopul pentru care se utilizează ca și material bactericid, materialul nou sintetizat.

În cazul utilizării pentru funcționalizare prin impregnare a CH a extractanților care conțin săruri de fosfoniu, rolul în exprimarea efectului antibacterian al acestora poate fi atribuit atât lanțului hidrofob a celor doi derivați, cât și grupărilor aromatice puternic hidrofobe din substituentul fenil comparativ cu radicalii butil, greșați pe gruparea activă, fosfoniu [357, 358].

Rezultatele foarte bune obținute asupra speciei *Staphylococcus aureus*, frecvent întâlnit în infecțiile nosocomiale ale plăgilor, ne îndreptătesc să considerăm că materialele nou sintetizate au activitate antibacteriană excelentă.

În urma experimentelor efectuate, utilizând cele două materiale, CH-DDTPPBr și CH-HDTBPBr, rezultatele obținute au arătat activitate bactericidă totală asupra speciei *Staphylococcus aureus*. Influența hidrofobă este decisivă, întrucât atât grupările aromatice, cât și lanțul substituentului alchil care distanțează heteroatomul de fosfor, de structura de bază a CH, contribuie la sporirea caracterului hidrofob al celor două materiale. Aceasta determină legarea puternică la suprafața celulei bacteriene, ceea ce duce la o pierdere masivă de componenți intracelulari, ceea ce duce la epuizarea nutrienților și ulterior la moartea celulei bacteriene.

Datorită potențialului de a utiliza derivații chitosanului cu compuși ai fosforului sau cu fosfați, în domeniul medical [359, 360], în tehnologia implanturilor osoase ortopedice sau dentare [361], cunoașterea datelor referitoare la activitatea antibacteriană a materialelor obținute prin funcționalizarea prin impregnare a CH cu extractanți care conțin săruri de fosfoniu este esențială.

Sub aspectul efectului antifungic al acestor materiale, rata de inhibiție a creșterii *Candida parapsilosis* este 100%.

### **5.3. Materiale obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot**

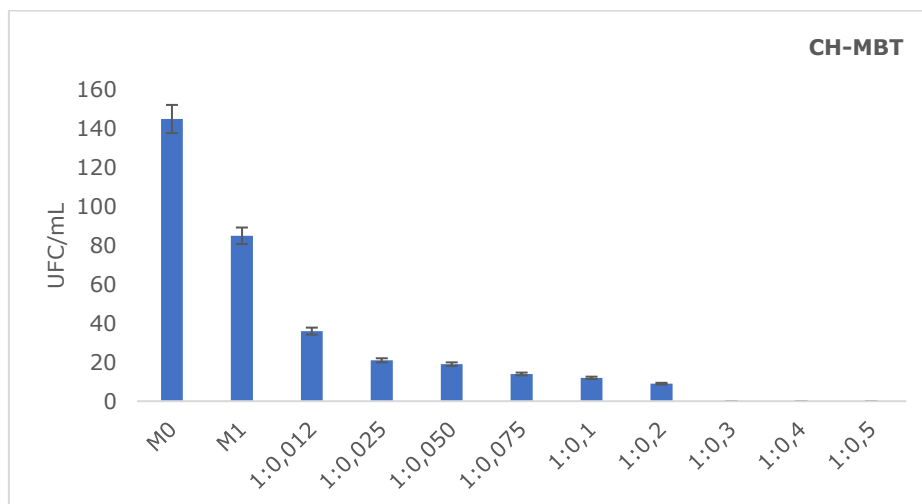
#### **5.3.1. Studii pentru stabilirea raportului optim CH: sare cu sulf și azot**

Numărul unităților formatoare de colonii, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de sulf și azot sunt prezentate în Tabelul 5.5 și Figura 5.9 și Figura 5.10.

**Tabelul 5.5.** Influența raportului CH: sare cu sulf și azot în manifestarea efectului antimicrobian al materialelor, exprimată prin nr. de colonii dezvoltate, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot

Raport CH:sare cu sulf și azot	Număr unități formatoare de colonii	
	CH:sare cu sulf și azot	
	Mercaptobenzotiazol (MBT)	Tiouree (Thio)
1:0,003	-	-
1:0,006	-	-
1:0,009	-	-
1:0,012	36	58
1:0,025	21	31
1:0,05	19	22
1:0,075	14	26
1:0,1	12	20
1:0,2	9	16
1:0,3	<b>0</b>	15
1:0,4	0	15
1:0,5	0	<b>18</b>
<b>MARTOR (M0) inocul</b>	145	
<b>CH nefuncționalizat (M1)</b>	85	

Raportat la analiza probei de control M1, când CH nefuncționalizat a permis dezvoltarea bacteriilor pe suprafața mediului de cultură, se poate concluziona că prin funcționalizarea CH cu MBT, odată cu creșterea raportului de funcționalizare, capacitatea bactericidă este influențată pozitiv (Figura 5.9)

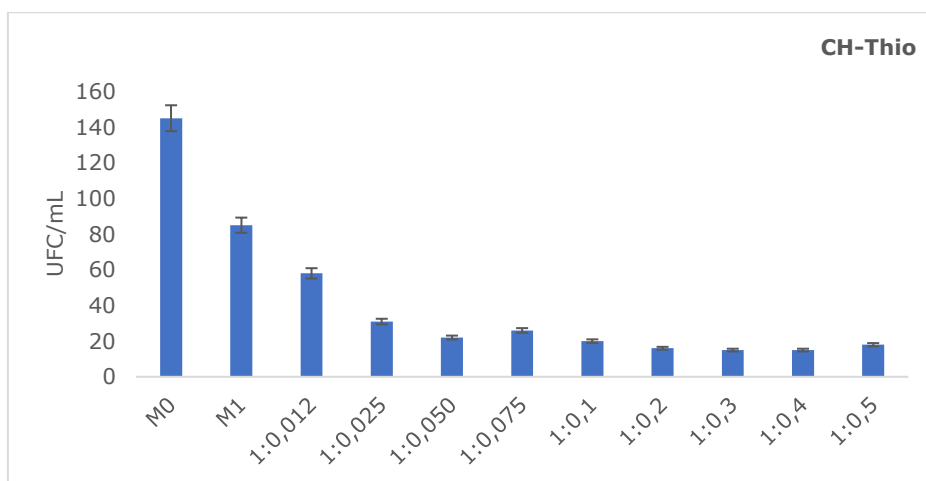


**Figura 5.9.** Comparație între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- CH:MBT la diferite rapoarte de funcționalizare

În urma examinării seriei de culturi bacteriene la care s-a utilizat ca și extractant MBT, s-a constatat că la raportul CH:MBT = 1:0,3 nu a avut loc creștere bacteriană. În consecință, pentru materialul CH-MBT, raportul ce a prezentat efect bactericid total și este considerat **raport optim de funcționalizare** este raportul **CH:MBT = 1:0,3**.

În urma examinării seriei de culturi bacteriene la care s-a utilizat pentru funcționalizarea CH, Thio, s-a constatat că pentru niciun raport CH:Thio nu a avut loc efect bactericid total.

Raportat la analiza probei de control M1, se poate concluziona că în cazul materialului CH-Thio, odată cu creșterea raportului de funcționalizare, capacitatea bactericidă este influențată pozitiv (Figura 5.10).



**Figura 5.10.** Comparație între proba martor (M0) – CH nefuncționalizat (M1)- materialul CH-Thio la diferite rapoarte de funcționalizare

Pentru raportul de funcționalizare CH:Thio = 1:0,012 a fost obținută o rată de inhibiție a creșterii bacteriene de 22,4%, în timp ce la raportul maxim luat în lucru CH:Thio = 1:0,5 rata de inhibiție calculată a fost de 60%.

Pentru stabilirea raportului optim de lucru, în condițiile în care nu putem vorbi despre efect bactericid total, am considerat **raport optim de funcționalizare, raportul CH:Thio = 1:0,5**.

### 5.3.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot asupra tulpinilor de referință

Deși funcționalizarea chitosanului pentru a se obține materiale biofuncționale cu caracter policationic este foarte larg răspândită în rândul cercetărilor din ultimii ani, de mare interes este și strategia de reducere a sarcinii pozitive a grupărilor amino protonate prezentate pe suprafața polimerică a chitosanului, astfel încât să se obțină derivați cu caracter anionic. Derivații de chitosan cu caracter anionic au aplicabilitate bună în domeniul medical, în cazul regenerării tisulare și prezintă activitate

antibacteriană sau antifungică selectivă. Derivații cu sulf ai chitosanului au caracter anionic și au structura asemănătoare heparinei, fiind capabili de interacțiuni electrostatică cu factori de creștere celulară încărcăți pozitiv, stabilizându-i și prevenind degradarea lor [362].

În această teză de doctorat s-a dorit evidențierea existenței unei activități antibacteriene sau antifungice a materialelor care se obțin prin funcționalizarea CH, cu săruri cu sulf și azot sub forma grupării -thiol. Compușii care conțin gruparea thiol sub formă ionizată au reactivitate ridicată și prezintă numeroase funcții biologice: rol de cofactori metalici, participanți în structura proteinelor, precursori ai grupelor fier-sulf implicate în lanțul de transport al electronilor care asigură energia necesară organismelor [363, 364].

Datorită recomandărilor MBT ca agent antibacterian și antifungic [365, 366], am recurs la testarea materialului obținut prin funcționalizarea prin impregnare a CH cu MBT ca și potențial agent antibacterian și antifungic.

Efectul antifungic total al materialului CH-MBT asupra speciei *Candida parapsilosis* a fost observat pentru raportul CH: MBT = 1:0,3, la care rata de inhibiție a fost 100%. Pentru rapoarte de funcționalizare mai mici, rata de inhibiție calculată este prezentată în tabelul 5.6.

**Tabelul 5.6.** Rata de inhibiție a creșterii microbiene, în cazul utilizării materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot

Material	Raport CH: sare cu sulf și azot	Rata de inhibiție (%)			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
Chitosan (CH)	-	13,1	18,5	24,5	17,7
CH-MBT	1:0,012	38,6	22,8	25,8	80,6
	1:0,1	64,0	26,3	33,6	83,6
	1:0,3	100	33,5	70,3	100
	1:0,5	100	38,8	72,3	100
CH-Thio	1:0,012	43,5	36,6	38,6	81,5
	1:0,1	48,3	38,6	43,5	86,7
	1:0,5	54,4	46,7	51,0	100

Gruparea thiol este necesară pentru a se putea materializa efectul antifungic și antibacterian. În privința activității antibacteriene a materialului CH-MBT, în cele mai multe studii, efectul extractantului, MBT, este considerat mai de grabă a fi bacteriostatic, decât bactericid [366].

Funcționalizarea polimerului natural chitosan cu MBT a determinat îmbunătățirea activității antibacteriene și antifungice a chitosanului nativ, dovedit prin obținerea unei rate de inhibiție mai mare în cazul materialului CH-MBT, comparativ cu chitosanul nativ, chiar și pentru raportul minim de funcționalizare CH:MBT=1:0,012, așa cum reiese din tabelul 5.6. Prin creșterea raportului CH:sare cu sulf și azot, crește concentrația de MBT și implicit se observă obținerea unei rate maxime de inhibiție bacteriană în cazul speciilor *Staphylococcus aureus* și *Candida parapsilosis*. De aici concluzia cum că, modul de acțiune bactericid / fungicid al materialului CH-MBT este asemănător, în cazul bacteriilor Gram-pozitive cu cel al fungilor, cel puțin pentru fungii cu perete celular asemănător *Candida parapsilosis*.

În privința efectului materialului CH-MBT asupra bacteriilor Gram-negative, efectul bactericid este mult mai slab exprimat, dovedit prin rata de inhibiție maxim obținută de 38,8% pentru specia *Pseudomonas aeruginosa* și respectiv 72,3% pentru specia *Escherichia coli*, la raportul maxim luat în studiu, CH:MBT = 1:0,5.

Dacă este să comparăm eficiența materialului CH-MBT la raportul CH:MBT= 1:0,012, pentru specia *Pseudomonas aeruginosa* aceasta este de 22,8%, iar pentru specia *Escherichia coli* rata de inhibiție este 25,8%, fără diferențe semnificative.

Atâta timp cât înlocuirea hidrogenului în poziția 4 a inelului fenil prezent la poziția a șasea a inelului benzotiazol cu o grupare nitro care atrage electronii, duce la pierderea completă a activității [366], este de așteptat ca prin legarea extractantului MBT la gruparea -NH<sub>2</sub> a chitosanului, activitatea antibacteriană să fie redusă substanțial, comparativ cu materialele care aduc caracter policationic (materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare cu amoniu sau săruri de fosfoniu). Dar, prin legarea grupării thiol ionizate, de azotul din structura CH se formează un derivat asemănător nitrosothiolilor ce au rol foarte important în ciclul redox celular sau în procesele de semnalizare celulară [364].

În aceste condiții, în cazul materialului CH-MBT care a prezentat activitate bactericidă selectivă ar putea fi utilizat în domeniul medical sau în industria agricolă.

Tiourea, având posibilitate de a dona electroni prin intermediul oxigenului, azotului și sulfului din structura sa, oferă o multitudine de posibilități de legare. Materialele obținute prin funcționalizarea chitosanului cu **tiouree** sunt cunoscute ca urmare a rolului liganzilor, capabili să coordoneze o serie de ioni metalici, dar și ca liganzi neutri, monoanioni sau dianioni [367].

