



ACADEMIA ROMÂNĂ
Institutul de Chimie Macromoleculară
”Petru Poni” din Iași



**ELABORAREA DE SUPRAFETE
POLIMERICE RECEPTIVE LA
FACTORI EXTERNI**

– Rezumatul tezei de doctorat –

Conducător științific,

CS.I Dr. Cornelia VASILE

Doctorand,

Chim. Elena PÂSLARU

Iași, 2014

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ „PETRU PONI” IAȘI
Aleea Gr. Ghica Vodă, 41A, 700487, Iași, România

Nr. 18 / 6 1 2014

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **24 Ianuarie 2014**, ora **12:00**, în biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat **“Elaborarea de suprafețe polimerice receptive la factori externi”**, autor domnișoara chimist **Elena Pâslaru**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

- PREȘEDINTE:** **Acad. Bogdan C. Simionescu** – Director
Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” din Iași
- CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:** **Dr. Cornelia Vasile, CS I**
Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” din Iași
- REFERENȚI:** **Prof. Dr. Gheorghe Popa**
Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” din Iași, Facultatea de Fizică
- Prof. Dr. Rumiana Kotsilkova**
Academia de Științe a Bulgariei, Sofia, Bulgaria
- Prof. Dr. Mihaela Baican**
Universitatea de Medicină și Farmacie ”Grigore T. Popa” din Iași,
Facultatea de Farmacie

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Director,


Acad. Bogdan C. Simionescu



Alese mulțumiri **Academiei Române** pentru suportul financiar acordat pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat (2009-2013) și **Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”**, reprezentat de **Acad. Bogdan C. Simionescu**, pentru sprijinul științific, încrederea și înțelegerea acordate pe durata desfășurării tezei de doctorat.

Cele mai alese gânduri de recunoștință și mulțumire sunt îndreptate către conducătorul de doctorat **Prof. As. CS. I Dr. Cornelia Vasile** pentru îndrumarea în elaborarea tezei de doctorat, pentru bunăvoința, răbdarea, profesionalismul precum și pentru întreaga contribuție la formarea mea ca cercetător.

Mulțumesc membrilor comisiei de doctorat, domnului **Prof. Dr. Gheorghe Popa**, **Prof. Dr. Rumiana Kotsilkova** și doamnei **Prof. Dr. Mihaela Cristina Baican** pentru răbdarea și atenția acordate analizei acestei lucrări și pentru sugestiile formulate.

Sincere mulțumiri și distinse sentimente de recunoștință doamnei **prof. Dr. Mihaela Baican** și domnului **Dr. Bogdănel S. Munteanu** pentru sprijinul științific și prețioasele contribuții aduse la elaborarea și finalizarea tezei de doctorat.

Întreaga mea considerație și recunoștință colegilor din **departamentul „Chimia Fizică a Polimerilor”**, pentru ajutorul, încurajările și sfaturile oferite pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.

Îmi exprim întreaga mea recunoștință tuturor colegilor din **Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”** pentru sprijinul oferit în realizarea caracterizării noilor suprafețe polimerice obținute în cadrul tezei precum și pentru discuțiile extrem de utile în activitatea de cercetare.

Dedic această lucrare **întregii mele familii** care s-a bucurat de toate succesele mele, dar mai mult a suferit considerându-mă de fiecare dată "în vizită" în sânul familiei. Toată recunoștința și dragostea mea se îndreaptă către **logodnicul meu, George**, care mi-a fost și îmi este tot timpul alături, și îi mulțumesc pentru "curajul" de a se căsători cu un cercetător. De asemenea, le mulțumesc nepoatei **Diana** și nepotului **Robert** pentru dragostea cea mai pură și sinceră pe care mi-o oferă neștiind câtă bucurie și putere îmi acordă simplu lor zâmbet.