Conform studiilor, eficacitatea materialului CH-Thio, împotriva bacteriilor Gram-pozitive este mai mare decât împotriva bacteriilor Gram-negative. Din datele obținute se constată faptul că indiferent de raportul CH:Thio luat în studiu pentru obținerea materialului, rata de inhibiție pentru specia *Staphylococcus aureus* a fost mai mare decât cea corespunzătoare speciilor *Pseudomonas aeruginosa* și *Escherichia coli* (vezi Tabel 5.6).

Efectul antifungic al materialului CH-Thio este susținut de interacțiunile electrostatice a sarcinilor pozitive ale polimerului cu fosfolipide încărcate negativ din membranele celulare [356, 368]. Însă din cauza dinamicii compoziției peretelui celular fungic, un mecanism clar pentru efectul antifungic este greu de stabilit. Se poate concluziona faptul că efectul antifungic al materialului CH-Thio este dependent de tipul de fung asupra căruia acționează [11, 356].

Materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot, comparativ cu materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu și cu săruri de fosfoniu, au prezentat efect bactericid / fungicid mai scăzut.

## CONCLUZII

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

De asemenea, toate materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu au prezentat o activitate antibacteriană mai mare, în general, împotriva *S. aureus* decât asupra *Escherichia coli*.

Hidrofobicitatea, care se corelează bine cu bioactivitatea substanțelor chimice, este o caracteristică foarte importantă și comportamentul hidrofob diferit al materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu joacă un rol important în mecanismele lor de activitate biologică, indiferent că este vorba despre activitatea antibacteriană sau antifungică. Astfel, s-a demonstrat faptul că lungimea lanțului alchil care distanțează catena extractantului aduce aport hidrofob și contribuie prin sarcina cationică la manifestarea efectului bactericid total al materialului, indiferent de natura extractantului - sarea cuaternară de amoniu utilizată.

Materialele obținute prin funcționalizarea chitosanului cu săruri de fosfoniu prezintă rezultate foarte bune în ceea ce privește activitatea microbiologică asupra *S. aureus*.

În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot, activitatea antibacteriană / antifungică asupra *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 și azot.

În cazul bacteriilor Gram-negative testate, efectul raportului 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: sare cu sulf și azot de 50 ori.



## CAPITOLUL 6.

### CONCLUZII FINALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE

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 unor noi materiale naturale menite să prezinte proprietăți microbiologice semnificative.

Necesitatea realizării acestui studiu pornește de la dorința obținerii unor materiale naturale 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 polimeri naturali studiați, chitosanul și celuloza, prezintă simetrie structurală, având aceleași legături  $\beta$ -glicozidice, diferența principală fiind prezența grupărilor amino primare la C2 în chitosan, în locul grupărilor hidroxil din structura celulozei (Figura 6.1).

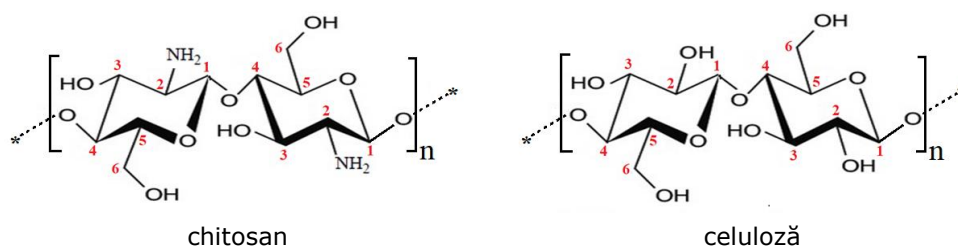


Figura 6.1. Structura chitosanului și celulozei [190, 209]

În stare nativă ambii polimeri naturali 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 polimerii naturali cu efect antimicrobian se pot obține prin modificarea permanentă a polimerilor naturali 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)**, **7 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-butil-hexadecil fosfoniu (HDTBPBr)) și (iii) **săruri cu sulf și azot** (tiouree (Thio), 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-HDTMACl, 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, s-a 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 inhibiție a creșterii microbiene**.

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

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, HDTMACl, DDTPPBr, HDTBPBr, MBT și Thio) pe suprafața suportului (CE sau CH). De asemenea, s-a determinat și suprafața specifică, 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

6.1. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE asupra unui inocul heterotrof | 115

- 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.

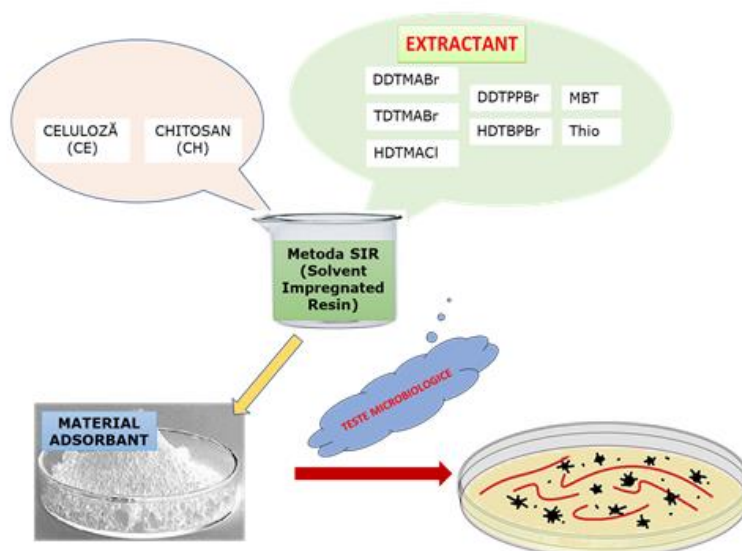


Figura 6.2. Modul de obținere și testare microbiologică a materialelor

- 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 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 suprafața specifică, diametrul porilor și volumul total de pori a CE și a materialelor obținute prin funcționalizarea CE, se poate afirma faptul că: (i) suprafața specifică a materialelor CE-DDTMABr (0,002 nm) și CE-HDTMACI (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 ( $6,278 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$ ) este mai mic decât al CE ( $2,563 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$ ), iar iar a celorlalte materiale este mai mare (între  $2,335 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$  și  $1,077 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$ );
- Din datele privind suprafața specifică, diametrul porilor și volumul total de pori a CE și a materialelor obținute prin funcționalizarea CH, se poate afirma faptul că: (i) suprafața specifică a 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.

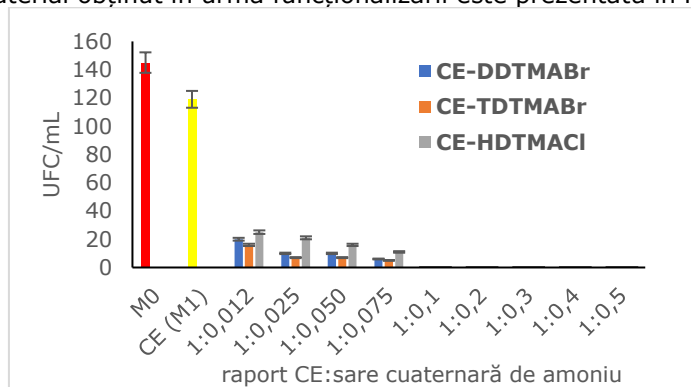
### 6.1. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE asupra unui inocul heterotrof

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 inhibiție a creșterii bacteriene de 17,93%). De aceea, utilizarea acestui polimer natural 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 HDTMACI; doi extractanți - săruri de fosfoniu: DDTPPBr, HDTBPBr și două săruri cu sulf și azot: MBT și Thio.

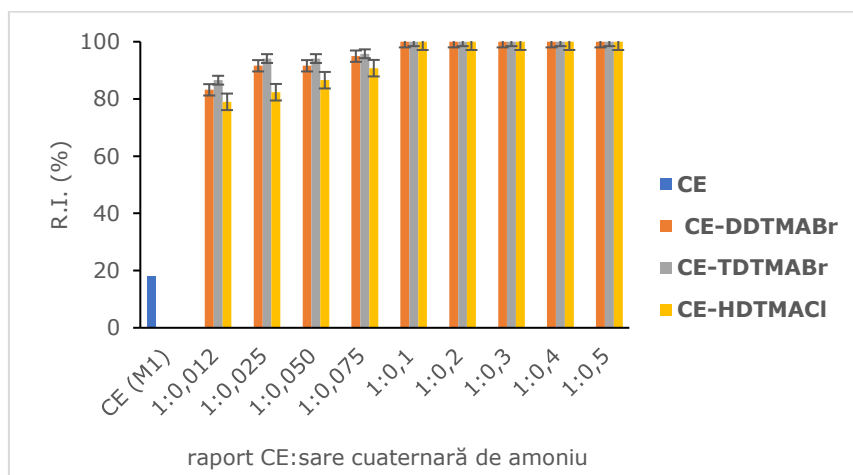
Pentru a stabili eficiența materialelor obținute, s-au luat în lucru mai multe rapoarte CE:extractant (w:w), astfel încât să poată fi urmărită eficiența raportului de funcționalizare. Rapoartele suport:extractant luate în lucru au fost: 1:0,012; 1:0,025; 1:0,050; 1:0,075; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,4; 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 inhibiție 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.

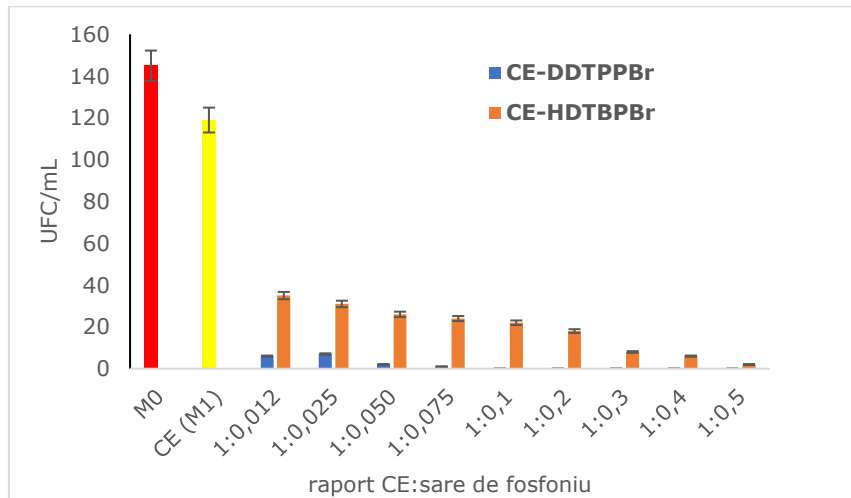


**Figura 6.4.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu

Rata de inhibiție 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 inhibiție a creșterii bacteriene cuprinsă între 78,99%, pentru materialul CE-HDTMACl obținut la raportul CE:HDTMACl= 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 inhibiție ușor mai mare.

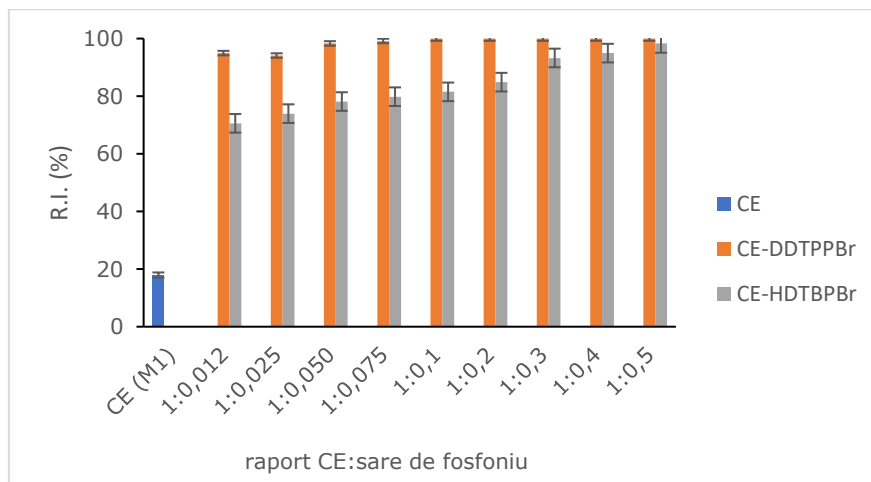
Rata de inhibiție a creșterii bacteriene, când au fost testate materiale obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu, a crescut în ordinea TDTMABr > DDTMABr > HDTMACl. Acest aspect a fost corelat cu distanța dată de lungimea brațului substituentului alchil, de la structura de bază 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 inhibiție 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 inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri de fosfoniu

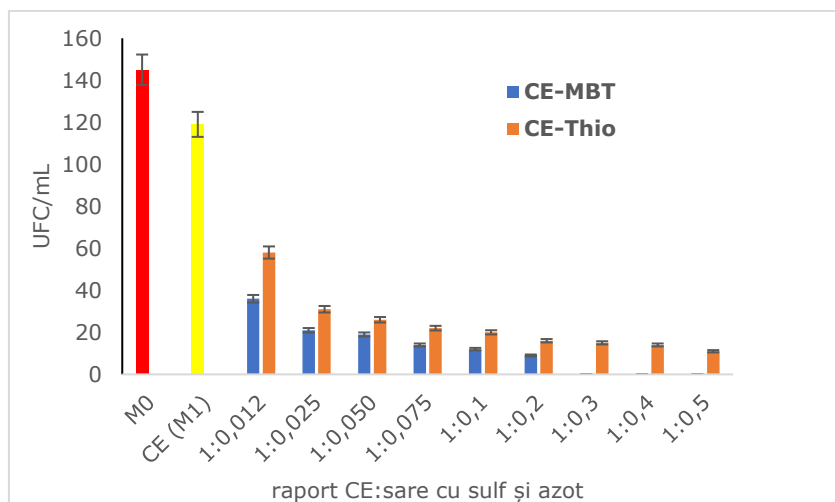
Rata de inhibiție a creșterii bacteriene pentru materialele CE-HDTBPBr a variat în intervalul 70,59%, la raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr = 1:0,012 și 98,32%, la raportul de funcționalizare CE:HDTBPBr = 1:0,5. Pentru materialul CE-DDTPPBr

### 6.1. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CE asupra unui inocul heterotrof | 119

variația ratei de inhibiție 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.

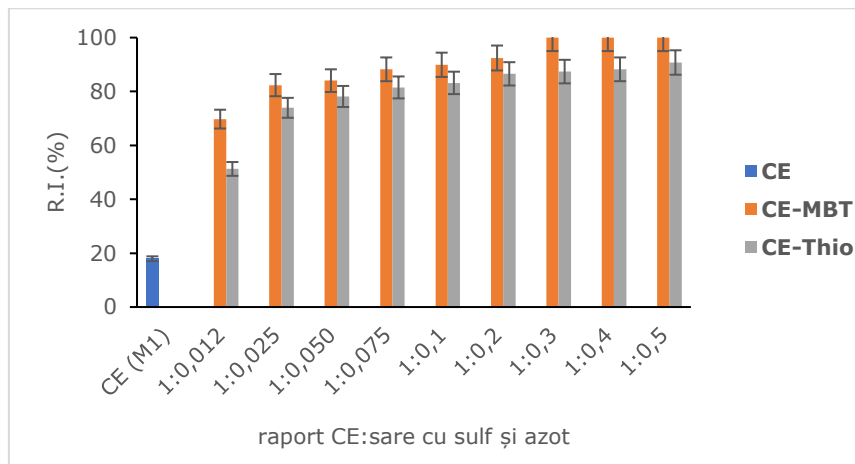
Indiferent de raportul de funcționalizare, materialul CE-DDTPPBr a manifestat rată de inhibiție a creșterii bacteriene mai bună comparativ cu materialul CE-HDTBPBr. Acest aspect a fost corelat cu diferența de hidrofobicitate dată mai ales de substituentul de cuaternizare diferit (trifenil, respectiv 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 și azot**, sub aspect al numărului unităților formatoare de colonii bacteriene dezvoltate, este prezentată în Figura 6.7., respectiv rata de inhibiție 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 și azot

În privința materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot, 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 inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot

Rata de inhibiție a creșterii bacteriene pentru materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot 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 inhibiție 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 inhibiție 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 floclulant în tratarea apelor etc.

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

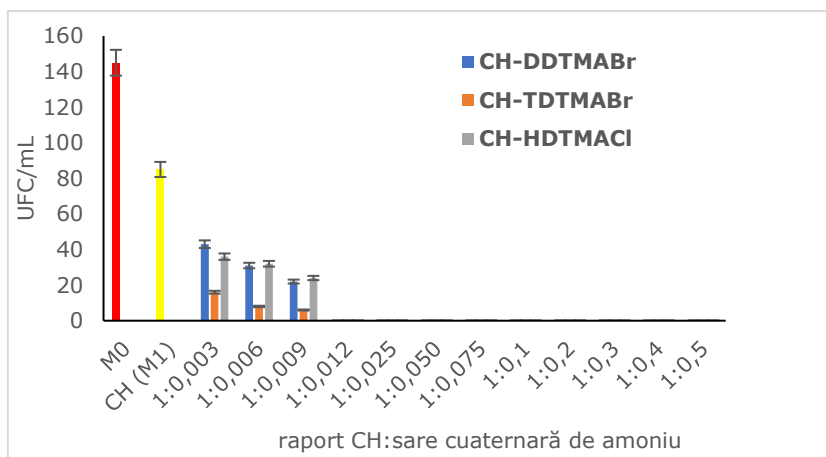
Chiar dacă CH are, prin gruparea amino prezentă în structură, o activitatea antibacteriană intrinsecă (dovedită prin rata de inhibiție a creșterii bacteriene de 41,38%), prin modificarea CH nativ, se pot obține derivați ai acestuia cu proprietăți antimicrobiene remarcabile, cum sunt materialele obținute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

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



6.2.Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH asupra unui inocul heterotrof | 121

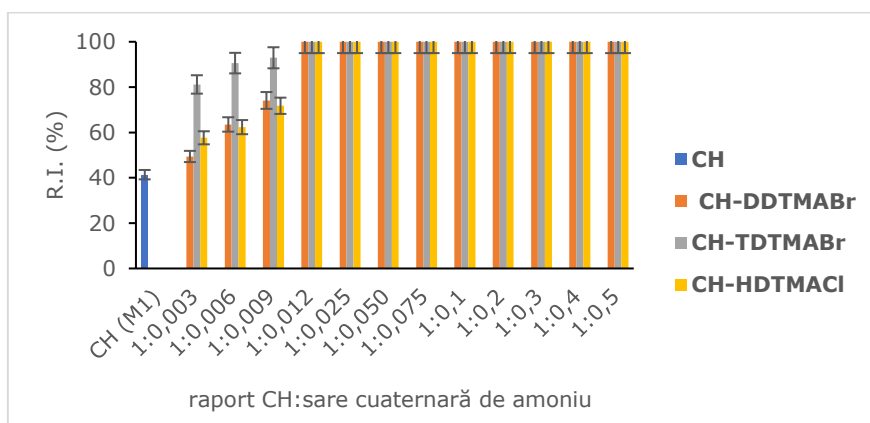
Astfel, atunci când au fost testate **materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu**, CH-DDTMABr, CH-TDTMABr și CH-HDTMACI, s-a observat creștere bacteriană doar la rapoartele 1:0,003 până, la 1:0,009, la toate celelalte rapoarte de funcționalizare creșterea bacteriană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

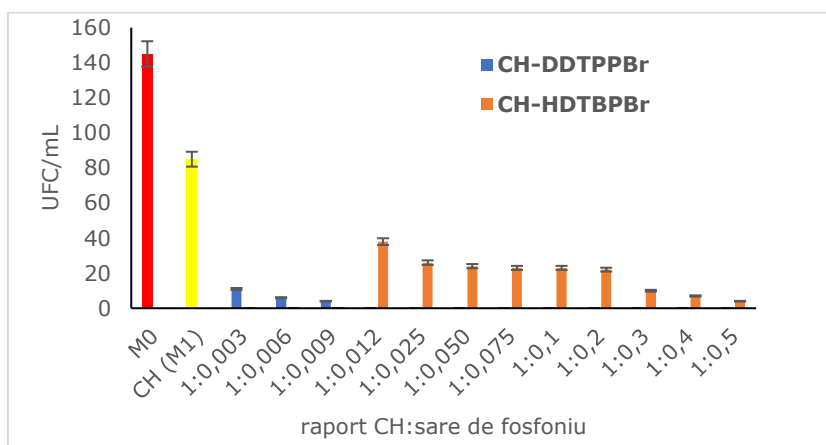
La rapoartele de funcționalizare CH:sare cuaternară de amoniu mai mici, rata de inhibiție a creșterii bacteriene a variat între 49,41 %, pentru materialul CH-DDTMABr obținut la raport CH:DDTMABr=1:0,012 și 92,94% pentru materialul CH-TDTMABr obținut la raport CH-TDTMABr=1:0,009 (Figura 6.10).



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

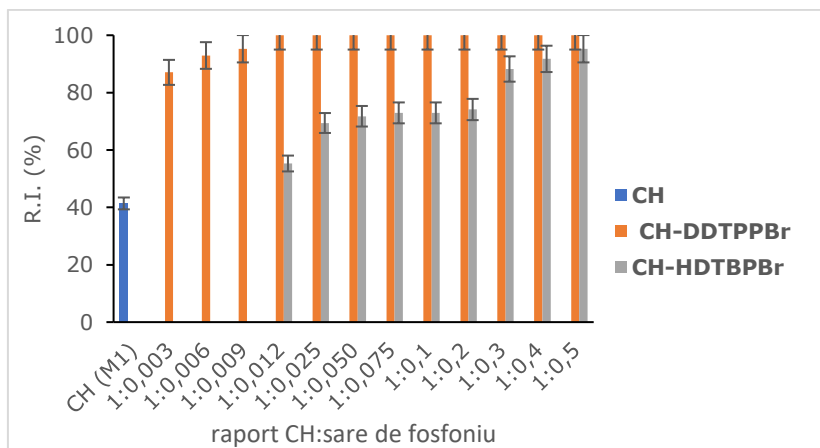
La rapoarte mici de funcționalizare, pentru materialele CH-săruri cuaternare de amoniu, efectul antibacterian a fost corelat cu lungimea substituentului alchil al fiecărui extractant, respectiv cu distanța de la azotul cuaternar până la scheletul de bază al chitosanului, dată de conformația acestui braț.

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 inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri de fosfoniu

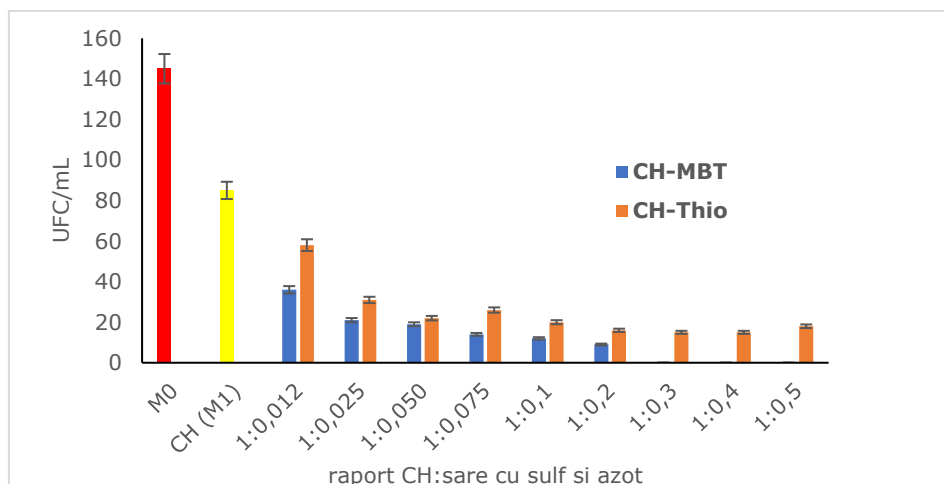
## 6.2. Efectul antimicrobian al materialelor obținute prin funcționalizarea CH asupra unui inocul heterotrof | 123

Rata de inhibiție 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.

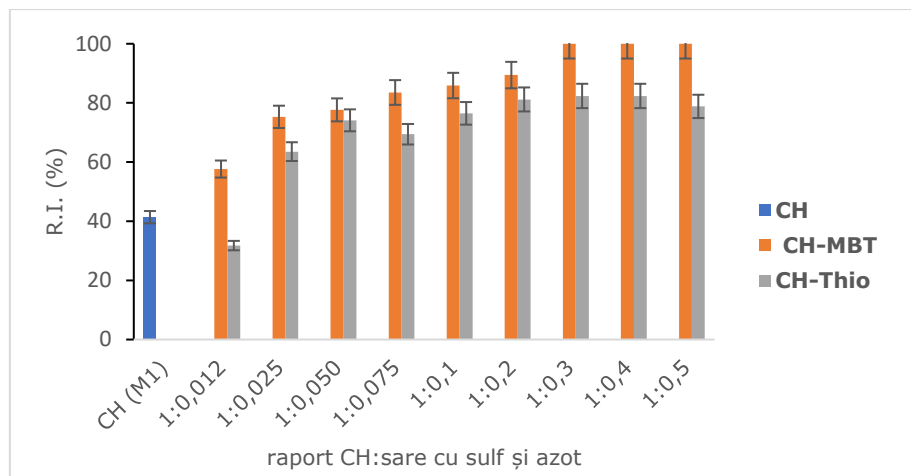
Pentru **materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot**, rezultatele sunt similare cu cele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cu sulf și azot. Efect antibacterian mai bun are materialul CH-MBT, comparativ cu materialul CH-Thio, indiferent de raportul de funcționalizare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



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

Rata de inhibiție 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.

La raport de funcționalizare CH:Thio=1:0,012 pentru materialul CH-Thio a fost obținută o rată de inhibiție 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 inhibiție de 78,82%. Pe baza acestor rezultate, deși raportul de funcționalizare CH:Thio a fost crescut de 50 ori, rata de inhibiție 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.



**Figura 6.14.** Rata de inhibiție bacteriană, în cazul materialelor obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cu sulf și azot

Datorită prezenței grupării – NH<sub>2</sub>, care acționează ca un nucleofil puternic, CH poate fi funcționalizat cu o gamă largă de grupări active/pendante pentru a i se modula structura pentru aplicații specifice. Această versatilitate structurală îi conferă chitosanului modificate 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 monomerică permite formarea de legături de H intramoleculare și intermoleculare puternice.

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

Cei doi polimeri naturali studiați, CE și CH, deși au structuri moleculare similare, cu aceleași legături β-glicozidice între unitățile monomere, sub aspectul naturii chimice a polimerilor naturali 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 polimerilor naturali 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.