CUPRINS

PARTEA I. Stadiul actual privind modificarea și elaborarea de suprafețe polimerice receptive la factori externi

MOTIVAȚIA ȘI SCOPUL TEZEI	1
CAPITOLUL I. METODE DE MODIFICARE A SUPRAFETELOR POLIMERICE ...	4
I.1. Noțiuni Generale.....	5
I.2. Tratamente chimice de modificare a suprafețelor polimerice.....	6
I.2.1. Metoda chimică pe cale umedă.....	6
I.2.2. Grefarea suprafeței.....	7
I.3. Tratamentul chimic aplicat biopolimerilor.....	8
I.3.1. Metode de acoperire a suprafețelor substrat.....	8
I.3.1.1. Monostraturi auto-asamblate.....	8
I.3.2. Imobilizarea de compuși bioactivi pe suprafața polimerilor.....	10
I.3.2.1. Termodinamica adsorbției compușilor bioactivi pe suprafețe.....	11
I.3.2.2. Substraturi polimerice și compuși folosiți pentru imobilizare.....	12
I.3.2.3. Tehnici de imobilizare.....	14
I.4. Metode fizice de modificare a suprafețelor polimerice.....	38
I.4.1. Tratamente în flacără.....	39
I.4.2. Modificarea prin expunerea la plasmă.....	41
I.4.3. Bombardamentul suprafeței cu fascicule de particule încărcate electric.....	54
I.4.3.1. Tratamente cu fascicule de ioni.....	54
I.4.3.2. Tratamente cu fascicule de electroni.....	55
I.4.4. Iradierea cu UV.....	56
CAPITOLUL II. SUPRAFETE RECEPTIVE/ADAPTIVE LA ACȚIUNEA FACTORILOR EXTERNI	59
II.1. Noțiuni introductive.....	60
II.2. Suprafețe receptive/adaptive la pH.....	62
II.2.1. Polimeri cu grupări funcționale acide.....	63
II.2.2. Polimeri cu grupări funcționale bazice.....	65
II.3. Suprafețe receptive la temperatură.....	66
II.4. Suprafețe cu bioafinitate (receptive/adaptive la compuși biologici specifici).....	73

PARTEA A II-A. Contribuții originale - Elaborarea de suprafețe polimerice receptive la factori externi

CAPITOLUL III. MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU	79
III.1. Materiale.....	79
III.2. Procedee experimentale.....	82
III.2.1. Tratarea suprafeței polietilenei în plasma descărcării corona și acoperirea cu chitosan și amestec chitosan/vitamina E.....	82
III.2.2. Modificarea suprafeței poli(fluorurei de viniliden) în plasmă rece de microunde generată în diferite atmosfere gazoase și imobilizarea de proteine diferite.....	85
III.2.3. Modificarea suprafeței poli(fluorurei de viniliden) în plasmă de radiofrecvență (RF) și imobilizarea proteinei A, Imunoglobulinei G și fibrinogenului.....	87
III.3. Metode analitice de caracterizare.....	90
III.3.1. Măsurători reologice.....	90
III.3.2. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier și reflectanță totală atenuată (FTIR-ATR).....	91
III.3.3. Imagistica chimică în infraroșu apropiat (NIR-CI).....	91