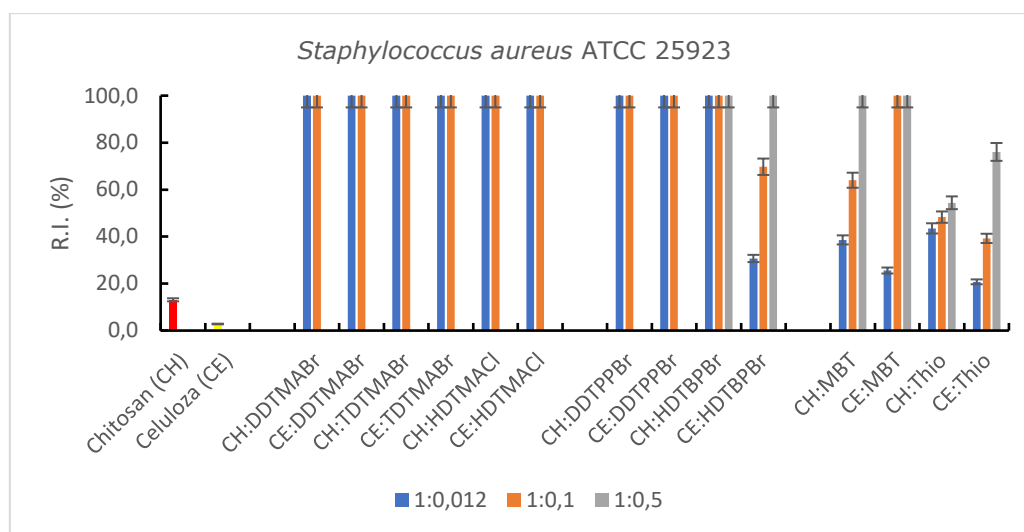
Astfel a fost urmărit modul de răspuns al bacteriilor studiate sub acțiunea materialelor obținute prin funcționalizarea celulozei, respectiv chitosanului, cu grupări de azot, fosfor sau sulf, având structură chimică diferită. În toate cazurile, materialul sintetizat a avut efect antibacterian îmbunătățit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

Testele microbiologice de control s-au efectuat utilizând o suspensie bacteriană de aproximativ 1x10<sup>8</sup> UFC/mL din tulpini microbiene de referință (ATCC). Pentru a pune în evidență efectul asupra bacteriilor Gram-negative au fost studiate

6.3. Efectul antimicrobian al materialelor asupra tulpinilor de referință. Prezentare comparativă. **125**

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.

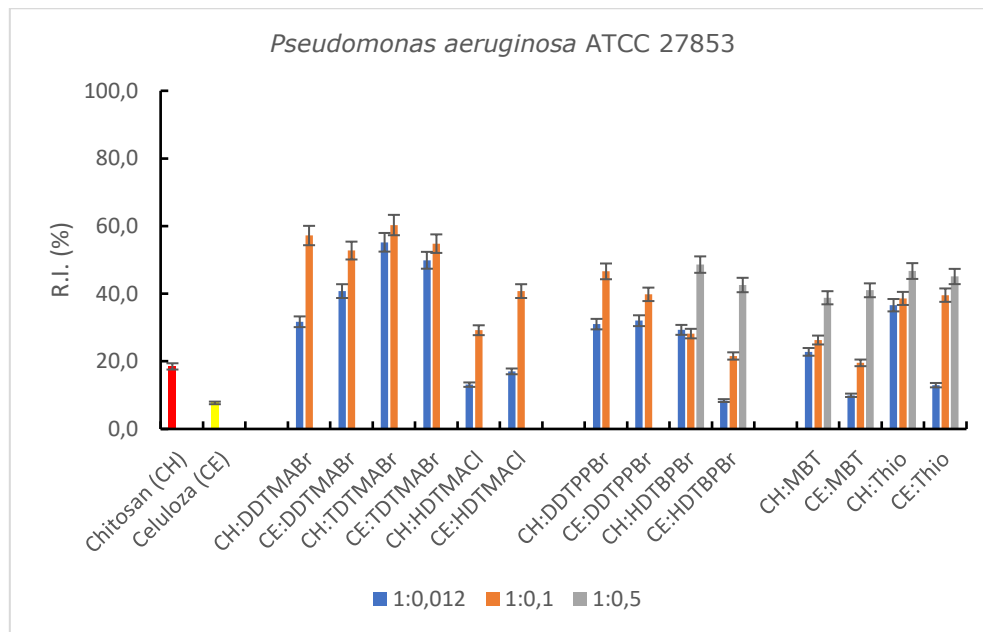
CE nefuncționalizată a manifestat efect bactericid ușor mai slab asupra bacteriilor Gram-pozitive (Figura 6.15), comparativ cu cele Gram-negative (Figura 6.16 și Figura 6.17), în timp ce chitosanul nativ a prezentat efect bactericid ușor mai bun asupra bacteriilor Gram-negative (Figura 6.16 și Figura 6.17).



**Figura 6.15.** Rata de inhibiție 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 inhibiție 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 biocizi.



**Figura 6.16.** Rata de inhibiție 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.

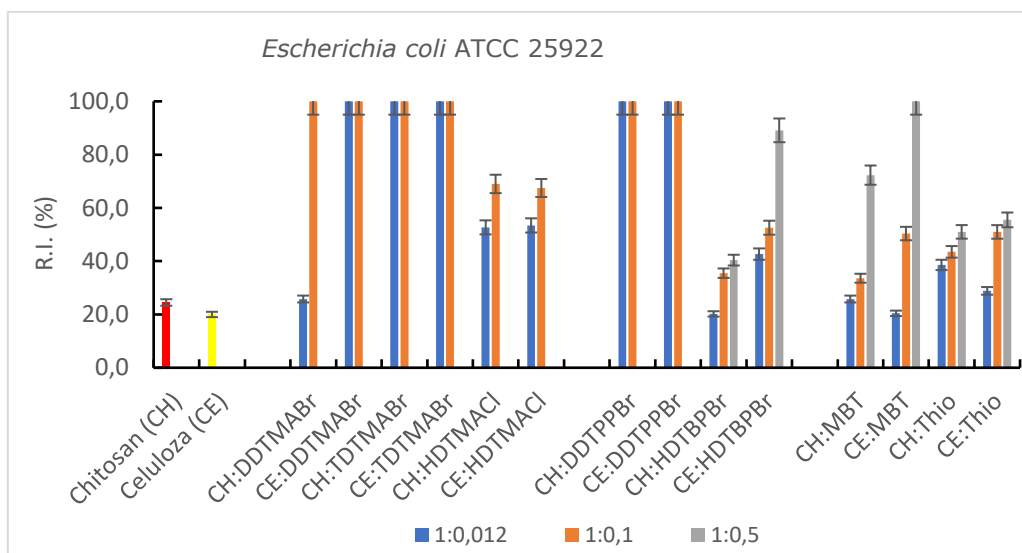
Toate materialele obținute prin funcționalizarea CH cu săruri cuaternare de amoniu au prezentat o activitate antibacteriană mai mare, în general, împotriva *Staphylococcus aureus*, decât asupra speciei *Escherichia coli* (Figura 6.15 și Figura 6.17).

Toate materialele obținute prin funcționalizarea CE cu săruri cuaternare de amoniu utilizate (DDTMABr, TDTMABr, HDTMACI), 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*.

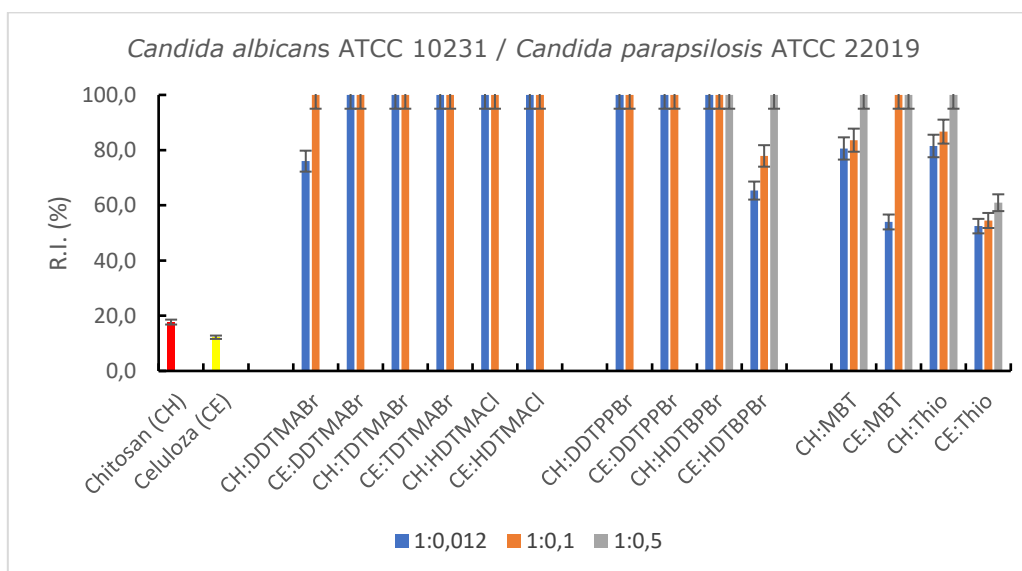
Materialul aderă puternic la peretele celular bacterian și pe membrana celulară fungică, deteriorându-le structura și nepermițând schimbul de elemente nutritive necesare pentru dezvoltarea microbiană, ceea ce ulterior duce la moartea celulei, și obținerea efectului antimicrobian.

6.3. Efectul antimicrobian al materialelor asupra tulpinilor de referință. Prezentare comparativă. |127



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

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



**Figura 6.18.** Rata de inhibiție 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. Inhibiția 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 și azot au manifestat în general efect bacteriostatic sau fungistatic. Excepție a fost în cazul materialului CH-MBT când s-a atins rata de inhibiție 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 și azot, 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 și azot.

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.

Hidrofobitatea, 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 polimerilor naturali 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 polimerului natural.

În cazul materialelor obținute prin funcționalizarea polimerilor naturali cu săruri de fosfoniu, activitatea antibacteriană a fost puternic influențată caracterul hidrofob al grupării pendante (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 polimerilor naturali 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 HDTPPBr, adică CE-HDTPPBr și CH-HDTPPBr, 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



6.3. Efectul antimicrobian al materialelor asupra  
tulpinilor de referință. Prezentare comparativă. **129**

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 polimerilor naturali 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**. Cinci dintre lucrări sunt clasificate Q1, iar o lucrare Q2. De asemenea, s-a realizat 1 lucrare de licență și 1 lucrare de disertație; **Suma factorilor de impact este 28,136. H-index-3.**

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

**BIBLIOGRAFIE**

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. Duval, R.E., J. Gouyau, and E. Lamouroux, *Limitations of Recent Studies Dealing with the Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles: Fact and Opinion*. Nanomaterials (Basel), 2019. **9**(12).
17. Gunpath, U.F., et al., *Antibacterial properties of silver nanoparticles grown in situ and anchored to titanium dioxide nanotubes on titanium implant against Staphylococcus aureus*. Nanotoxicology, 2020. **14**(1): p. 97-110.
18. Tufail, M.S., et al., *Biogenic Synthesis, Characterization and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles against Human Pathogens*. J Oleo Sci, 2022. **71**(2): p. 257-265.

19. Keshvardoostchokami, M., et al., *Fabrication and Antibacterial Properties of Silver/Graphite Oxide/Chitosan and Silver/Reduced Graphene Oxide/Chitosan Nanocomposites*. JOM, 2020. **72**.
20. Chang, C.-C., et al., *Photocatalytic properties of nanocrystalline TiO<sub>2</sub> thin film with Ag additions*. Thin Solid Films, 2006. **494**: p. 274-278.
21. Yu, D.-G., *Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na-poly (??-glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2007. **59**: p. 171-8.
22. Courrol, L., F. Silva, and L. Gomes, *A simple method to synthesize silver nanoparticles by photo-reduction*. Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects - COLLOID SURFACE A, 2007. **305**: p. 54-57.
23. Sathishkumar, M., et al., *Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009. **73**(2): p. 332-8.
24. Kalishwaralal, K., et al., *Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Brevibacterium casei*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010. **77**(2): p. 257-62.
25. Zeiri, L., et al., *Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002. **208**: p. 357-362.
26. Shahverdi, A.R., et al., *Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach*. Process Biochemistry, 2007. **42**(5): p. 919-923.
27. Duran, N., et al., *Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Textile Fabrics and Their Effluent Treatment*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2007. **3**: p. 203-208.
28. Dastjerdi, R., et al., *Investigating the Production and Properties of Ag/TiO<sub>2</sub>/PP Antibacterial Nanocomposites Filament Yarns*. The Journal of The Textile Institute, 2010. **101**: p. 204-213.
29. Mucha, H., et al., *Antimicrobial finishes and modifications*. Mellind International, 2002. **8**: p. 148-151.
30. Dastjerdi, R., M.R. M. Mojtahedi, and A. Shoshtari, *Comparing the Effect of Three Processing Methods for Modification of Filament Yarns with Inorganic Nanocomposite Filler and their Bioactivity Against Staphylococcus aureus*. Macromolecular Research, 2009. **17**: p. 378-387.
31. Lok, C.N., et al., *Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles*. J Proteome Res, 2006. **5**(4): p. 916-24.
32. Jeong, S., Y. Hwang, and S. Yi, *Antibacterial properties of padded PP/PE nonwovens incorporating nano-sized silver colloids*. Journal of Materials Science, 2005. **40**: p. 5413-5418.
33. Wright, T., *Alphasan: Athermally stable silver based inorganic antimicrobial technology*. Chemical Fibers International, 2002. **52**.
34. Kim, J.S., et al., *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. Nanomedicine, 2007. **3**(1): p. 95-101.
35. Stobie, N., et al., *Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating*. Biomaterials, 2008. **29**(8): p. 963-9.
36. Wen, H.-C., et al., *Observation of Growth of Human Fibroblasts on Silver Nanoparticles*. Journal of Physics: Conference Series, 2007. **61**: p. 445.
37. Paknikar, K.M., *Anti-Microbial Activity Of Biologically Stabilized Silver Nano Particles*. 2007.

38. Jia, X., et al., *Direct formation of silver nanoparticles in cuttlebone-derived organic matrix for catalytic applications*. Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects - COLLOID SURFACE A, 2008. **330**: p. 234-240.
39. Pape, H., et al., *Evaluation of the anti-microbial properties of an activated carbon fibre supporting silver using a dynamic method*. Carbon, 2002. **40**: p. 2947-2954.
40. da Silva Paula, M.M., et al., *Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly- $\{styrene-acrylic\}$  acid with silver nanoparticles*. Materials Science and Engineering: C, 2009. **29**(2): p. 647-650.
41. Sun, Y., et al., *Crystalline Silver Nanowires by Soft Solution Processing*. Nano Letters - NANO LETT, 2002. **2**.
42. Saponjic, Z., et al., *Antifungal efficiency of corona pretreated polyester and polyamide fabrics loaded with Ag nanoparticles*. Journal of Materials Science, 2009. **44**: p. 3983-3990.
43. Wang, S., et al., *Antibacterial activity of nano-SiO<sub>2</sub> antibacterial agent grafted on wool surface*. Surface and Coatings Technology, 2007. **202**(3): p. 460-465.
44. Oh, S.-D., et al., *Synthesis of Ag and Ag-SiO<sub>2</sub> nanoparticles by gamma-irradiation and their antibacterial and antifungal efficiency against Salmonella enterica serovar Typhimurium and Botrytis cinerea*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **275**: p. 228-233.
45. Fu, J., et al., *Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex*. Journal of biomedical materials research. Part A, 2006. **79**: p. 665-74.
46. Liu, J.-K., X.-H. Yang, and X.-G. Tian, *Preparation of silver/hydroxyapatite nanocomposite spheres*. Powder Technology, 2008. **184**: p. 21-24.
47. Chen, W., et al., *In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating*. Biomaterials, 2006. **27**(32): p. 5512-5517.
48. Park, S.-H., et al., *Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2006. **48**: p. 112-8.
49. Yonezawa, T. and T. Kunitake, *Practical preparation of anionic mercapto ligand-stabilized gold nanoparticles and their immobilization*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1999. **149**: p. 193-199.
50. Nirmala Grace, A. and K. Pandian, *Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **297**(1): p. 63-70.
51. Zhang, Y., et al., *Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles*. Journal of colloid and interface science, 2008. **325**: p. 371-6.
52. Esteban, A., et al., *Antibacterial Activity of Copper Monodispersed Nanoparticles into sepiolite*. Journal of Materials Science, 2006. **41**: p. 5208-5212.
53. Valappil, S., et al., *Antimicrobial Gallium-Doped Phosphate-Based Glasses*. Advanced Functional Materials, 2008. **18**: p. 732-741.
54. Roessler, S., et al., *Characterization of oxide layers on Ti6Al4V and titanium by streaming potential and streaming current measurements*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002. **26**(4): p. 387-395.
55. Cai, K., J. Bossert, and K. Jandt, *Does the Nanometre Scale Topography of Titanium Influence Protein Adsorption and Cell Proliferation*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2006. **49**: p. 136-44.

56. Fu, G., P. Vary, and C.-T. Lin, *Anatase TiO<sub>2</sub> Nanocomposites for Antimicrobial Coatings*. The journal of physical chemistry. B, 2005. **109**: p. 8889-98.
57. Bae, H.S., et al., *Dispersion properties of TiO<sub>2</sub> nano-powder synthesized by homogeneous precipitation process at low temperatures*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. **220**(1): p. 169-177.
58. Lo, P.-H., A. Sundramoorthy, and S.-M. Chen, *Amperometric determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at nano-TiO<sub>2</sub>/DNA/thionin nanocomposite modified electrode*. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2008. **66**: p. 266-73.
59. Zhang, Y., et al., *Functionalized polydiacetylene-glycolipid vesicles interacted with Escherichia coli under the TiO<sub>2</sub> colloid*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2005. **40**(3-4): p. 137-42.
60. Kanehira, K., et al., *Properties of TiO<sub>2</sub>-polyacrylic acid dispersions with potential for molecular recognition*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2008. **64**(1): p. 10-5.
61. Rajagopal, G., et al., *Biocidal effects of photocatalytic semiconductor TiO<sub>2</sub>*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006. **51**(2): p. 107-11.
62. Dong, Y., et al., *Finishing of Cotton Fabrics with Aqueous Nano-Titanium Dioxide Dispersion and the Decomposition of Gaseous Ammonia by Ultraviolet Irradiation*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **99**: p. 286-291.
63. Uddin, M.J., et al., *Photoactive TiO<sub>2</sub> films on cellulose fibres: synthesis and characterization*. Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry, 2007. **189**: p. 286-294.
64. Tan, T.T.Y., et al., *Effects of nano-Ag particles loading on TiO<sub>2</sub> photocatalytic reduction of selenate ions*. Chemical Engineering Journal, 2003. **95**(1): p. 179-186.
65. Wang, H., et al., *Sonophotocatalytic degradation of methyl orange by nano-sized Ag/TiO<sub>2</sub> particles in aqueous solutions*. Ultrasonics Sonochemistry, 2008. **15**(4): p. 386-392.
66. Mahltig, B., H. Haufe, and H. Boettcher, *Functionalisation of Textiles by Inorganic Sol-Gel Coatings*. Journal of Materials Chemistry - J MATER CHEM, 2005. **15**.
67. Han, K. and M. Yu, *Study of the Preparation and Properties of UV-Blocking Fabrics of a PET/TiO<sub>2</sub> Nanocomposite Prepared by In Situ Polycondensation*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **100**: p. 1588-1593.
68. Ikezawa, S., et al., *Applications of TiO<sub>2</sub> film for environmental purification deposited by controlled electron beam-excited plasma*. Thin Solid Films, 2001. **386**(2): p. 173-176.
69. Li, D., et al., *Visible-Light-Driven N-F-Codoped TiO<sub>2</sub> Photocatalysts. 2. Optical Characterization, Photocatalysis, and Potential Application to Air Purification*. Chemistry of Materials - CHEM MATER, 2005. **17**.
70. Cermenati, L., et al., *Probing the TiO<sub>2</sub> Photocatalytic Mechanisms in Water Purification by Use of Quinoline, Photo-Fenton Generated OH• Radicals and Superoxide Dismutase*. The Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(14): p. 2650-2658.
71. Daoud, W. and J. Xin, *Low Temperature Sol-Gel Processed Photocatalytic Titania Coating*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2004. **29**: p. 25-29.
72. Daoud, W.A., J.H. Xin, and Y.-H. Zhang, *Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities*. Surface Science, 2005. **599**(1): p. 69-75.
73. Chen, C.-C. and C.-C. Wang, *Crosslinking of cotton cellulose with succinic acid in the presence of titanium dioxide nano-catalyst under UV irradiation*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2006. **40**: p. 31-38.

74. Hsieh, S.-H., F.-R. Zhang, and H.-S. Li, *Anti-ultraviolet and physical properties of woolen fabrics cured with citric acid and TiO<sub>2</sub>/chitosan*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **100**(6): p. 4311-4319.
75. Linsebigler, A.L., G. Lu, and J.T. Yates, Jr., *Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results*. Chemical Reviews, 1995. **95**(3): p. 735-758.
76. Yuranova, T., et al., *Self-cleaning cotton textiles surfaces modified by photoactive SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> coating*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2006. **244**(1): p. 160-167.
77. Yen, C.Y., et al., *The effects of synthesis procedures on the morphology and photocatalytic activity of multi-walled carbon nanotubes/TiO<sub>2</sub> nanocomposites*. Nanotechnology, 2008. **19**(4): p. 045604.
78. Chen, L., et al., *Preparation and characterization of CNTs-TiO<sub>2</sub> composites*. Powder Technology - POWDER TECHNOL, 2005. **154**: p. 70-72.
79. Pushpakanth, S., et al., *An In Situ Approach to Prepare Nanorods of Titania Hydroxyapatite (TiO<sub>2</sub>eHAp) Nanocomposite by Microwave Hydrothermal Technique*. Materials Chemistry and Physics, 2008. **107**: p. 492-498.
80. Arnold, M.S., et al., *Field-Effect Transistors Based on Single Semiconducting Oxide Nanobelts*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(3): p. 659-663.
81. Xiong, M., et al., *Preparation and Characterization of Poly(Styrene Butylacrylate) Latex/Nano-ZnO Nanocomposites*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **90**: p. 1923-1931.
82. Behnajady, M.A., N. Modirshahla, and R. Hamzavi, *Kinetic study on photocatalytic degradation of C.I. Acid Yellow 23 by ZnO photocatalyst*. J Hazard Mater, 2006. **133**(1-3): p. 226-32.
83. Li, Y.-Q., S.-Y. Fu, and Y.W. Mai, *Preparation and Characterization of Transparent ZnO/Epoxy Nanocomposites with High-UV Shielding Efficiency*. Polymer, 2006. **47**: p. 2127-2132.
84. Tang, E., et al., *Surface Modification of Zinc Oxide Nanoparticle by PMAA and its Dispersion in Aqueous System*. Applied Surface Science - APPL SURF SCI, 2006. **252**: p. 5227-5232.
85. Wang, Z., *Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications*. J. Phys.: Condens. Matter, 2004. **16**: p. 829-858.
86. Wang, Z.L., *Nanostructures of zinc oxide*. Materials Today, 2004. **7**(6): p. 26-33.
87. Wang, Z., *Novel Nanostructures of ZnO for Nanoscale Photonics, Optoelectronics, Piezoelectricity, and Sensing*. Applied Physics A, 2007. **88**: p. 7-15.
88. Nadanathangam, V., et al., *Functional Finishing of Cotton Fabrics Using Zinc Oxide-Soluble Starch Nanocomposites*. Nanotechnology, 2006. **17**: p. 5087.
89. Becheri, A., et al., *Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: Application to textiles as UV-absorbers*. Journal of Nanoparticle Research, 2008. **10**: p. 679-689.
90. Xu, T. and C.S. Xie, *Tetrapod-Like Nano-Particle ZnO/Acrylic Resin Composite and its Multi-Function Property*. Progress in Organic Coatings, 2003. **46**: p. 297-301.
91. Li, Q., S.-L. Chen, and W.-C. Jiang, *Durability of Nano ZnO Antibacterial Cotton Fabric to Sweat*. Journal of Applied Polymer Science, 2007. **103**: p. 412-416.
92. Xu, B. and Z. Cai, *Fabrication of a Superhydrophobic ZnO Nanorod Array Film on Cotton Fabrics Via a Wet Chemical Route and Hydrophobic Modification*. Applied Surface Science - APPL SURF SCI, 2008. **254**: p. 5899-5904.

93. Pelgrift, R.Y. and A.J. Friedman, *Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. **65**(13): p. 1803-1815.
94. Pawar, S.H., S.S. Rohiwal, and J. Yakhmi, *Organic-inorganic antimicrobial nanostructures for health care applications*. *Biomaterials and Tissue Engineering Bulletin*, 2017. **4**(1-4): p. 66-80.
95. Ansari, M.A., et al., *Interaction of Al(2)O(3) nanoparticles with Escherichia coli and their cell envelope biomolecules*. *J Appl Microbiol*, 2014. **116**(4): p. 772-83.
96. Sadiq, I.M., et al., *Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles*. *Nanomedicine*, 2009. **5**(3): p. 282-6.
97. Li, B. and B.E. Logan, *Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2004. **36**(2): p. 81-90.
98. Ruparelia, J.P., et al., *Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*. *Acta Biomater*, 2008. **4**(3): p. 707-16.
99. Scharfel, B., et al., *Fire Behaviour of Polyamide 6/Multiwall Carbon Nanotube Nanocomposites*. *European Polymer Journal*, 2005. **41**: p. 1061-1070.
100. Xue, P., et al., *Electrically conductive yarns based on PVA/carbon nanotubes*. *Composite Structures*, 2007. **78**(2): p. 271-277.
101. Panhuis, M., et al., *Conducting textiles from single-walled carbon nanotubes*. *Synthetic Metals*, 2007. **157**: p. 358-362.
102. Hecht, D., L. Hu, and G. Gruner, *Electronic properties of carbon nanotube/fabric composites*. *Current Applied Physics - CURR APPL PHYS*, 2007. **7**: p. 60-63.
103. Mondal, S. and J. Hu, *A novel approach to excellent UV protecting cotton fabric with functionalized MWNT containing water vapor permeable PU coating*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007. **103**.
104. Perelshtein, I., et al., *Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity*. *Nanotechnology*, 2008. **19**(24): p. 245705.
105. Kim, H., et al., *Preparation and characterization of poly[(butylene succinate)-co-(butylene adipate)]/carbon nanotube-coated silk fiber composites*. *Polymer International*, 2007. **56**: p. 1035-1039.
106. Kang, S., et al., *Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity*. *Langmuir*, 2007. **23**(17): p. 8670-3.
107. Kang, S., et al., *Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter!* *Langmuir*, 2008. **24**(13): p. 6409-13.
108. Liu, Y., et al., *Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7*. *J Appl Microbiol*, 2009. **107**(4): p. 1193-201.
109. Nguyen, V.H., et al., *Preparation and antibacterial activity of silver nanoparticles-decorated graphene composites*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2012. **72**: p. 28-35.
110. Das, M.R., et al., *Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011. **83**(1): p. 16-22.
111. Kodgire, P., et al., *PP/clay nanocomposites: Effect of clay treatment on morphology and dynamic mechanical properties*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001. **81**: p. 1786-1792.
112. Kojima, Y., et al., *Synthesis of nylon 6-clay hybrid by montmorillonite intercalated with  $\epsilon$ -caprolactam*. *Journal of Polymer Science A Polymer Chemistry*, 1993. **31**: p. 983-986.

113. Mlynarčíková, Z., et al., *Influence of the Composition of Polypropylene/Organoclay Nanocomposite Fibers on their Tensile Strength*. Journal of Macromolecular Science, Part A, 2005. **42**: p. 543-554.
114. Pavliková, S., et al., *Fiber spinning from poly(propylene)-organoclay nanocomposite*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **89**: p. 604-611.
115. Ajayan, P.M., L.S. Schadler, and P.V. Braun, *Nanocomposite science and technology*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH.
116. Razafimahefa, L., et al., *Effect of nanoclay on the dyeing ability of PA6 nanocomposite fibers*. Dyes and Pigments - DYE PIGMENT, 2005. **66**: p. 55-60.
117. Yano, K., et al., *Synthesis and properties of polyimide-clay hybrid*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 1993. **31**(10): p. 2493-2498.
118. Usuki, A., et al., *Interaction of nylon 6-clay surface and mechanical properties of nylon 6-clay hybrid*. Journal of Applied Polymer Science, 1995. **55**(1): p. 119-123.
119. Utracki, L., *Clay-Containing Polymeric Nanocomposites*. Polymer News, 2004. **1**.
120. A., U.L., *Clay-Containing Polymeric Nanocomposites*. 2004. **2**.
121. Pavlidou, S. and C.D. Papaspyrides, *A review on polymer-layered silicate nanocomposites*. Progress in Polymer Science, 2008. **33**(12): p. 1119-1198.
122. Vlasveld, D.P.N., et al., *Analysis of the modulus of polyamide-6 silicate nanocomposites using moisture controlled variation of the matrix properties*. Polymer, 2005. **46**(16): p. 6102-6113.
123. Vlasveld, D.P.N., H.E.N. Bersee, and S.J. Picken, *Creep and physical aging behaviour of PA6 nanocomposites*. Polymer, 2005. **46**(26): p. 12539-12545.
124. Fornes, T.D., et al., *Effect of organoclay structure on nylon 6 nanocomposite morphology and properties*. Polymer, 2002. **43**(22): p. 5915-5933.
125. González, I., J.I. Eguiazábal, and J. Nazábal, *Nanocomposites based on a polyamide 6/maleated styrene-butylene-co-ethylene-styrene blend: Effects of clay loading on morphology and mechanical properties*. European Polymer Journal, 2006. **42**(11): p. 2905-2913.
126. Cotterell, B., J.Y.H. Chia, and K. Hbaieb, *Fracture mechanisms and fracture toughness in semicrystalline polymer nanocomposites*. Engineering Fracture Mechanics, 2007. **74**(7): p. 1054-1078.
127. Ha, S.R., et al., *Fracture performance of clay/epoxy nanocomposites with clay surface-modified using 3-aminopropyltriethoxysilane*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. **313**: p. 112-115.
128. Vlasveld, D.P.N., et al., *Moisture absorption in polyamide-6 silicate nanocomposites and its influence on the mechanical properties*. Polymer, 2005. **46**(26): p. 12567-12576.
129. Cui, L., X. Ma, and D.R. Paul, *Morphology and properties of nanocomposites formed from ethylene-vinyl acetate copolymers and organoclays*. Polymer, 2007. **48**(21): p. 6325-6339.
130. Yoon, P.J., T.D. Fornes, and D.R. Paul, *Thermal expansion behavior of nylon 6 nanocomposites*. Polymer, 2002. **43**(25): p. 6727-6741.
131. Wilson, M.J., *Clay Mineralogical and Related Characteristics of Geophagic Materials*. Journal of Chemical Ecology, 2003. **29**(7): p. 1525-1547.
132. Williams, L., et al., *Killer Clays! Natural antibacterial clay minerals*. Mineralogical Society Bulletin, 2004. **139**.
133. Haydel, S.E., C.M. Remenih, and L.B. Williams, *Broad-spectrum in vitro antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(2): p. 353-61.



134. Seckin, T., et al., *Preparation and characterization of a clay-polyvinylpyridinium matrix for the removal of bacterial cells from water*. Journal of Materials Science, 1997. **32**(22): p. 5993-5999.
135. Hu, C.H., Z.R. Xu, and M.S. Xia, *Antibacterial effect of Cu<sup>2+</sup>-exchanged montmorillonite on Aeromonas hydrophila and discussion on its mechanism*. Vet Microbiol, 2005. **109**(1-2): p. 83-8.
136. Barbier, F., G. Duc, and M. Petit-Ramel, *Adsorption of lead and cadmium ions from aqueous solution to the montmorillonite/water interface*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2000. **166**: p. 153-159.
137. Magaña, S.M., et al., *Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2008. **281**(1): p. 192-199.
138. Zhou, N.-l., et al., *A new nanocomposite biomedical material of polymer/Clay-Cts-Ag nanocomposites*. Current Applied Physics, 2007. **7**.
139. Volodkin, D., et al., *Control of the interaction between membranes or vesicles: Adhesion, fusion and release of dyes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **303**: p. 89-96.
140. Huwyler, J., J. Yang, and W.M. Pardridge, *Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **282**(3): p. 1541-6.
141. Montazer, M., et al., *Optimization of dyeing of wool with madder and liposomes by central composite design*. Journal of Applied Polymer Science, 2007. **106**(3): p. 1614-1621.
142. N.C. Beck Tana, L.B., S.F. Trevino, D.A. Tomaliab, J.S. Lin, *A small angle scattering study of dendrimer-copper sulfide nanocomposites*. Polymer, 1999. **40**: p. 2537-2545.
143. Jin-An He, R.V., Ke Yang, Tigran Dolukhanyan, Changmo Sung, Jayant Kumar, and Sukant K. Tripathy, *Electrostatic Multilayer Deposition of a Gold-Dendrimer Nanocomposite*. Chem. Mater, 1999. **11**: p. 3268-3274.
144. Balogh, L., D. Tomalia, and G.L. Hagnauer, *A revolution of nanoscale proportions*. Chemical Innovation, 2001. **30**: p. 19-26.
145. Raveendran, P., et al., *Stabilization and growth of silver nanocrystals in dendritic polyol dispersions*. Materials Letters, 2006. **60**: p. 897-900.
146. Balogh, L., et al., *Dendrimer-Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents*. Nano Letters - NANO LETT, 2000. **1**.
147. Volodkin, D.V., et al., *Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation*. Langmuir, 2004. **20**(8): p. 3398-406.
148. Mao, J., *Durable antimicrobial finish for cotton with new technology*. Aatcc Review, 2002. **2**: p. 15-17.
149. Shim, J., et al., *Zinc oxide/polymethylmethacrylate composite microspheres by in situ suspension polymerization and their morphological study*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002. **207**: p. 105-111.
150. Singh, M., R. Sharma, and U.C. Banerjee, *Biotechnological applications of cyclodextrins*. Biotechnol Adv, 2002. **20**(5-6): p. 341-59.
151. Del Valle, E.M.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*. Process Biochemistry, 2004. **39**(9): p. 1033-1046.
152. Voncina, B., V. Vivod, and D. Jaušovec,  *$\beta$ -Cyclodextrin as retarding reagent in polyacrylonitrile dyeing*. Dyes and Pigments, 2007. **74**: p. 642-646.
153. Vögtle, F.F., *Supramolecular chemistry : an introduction*. 1991.
154. Weber, E. *Clathrate chemistry today — Some problems and reflections*. 1987. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

155. Savarino, P., et al., *Reactivity and effects of cyclodextrins in textile dyeing*. Dyes and Pigments, 1999. **42**(2): p. 143-147.
156. Szejtli, J., *Past, Present, and Future of Cyclodextrin Research*. Pure and Applied Chemistry - PURE APPL CHEM, 2004. **76**: p. 1825-1845.
157. Szejtli, J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. Chem Rev, 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
158. Hedges, A.R., *Industrial Applications of Cyclodextrins*. Chem Rev, 1998. **98**(5): p. 2035-2044.
159. Irie, T. and K. Uekama, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation*. J Pharm Sci, 1997. **86**(2): p. 147-62.
160. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. **85**(10): p. 1017-1025.
161. Eastburn, S.D. and B.Y. Tao, *Applications of modified cyclodextrins*. Biotechnol Adv, 1994. **12**(2): p. 325-39.
162. Martel, B., et al., *Finishing of Polyester Fabrics with Cyclodextrins and Polycarboxylic Acids as Crosslinking Agents*. Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry, 2002. **44**(1): p. 443-446.
163. Martel, B., et al., *Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters*. Journal of Applied Polymer Science, 2005. **97**: p. 433-442.
164. Martel, B., et al., *Capture and Controlled Release of Fragrances by CD Finished Textiles*. Journal of Inclusion Phenomena, 2002. **44**: p. 439-442.
165. Ducoroy, L., et al., *Ion exchange textiles from the finishing of PET fabrics with cyclodextrins and citric acid for the sorption of metallic cations in water*. Journal of Inclusion Phenomena, 2007. **57**: p. 271-277.
166. Ducoroy, L., et al., *Cation exchange finishing of nonwoven polyester with polycarboxylic acids and cyclodextrins*. Journal of Applied Polymer Science, 2007. **103**: p. 3730-3738.
167. Lee, M., K. Yoon, and S.-W. Ko, *Grafting onto cotton fiber with acrylamidomethylated  $\beta$ -cyclodextrin and its application*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **78**: p. 1986-1991.
168. Montazer, M. and E.B. Mehr, *Na-diclofenac  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex on cotton wound dressing*. The Journal of The Textile Institute, 2010. **101**: p. 373 - 379.
169. Hasirci, V. and N. Hasirci, *Fundamentals of Biomaterials*. 2018.
170. Carraher, C.E., *Introduction to polymer chemistry*. 2013.
171. Aneesa Padinjakkara, A.T., Fernando Gomes Souza, Jr., Sabu Thomas, *Biopolymers and Biomaterials*, ed. s. Edition. 2018. 386.
172. Domb, A., K.R. Kunduru, and S. Farah, *Antimicrobial Materials for Biomedical Applications*. 2019.
173. Roberson, C., *Cellulose Acetate: Properties, Uses and Preparation*. Chemistry Research and Applications. 2018: Nova Science Publishers Inc.
174. Kargarzadeh, H.A., Ishak; Thomas, Sabu; Dufresne, Alain, *Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites*. 2017, Wiley-VCH.
175. Shanks, R.A., *2 - Chemistry and structure of cellulosic fibres as reinforcements in natural fibre composites*, in *Natural Fibre Composites*, A. Hodzic and R. Shanks, Editors. 2014, Woodhead Publishing. p. 66-83.
176. Lavoine, N., et al., *Microfibrillated cellulose - its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review*. Carbohydr Polym, 2012. **90**(2): p. 735-64.

177. Park, S.Y., et al., *Covalent assembly of metal nanoparticles on cellulose fabric and its antimicrobial activity*. Cellulose, 2012. **19**.
178. Jonoobi, M., et al., *Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review*. Cellulose, 2015. **22**.
179. Moriana, R., F. Vilaplana, and M. Ek, *Cellulose Nanocrystals from Forest Residues as Reinforcing Agents for Composites: A Study from Macro- to Nano-Dimensions*. Carbohydr Polym, 2016. **139**: p. 139-49.
180. Malucelli, L., et al., *Preparation, properties and future perspectives of nanocrystals from agro-industrial residues: a review of recent research*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2017. **16**.
181. Habibi, Y., L.A. Lucia, and O.J. Rojas, *Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications*. Chem Rev, 2010. **110**(6): p. 3479-500.
182. Bano, S. and Y.S. Negi, *Studies on cellulose nanocrystals isolated from groundnut shells*. Carbohydr Polym, 2017. **157**: p. 1041-1049.
183. George, J. and S.N. Sabapathi, *Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications*. Nanotechnol Sci Appl, 2015. **8**: p. 45-54.
184. Wang, S., A. Lu, and L. Zhang, *Recent advances in regenerated cellulose materials*. Progress in Polymer Science, 2016. **53**: p. 169-206.
185. Siqueira, G., J. Bras, and A. Dufresne, *Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications*. Polymers, 2010. **2**(4): p. 728-765.
186. Kupnik, K., et al., *Nanocellulose in Drug Delivery and Antimicrobially Active Materials*. Polymers (Basel), 2020. **12**(12).
187. Malmström, E. and A. Carlmark, *Controlled grafting of cellulose fibres - An outlook beyond paper and cardboard*. Polym. Chem., 2012. **3**: p. 1702-1713.
188. Bruel, C., et al., *The structural amphiphilicity of cellulose nanocrystals characterized from their cohesion parameters*. Carbohydr Polym, 2019. **205**: p. 184-191.
189. Imran, M., et al., *Synthesis, characterization and anticoagulant activity of chitosan derivatives*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2020. **28**(1): p. 25-32.
190. Jean-Luc Wertz, J.P.M., Olivier Bédué, *Cellulose Science and Technology* . , s. ed, Editor. 2010, EPFL Press, CRC Press: New York. p. 350.
191. Bosco, A., et al., *Changing lifestyle for dementia risk reduction: Inductive content analysis of a national UK survey*. PLoS One, 2020. **15**(5): p. e0233039.
192. Rojas, O.J., *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*, 1st, Editor. 2016: Advances in Polymer Science
193. Mondal, M.I.H., *Cellulose and Cellulose Composites: Modification, Characterization and Applications*. 2015.
194. Azizi Samir, M.A., F. Alloin, and A. Dufresne, *Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field*. Biomacromolecules, 2005. **6**(2): p. 612-26.
195. Timofeeva, L. and N. Kleshcheva, *Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **89**(3): p. 475-92.
196. Pandey, A., *Pharmaceutical and biomedical applications of cellulose nanofibers: a review*. Environmental Chemistry Letters, 2021. **19**.
197. Gregory, D., et al., *Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2021. **145**: p. 100623.

198. Morin-Crini, N., et al., *Fundamentals and Applications of Chitosan*. Sustainable Agriculture Reviews, 2019. **35**: p. 49-123.
199. Ahmed, S.I., Saiqa, *Chitosan : derivatives, composites and applications*. 2017: Scrivener Publishing LLC.
200. Davis, S.P., *Chitosan Manufacture Properties and Usage (Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine)*. 2018, Nova Science Publishers. p. 507.
201. 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.
202. Hadwiger, L.A., et al., *Chitin and Chitosan*. 1989. 138.
203. Prashanth, K.V.H. and R.N. Tharanathan, *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview*. Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**(3): p. 117-131.
204. Se-Kwon, K., ed. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*. CRC Press ed. 2011.
205. Dimzon, I.K.D., J. Ebert, and T.P. Knepper, *The interaction of chitosan and olive oil: Effects of degree of deacetylation and degree of polymerization*. Carbohydrate Polymers, 2013. **92**(1): p. 564-570.
206. Alvarenga, E., *Characterization and Properties of Chitosan*. 2011.
207. Anan, N., et al., *Preparation, characterization and pH-metric measurements of 4-hydroxysalicylidenechitosan Schiff-base complexes of Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Ru(III), Rh(III), Pd(II) and Au(III)*. Carbohydrate research, 2011. **346**: p. 775-93.
208. Vadivel, T. and M. Dhamodaran, *Synthesis, characterization and antibacterial studies of ruthenium(III) complexes derived from chitosan schiff base*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **90**: p. 44-52.
209. Barbosa, H.F.G., et al., *Characterization, solubility and biological activity of amphiphilic biopolymeric Schiff bases synthesized using chitosans*. Carbohydrate Polymers, 2019. **220**: p. 1-11.
210. Helander, I.M., et al., *Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **71**(2-3): p. 235-244.
211. Salama, H.E., G.R. Saad, and M.W. Sabaa, *Synthesis, characterization and biological activity of Schiff bases based on chitosan and arylpyrazole moiety*. International Journal of Biological Macromolecules, 2015. **79**: p. 996-1003.
212. Belbekhouche, S., et al., *Chitosan based self-assembled nanocapsules as antibacterial agent*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2019. **181**: p. 158-165.
213. Bhaskara Reddy, M.V., et al., *Effect of chitosan on growth and toxin production by Alternaria alternata f.sp. lycopersici*. Biocontrol Sci. Technol., 1998. **8**: p. 43.
214. Bhaskara Reddy, M.V., et al., *Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to Fusarium graminearum and Improves Seed Quality*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(3): p. 1208-1216.
215. Periyah, M., A. Halim, and A. Mat Saad, *Biotechnology & Biomaterials Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research*. Biotechnology & Biomaterials, 2014. **4**: p. 4.
216. Rendina, N., et al., *Chitosan-elicited defense responses in Cucumber mosaic virus (CMV)-infected tomato plants*. J Plant Physiol, 2019. **234-235**: p. 9-17.
217. Beuchat, L.R., *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. 1994. 179.
218. Shankar, S. and J.W. Rhim, *Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films*. Food Hydrocolloids, 2018. **82**: p. 116-123.

219. Shariatinia, Z., *Pharmaceutical applications of chitosan*. Advances in Colloid and Interface Science, 2018. **263**.
220. Liu, X., et al., *The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing*. Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1280-1288.
221. Cao, Y., et al., *Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery*. Marine drugs, 2019. **17**(6): p. 381.
222. Byun, S.M., et al., *Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells*. International Journal of Food Science & Technology, 2013. **48**(1): p. 136-142.
223. Ai, H., et al., *Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, Musca domestica L*. Food Chemistry, 2012. **132**(1): p. 493-498.
224. Batista, A.C.d.L., F.E.d. Souza Neto, and W.d.S. Paiva, *Review of fungal chitosan: past, present and perspectives in Brazil*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2018. **28**(3): p. 275-283.
225. Vishu Kumar, A.B., et al., *Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1670**(2): p. 137-146.
226. Kulikov, S.N., et al., *Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2006. **42**(2): p. 200-203.
227. Cabrera, J. and P.V. Cutsem, *Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **25**: p. 165-172.
228. Meng, X., et al., *Molecular weight and pH effects of aminoethyl modified chitosan on antibacterial activity in vitro*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **50**(4): p. 918-924.
229. Schleifer, K.H., *Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future*. Syst Appl Microbiol, 2009. **32**(8): p. 533-42.
230. Ruso, J.M. and P.V. Messina, *Biopolymers for medical applications*. 2017, Boca Raton, Fla: CRC Press.
231. Qin, J., et al., *Synthesis and Characterization of Alkylated Bacterial Cellulose in an Ionic Liquid*. BioResources, 2015. **10**.
232. Ninan, N., S. Mohan Bhagyaraj, and E. Francis, *Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends, and IPNs*. 2012.
233. Wüstenberg and Tanja. *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications*. 2014.
234. Oberlerchner, J.T., T. Rosenau, and A. Potthast, *Overview of Methods for the Direct Molar Mass Determination of Cellulose*. Molecules, 2015. **20**(6): p. 10313-41.
235. Zhou, Y., et al., *Molecular weight characterization of cellulose using ionic liquids*. Polymer Testing, 2021. **93**: p. 106985.
236. Thomas Heinze, O.A.E.S., Andreas Koschella, *Cellulose Derivatives: Synthesis, Structure, and Properties*. 2018, Springer International Publishing.
237. Hallac, B. and A. Ragauskas, *Analyzing Cellulose Degree of Polymerization and Its Relevancy to Cellulosic Ethanol*. Biofuels Bioproducts and Biorefining, 2011. **5**: p. 215-225.

238. Megashah, L., et al., *Modification of cellulose degree of polymerization by superheated steam treatment for versatile properties of cellulose nanofibril film*. Cellulose, 2020. **27**.
239. Grégorio, C., *Historical review on chitin and chitosan biopolymers*. Environmental Chemistry Letters, 2019. **17**: p. 1623–1643.
240. Ardean, C., et al., *Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(14).
241. Hosseinnejad, M. and S.M. Jafari, *Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **85**: p. 467-475.
242. Ai, H., et al., *Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, Musca domestica L.* Food Chem, 2012. **132**(1): p. 493-8.
243. Rabea, E.I., et al., *Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action*. Biomacromolecules, 2003. **4**(6): p. 1457-1465.
244. Errington, N., et al., *Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation*. International Journal of Biological Macromolecules, 1993. **15**(2): p. 113-117.
245. Lim, S.H. and S.M. Hudson, *Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group*. Carbohydrate Research, 2004. **339**(2): p. 313-319.
246. Liu, N., et al., *Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli*. Carbohydrate Polymers, 2006. **64**(1): p. 60-65.
247. Riaz Rajoka, M.S., et al., *Chitin/chitosan derivatives and their interactions with microorganisms: a comprehensive review and future perspectives*. Crit Rev Biotechnol, 2020. **40**(3): p. 365-379.
248. Ristic, T., S. Hribernik, and L. Fras-Zemljic, *Electrokinetic properties of fibres functionalised by chitosan and chitosan nanoparticles*. Cellulose, 2015. **22**(6): p. 3811-3823.
249. Pascu, B., et al. *Modified Chitosan for Silver Recovery—Kinetics, Thermodynamic, and Equilibrium Studies*. Materials, 2020. **13**, DOI: 10.3390/ma13030657.
250. Qin, C., et al., *Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity*. Carbohydrate Polymers, 2006. **63**(3): p. 367-374.
251. Kumar, M.N.V.R., et al., *Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives*. Chemical Reviews, 2004. **104**(12): p. 6017-6084.
252. Côté, F., K.A. Roberts, and M.G. Hahn, *Identification of high-affinity binding sites for the hepta- $\beta$ -glucoside elicitor in membranes of the model legumes Medicago truncatula and Lotus japonicus*. Planta, 2000. **211**(4): p. 596-605.
253. Chung, Y.C., et al., *Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall*. Acta Pharmacologica Sinica, 2004. **25**(7): p. 932-936.
254. YANG, T. and R.R. ZALL, *Chitosan Membranes for Reverse Osmosis Application*. Journal of Food Science, 1984. **49**(1): p. 91-93.
255. Amro, N.A., et al., *High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: Structural basis for permeability*. Langmuir, 2000. **16**(6): p. 2789-2796.
256. Marambio-Jones, C. and E.M.V. Hoek, *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(5): p. 1531-1551.
257. Kravanja, G., et al., *Chitosan-Based (Nano)Materials for Novel Biomedical Applications*. Molecules, 2019. **24**(10).

258. Ezati, P. and J.W. Rhim, *pH-responsive chitosan-based film incorporated with alizarin for intelligent packaging applications*. Food Hydrocolloids, 2020. **102**: p. 10.
259. Sahariah, P. and M. Másson, *Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship*. Biomacromolecules, 2017. **18**(11): p. 3846-3868.
260. Kaplan, S., et al., *Natural-based polymers for antibacterial treatment of absorbent materials*. Journal of Applied Polymer Science, 2020. **137**(3): p. 12.
261. Kulikov, S.N., et al., *Comparative evaluation of antimicrobial activity of oligochitosans against Klebsiella pneumoniae*. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2015. **41**(1): p. 57-62.
262. Fernandez-Saiz, P., J.M. Lagarón, and M.J. Ocio, *Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(8): p. 3298-307.
263. Raafat, D. and H.-G. Sahl, *Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey*. Microbial biotechnology, 2009. **2**(2): p. 186-201.
264. Chirkov, S.N., *The Antiviral Activity of Chitosan (Review)*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2002. **38**(1): p. 1-8.
265. Kong, M., et al., *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **144**(1): p. 51-63.
266. Jarmila, V. and V. Eva, *Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review*. Current Pharmaceutical Design, 2011. **17**(32): p. 3596-3607.
267. Younes, I., et al., *Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities*. Int J Food Microbiol, 2014. **185**: p. 57-63.
268. Hadwiger, L.A., B.W. Fristensky, and R. Riggelman, *Advances in Chitin, Chitosan and Related Enzymes*. 1984. 302.
269. El Ghaouth, A., et al., *Antifungal activity of chitosan on post harvest pathogens: Induction of morphological and cytological alterations in Rhizopus stolonifer*. Mycol. Res., 1992. **96**: p. 779.
270. Berger, J., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **57**(1): p. 19-34.
271. Coffin, D.R. and M.L. Fishman, *Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films*. J. Appl. Polym. Sci., 1994. **54**: p. 1320.
272. Guibal, E., *Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review*. Separation and Purification Technology, 2004. **38**(1): p. 43-74.
273. Hussein, M., et al., *Preparation of some chitosan heavy metal complexes and study of its properties*. Polymer Science Series A, 2012. **54**: p. 113-124.
274. Du, W.L., et al., *Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions*. Carbohydrate Polymers, 2009. **75**(3): p. 385-389.
275. Zhou, H., et al., *Cellulose-based amphoteric adsorbent for the complete removal of low-level heavy metal ions via a specialization and cooperation mechanism*. Chemical Engineering Journal, 2020. **385**: p. 11.
276. Eaton, P., et al., *Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Ultramicroscopy, 2008. **108**(10): p. 1128-1134.

277. Severino, R., et al., *Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium on green beans*. Food Control, 2015. **50**: p. 215-222.
278. Kalwar, K., et al., *Cellulose based nanofabrication; immobilization of silver nanoparticles and its size effect against Escherichia coli*. Materials Research Express, 2017. **4**(10): p. 6.
279. Ullah, R., et al., *Ion Exchange Materials and Its Pharmaceutical Applications, in Solvent Extraction, Ion-exchange and adsorption*. 2013.
280. Naushad, M., Z. Alothman, and D. Masram, *BOOK: "A Book on Ion Exchange, Adsorption and Solvent Extraction" Chapter 2 - Polymer Based Ion Exchange Resin"; A Book on Ion Exchange, Adsorption and Solvent Extraction, 15-44, Pub. Date: 2013 Pages: 348, 7x10 - (NBC-C) ISBN: 978-1-62417-887-0. NOVA, USA, 2013.*
281. Davidescu, C.-M., et al., *Magnesium silicate doped with environmentally friendly extractants used for rare earth elements adsorption*. DESALINATION AND WATER TREATMENT, 2017. **63**: p. 124-134.
282. Zhu, L., et al., *The preparation of supported ionic liquids (SILs) and their application in rare metals separation*. Science China Chemistry, 2012. **55**(8): p. 1479-1487.
283. \*\*\*. *Materials Characterisation Techniques*. Available from: <https://www.kemet.co.uk/blog/metallography/materials-characterisation-techniques>.
284. Warshawsky, A., *Extraction with Solvent-Impregnated Resins*, in *Ion Exchange and Solvent Extraction*, J.A. Marinsky and Y. Marcus, Editors. 1981, Marcel Dekker: New York. p. 229-310.
285. Kabay, N., et al., *Solvent-impregnated resins (SIRs) – Methods of preparation and their applications*. Reactive and Functional Polymers, 2010. **70**(8): p. 484-496.
286. Babić, K., L. Ham, and A. Haan, *Sorption kinetics for the removal of aldehydes from aqueous streams with extractant impregnated resins*. Adsorption, 2008. **14**: p. 357-366.
287. Babić, K., L. van der Ham, and A. Haan, *Recovery of benzaldehyde from aqueous streams using extractant impregnated resins*. Reactive and Functional Polymers, 2006. **66**: p. 1494-1505.
288. Manuel Valiente, G., L.; Valiente, M, *Stabilization of solvent-impregnated resin capacities by different techniques*. 1998.
289. Trochimczuk, A., et al., *Stabilization of solvent impregnated resins (SIRs) by coating with water soluble polymers and chemical crosslinking*. Reactive & Functional Polymers - REACT FUNCT POLYM, 2004. **59**: p. 1-7.
290. Van Hecke, K. and P. Goethals, *Research on advanced aqueous reprocessing of spent nuclear fuel: literature study*. 2006: Belgium. p. 93.
291. Jong, P.D.K.P.d., *Synthesis of Solid Catalysts*. 2009, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
292. Regalbuto, J., *Catalyst Preparation, Science and Engineering*. 2006, Boca Raton.
293. Ertl, G., H. Knözinger, and J.P.D. Weitkamp. *Preparation of Solid Catalysts*. 1999.
294. Serarols, J., J. Poch, and I. Villaescusa, *Expansion of adsorption isotherms into equilibrium surface: Case 1: Solvent impregnated resins (SIR)*. Reactive and Functional Polymers, 2001. **48**: p. 37-51.
295. Wang, Y., et al., *8-Hydroxyquinoline-5-sulfonic Acid (HQS) Impregnated on Lewatit MP 600 for Cadmium Complexation: Implication of Solvent Impregnated*



- Resins for Water Remediation*. SEPARATION SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2007. **38(1)**: p. 149-163.
296. Majid, I., G. Nayik, and V. Nanda, *Ultrasonication and food technology: A review*. Cogent Food and Agriculture, 2015. **1**: p. 0-0.
297. Ercan, S.Ş. and Ç. Soysal, *Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase*. Ultrasonics Sonochemistry, 2011. **18(2)**: p. 689-695.
298. Nithila, S.D., et al., *Studies to control biofilm formation by coupling ultrasonication of natural waters and anodization of titanium*. Ultrason Sonochem, 2014. **21(1)**: p. 189-99.
299. Kentish, S. and M. Ashokkumar, *The Physical and Chemical Effects of Ultrasound*. 2010. p. 1-12.
300. Gallego-Juárez, J.A., et al., *Power ultrasonic transducers with extensive radiators for industrial processing*. Ultrason Sonochem, 2010. **17(6)**: p. 953-64.
301. Yusaf, T.F. and R. Al-juboori, *Alternative methods of microorganism disruption for agricultural applications*. Applied Energy, 2014. **114**: p. 909-923.
302. Esclapez, M.D., et al., *Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products*. Food Engineering Reviews, 2011. **3(2)**: p. 108-120.
303. \*\*\*. *Three Methods of Solvent Evaporation*. Available from: <https://www.asynt.com/blog/three-methods-solvent-evaporation/>.
304. C. Craver, C.C., *Applied Polymer Science: 21st Century*. 2000.
305. \*\*\*. *Characterization of materials: What techniques are used?* [cited 2023; Available from: <https://www.atriainnovation.com/en/characterization-of-materials-what-techniques-are-used/>].
306. Sam Zhang, L.L., Ashok Kumar, *Materials Characterization Techniques*. 2008, CRC Press: Boca Raton. p. 344.
307. Leng, Y., *Materials characterization introduction to microscopic and spectroscopic methods*. 2nd ed. ed. 2013, Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
308. Mazen Alshaaer, H.-Y.J., *Geopolymers and Other Geosynthetics*. 2020. p. 180.
309. Brown, D. *NASA Rover's First Soil Studies Help Fingerprint Martian Minerals*. 2012; Available from: [https://www.nasa.gov/mission\\_pages/msl/news/msl20121030.html](https://www.nasa.gov/mission_pages/msl/news/msl20121030.html).
310. Rohn Truell, C.E., Bruce B. Chick, *Ultrasonic Methods in Solid State Physics*. 1969.
311. \*\*\*. *Cellulose - Structure, Properties, Function, Facts & Summary*. Available from: <https://alevelbiology.co.uk/notes/cellulose/>.
312. Chitosan as a Biomaterial — Structure, P., and Electrospun Nanofibers. *Chitosan as a Biomaterial — Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers*. 2014; Available from: <https://www.intechopen.com/Chapters/49246>.
313. Ahmed, S. and S. Ikram, *Chitosan-Derivatives, Composites and Applications*. 2017.
314. \*\*\*. *Chitosan*. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chitosan>.
315. PubChem. *Dodecyltrimethylammonium bromide*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dodecyltrimethylammonium-bromide>.
316. Technologies, S. *Dodecyltrimethylammonium bromide*. 2018 15.07.2021]; Available from: <https://www.sielc.com/dodecyltrimethylammonium-bromide.html>.
317. Biosynth. *Tetradecyltrimethylammonium bromide*. Available from: <https://www.biosynth.com/p/FT32264/1119-97-7-tetradecyltrimethylammonium-bromide>.

318. PubChem. *Tetradecyltrimethylammonium bromide*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=C17H38BrN>.
319. Faridbod, F., et al., *Cetrimide Potentiometric PVC membrane Sensor*. International Journal of Electrochemical Science, 2012. **7**.
320. PubChem. *Hexadecyltrimethylammonium chloride*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexadecyltrimethylammonium-chloride>.
321. PubChem. *Dodecyltriphenylphosphonium bromide*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dodecyltriphenylphosphonium-bromide>.
322. Santa Cruz Biotechnology, I. *Dodecyltriphenylphosphonium bromide*. 25.06.2021]; Available from: <https://www.scbt.com/p/dodecyltriphenylphosphonium-bromide-15510-55-1>
323. Biosynth. *Tributylhexadecylphosphonium Bromide*. Available from: <https://www.biosynth.com/p/FT60735/14937-45-2-tributylhexadecylphosphonium-bromid>.
324. PubChem. *Tributylhexadecylphosphonium bromide*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tributylhexadecylphosphonium-bromide>.
325. fishersci. *(n-Hexadecyl)tri-n-butylphosphonium bromide*. Available from: <https://www.fishersci.fi/shop/products/n-hexadecyl-tri-n-butylphosphonium-bromide-98-thermo-scientific/11374564>.
326. Medicine, P.N.L.o. *2-Mercaptobenzothiazole*. 28.01.2021]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Mercaptobenzothiazole>.
327. PubChem. *Thiourea*. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thiourea>.
328. 6222:1999, I. *Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*. Available from: <https://www.iso.org/standard/28960.html>.
329. Nemeş, N.S., et al., *Antimicrobial Activity of Cellulose Based Materials*. Polymers (Basel), 2022. **14**(4).
330. Nemeş, N.S., et al. *Symmetry between Structure&ndash;Antibacterial Effect of Polymers Functionalized with Phosphonium Salts*. Symmetry, 2022. **14**, DOI: 10.3390/sym14030572.
331. Syamani, F.A., et al., *Changes in Oil Palm Frond Fiber Morphology, Cellulose Crystallinity and Chemical Functional Groups during Cellulose Extraction Phases*. chemistry and materials research, 2015. **7**: p. 113-121.
332. Nazir, F. and M. Iqbal, *Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Studies of Aminated Microcrystalline Cellulose Derivatives against Melanoma and Breast Cancer Cell Lines*. Polymers, 2020. **12**(11): p. 2634.
333. Tarchoun, A.F., et al., *Ecofriendly isolation and characterization of microcrystalline cellulose from giant reed using various acidic media*. Cellulose, 2019. **v. 26**(no. 13-14): p. pp. 7635-7651.
334. Negrea, A., et al., *Rare Earth Elements Removal from Water Using Natural Polymers*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 316.
335. Hospodarova, V., E. Singovszka, and N. Stevulova, *Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials*. American Journal of Analytical Chemistry, 2018. **09**: p. 303-310.
336. sielc. *Dodecyltrimethylammonium bromide*. Available from: <https://www.sielc.com/dodecyltrimethylammonium-bromide.html>.

- 337.\*\*\*. *Tetradecyl Trimethyl Ammonium Bromide*. Available from: <https://www.made-in-china.com/showroom/innochem/product-detail/qXJKFZYIAUd/China-Tetradecyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide-99-.html>.
- 338.\*\*\*. *Hexadecyltrimethylammonium chloride*. Available from: <https://www.clearsynth.com/en/search?s=Hexadecyltrimethylammonium+Bromide&t=5>.
339. Ciofu, O. and T. Tolker-Nielsen, *Tolerance and Resistance of Pseudomonas aeruginosa Biofilms to Antimicrobial Agents-How P. aeruginosa Can Escape Antibiotics*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 913.
340. Thewes, N., et al., *Hydrophobic interaction governs unspecific adhesion of staphylococci: A single cell force spectroscopy study*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2014. **5**: p. 1501-1512.
341. Chen, C., et al., *Influence of Cellulose Charge on Bacteria Adhesion and Viability to PVAm/CNF/PVAm-Modified Cellulose Model Surfaces*. Biomacromolecules, 2019. **20**(5): p. 2075-2083.
342. Ardean, C., et al., *Antimicrobial Activities of Chitosan Derivatives*. Pharmaceutics, 2021. **13**(10): p. 1639.
343. Yilmaz Atay, H., *Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems*. Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications, 2020: p. 457-489.
344. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2010. **2**(5): p. a000414-a000414.
345. Tachaboonyakiat, W., 9 - *Antimicrobial applications of chitosan*, in *Chitosan Based Biomaterials Volume 2*, J.A. Jennings and J.D. Bumgardner, Editors. 2017, Woodhead Publishing. p. 245-274.
346. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/pseudomonas-aeruginosa-508.pdf>. *P aeruginosa resistance*. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/pseudomonas-aeruginosa-508.pdf>
347. Bassetti, M., et al. *How to manage Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs in context, 2018. **7**, 212527 DOI: 10.7573/dic.212527.
348. Boecker, A., et al., *Relevance and Recent Developments of Chitosan in Peripheral Nerve Surgery*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 104.
349. Vishu Kumar, A.B., et al., *Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against Bacillus cereus and Escherichia coli*. The Biochemical journal, 2005. **391**(Pt 2): p. 167-175.
350. Palma-Guerrero, J., et al., *Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan*. Molecular Microbiology, 2010. **75**(4): p. 1021-1032.
351. Lo, W.-H., et al., *Synergistic Antifungal Activity of Chitosan with Fluconazole against Candida albicans, Candida tropicalis, and Fluconazole-Resistant Strains*. Molecules, 2020. **25**(21).
352. Kumariya, R., et al., *Increased membrane surface positive charge and altered membrane fluidity leads to cationic antimicrobial peptide resistance in Enterococcus faecalis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2015. **1848**(6): p. 1367-1375.
353. Xing, K., et al., *Antifungal and eliciting properties of chitosan against Ceratocystis fimbriata in sweet potato*. Food Chemistry, 2018. **268**.
354. Pérez-García, L.A., et al., *Role of Protein Glycosylation in Candida parapsilosis Cell Wall Integrity and Host Interaction*. Frontiers in microbiology, 2016. **7**: p. 306-306.

355. Wang, X., et al., *Synthesis and surface properties of several nonionic–anionic surfactants with straight chain alkyl-benzyl hydrophobic group*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **302**(1): p. 532-539.
356. Bassetti, M., et al., *European perspective and update on the management of complicated skin and soft tissue infections due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus after more than 10 years of experience with linezolid*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20 Suppl 4**: p. 3-18.
357. Jayakumar, R., R.L. Reis, and J.F. Mano, *Chemistry and Applications of Phosphorylated Chitin and Chitosan*. e-Polymers, 2006. **6**(1): p. 035.
358. Suchyta, D.J., R.J. Soto, and M.H. Schoenfisch, *Selective monophosphorylation of chitosan via phosphorus oxychloride*. Polymer chemistry, 2017. **8**(16): p. 2552-2558.
359. Jayakumar, R., et al., *Synthesis of phosphorylated chitosan by novel method and its characterization*. International Journal of Biological Macromolecules, 2008. **42**(4): p. 335-339.
360. Amaral, I.F., P.L. Granja, and M.A. Barbosa, *Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2005. **16**(12): p. 1575-1593.
361. Dash, M., et al., *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(8): p. 981-1014.
362. Information, P.N.C.f.B. Thiourea. 01.07.2021]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thiourea>.
363. Azam, M.A. and B. Suresh, *Biological activities of 2-mercaptobenzothiazole derivatives: a review*. Scientia pharmaceutica, 2012. **80**(4): p. 789-823.
364. Jain, A., et al., *A New Horizon in Modifications of Chitosan: Syntheses and Applications*. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 2013. **30**: p. 91-181.
365. Inamdar, N. and V.K. Mourya, *Thiolated Chitosan: Preparation, Properties and Applications*. 2013. p. 121-150.
366. Henderson, W., et al., *Thiourea monoanion and dianion complexes of rhodium(III) and ruthenium(II)*. Inorganical Chimica Acta, 2002. **338**: p. 210-218.
367. Arslan, H., et al., *Antimicrobial Activity of Some Thiourea Derivatives and Their Nickel and Copper Complexes*. Molecules (Basel, Switzerland), 2009. **14**: p. 519-27.
368. Ganam, M., et al., *Antifungal activity of well-defined chito-oligosaccharide preparations against medically relevant yeasts*. PLOS ONE, 2019. **14**(1): p. e0210208.