III.3.4. Spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS).....	92
III.3.5. Titrarea potențiomtrică.....	93
III.3.6. Titrarea polielectrolitică.....	94
III.3.7. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) cuplată cu microanaliza cu raze X de energie dispersivă (EDAX).....	95
III.3.8. Microscopia de forță atomică (AFM).....	96
III.3.9. Determinări de unghi de contact.....	96
III.3.10. Măsurători de potențial zeta.....	98
III.3.11. Tehnica de nanoindentare.....	98
III.3.12. Metoda de micro-zgâriere („micro-scratch”).....	103
III.3.13. Testări de permeabilitate la oxigen.....	104
III.3.14. Testarea activității antioxidante.....	104
III.3.15. Teste de imunofluorescență.....	105
III.3.16. Evaluarea activității antimicrobiene.....	106
III.3.17. Analiza senzorială a alimentelor.....	107
III.3.18. Microbalanța cu cristal de cuarț (QCM).....	110
CAPITOLUL IV. MODIFICAREA SUPRAFETEI POLIETILENEI PRIN TRATAMENT CORONA ȘI ACOPERIREA CU CHITOSAN.....	111
IV.1. Introducere.....	111
IV.1. Acoperirea cu chitosan a substratului polimeric.....	114
IV.1.1. Rezultate FTIR-ATR.....	114
IV.1.2. Determinarea grosimei stratului de chitosan depus.....	118
IV.1.3. Determinarea prin XPS a compoziției chimice de suprafață.....	119
IV.1.4. Titrări potențiomtrice în soluții apoase.....	124
IV.1.5. Determinarea potențialului zeta.....	126
IV.1.6. Evaluarea morfologiei prin microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	127
IV.2. Studiul desorbției chitosanului de pe suprafața PE.....	129
IV.2.1. Evaluarea desorbției chitosanului prin titrare polielectrolitică.....	129
IV.2.2. Titrarea potențiomtrică după desorbție.....	131
IV.2.3. Datele spectroscopice FTIR-ATR după desorbție.....	132
IV.3. Testarea permeabilității la oxigen.....	134
IV.4. Evaluarea caracteristicilor mecanice de suprafață.....	135
IV.5. Determinarea rezistenței la zgâriere.....	137
IV.6. Testarea activității antimicrobiene.....	139
IV.7. Evaluarea receptivității la pH.....	141
IV.8. Concluzii.....	142
CAPITOLUL V. MODIFICAREA SUPRAFETEI DE POLIETILENĂ PRIN DEPUNEREA AMESTECULUI BIOACTIV CHITOSAN/VITAMINA E PRIN ELECTROPULVERIZARE.....	143
Introducere.....	143
V.1. Caracterizarea formulării chitosan/vitamina E.....	145
V.1.1. Proprietăți reologice.....	145
V.1.2. Morfologia determinată prin microscopie electronică de baleiaj.....	148
V.2. Evaluarea depunerii chitosan/vitamina E prin electropulverizare.....	149
V.2.1. Rezultatele FTIR-ATR.....	149
V.2.2. Spectroscopia fotoelectronilor de raze X (XPS).....	155
V.2.3. Titrarea potențiomtrică.....	159
V.2.4. Titrarea polielectrolitică – Studiul de desorbție.....	161
V.2.5. Microscopia electronică de baleiaj.....	163
V.2.6. Testarea activității antibacteriene.....	164

V.2.7. Evaluarea activității antioxidante.....	165
V.2.8. Determinarea receptivității la pH.....	166
V.3. Utilizarea compozitelor stratificate ca și ambalaje alimentare.....	167
V.4. Concluzii.....	171
CAPITOLUL VI. ADSORBȚIA ALBUMINEI PE SUPRAFAȚA POLI(FLUORUREI DE VINILIDEN) UTILIZÂND PLASMA DE MICROUNDDE....	172
VI.1. Generalități privind imobilizarea proteinelor pe suprafețe polimerice.....	172
VI.2. Rezultate gravimetrice.....	175
VI.3. Măsurători de unghi de contact.....	176
VI.4. Rezultatele AFM.....	178
VI.5. Rezultatele FTIR-ATR.....	180
VI.6. Evaluarea receptivității la pH.....	174
VI.7. Concluzii.....	185
CAPITOLUL VII. ACTIVAREA ÎN PLASMĂ DE MICROUNDDE A SUPRAFEȚEI DE POLI(FLUORURĂ DE VINILIDEN) PENTRU IMOBILIZAREA TRIGLICINEI ȘI PROTEINEI A.....	186
Introducere.....	186
VII.1. Tratatamentul în plasmă de CO ₂ și caracterizarea suprafeței modificate.....	189
VII.2. Acoperirea suprafeței PVDF cu triglicină și proteina A.....	201
VII.2.1. Determinarea unghiului de contact.....	202
VII.2.2. Rezultatele XPS.....	203
VII.2.3. Determinarea prin microscopie de forță atomică (AFM) a morfologiei depunerilor.....	208
VII.2.4. Teste de imunofluorescență.....	211
VII.3. Concluzii.....	212
CAPITOLUL VIII. IMOBILIZAREA ORIENTATĂ A IMUNOGLOBULINEI G PE SUPRAFAȚA POLI(FLUORUREI DE VINILIDEN).....	214
VIII.1. Generalități privind imobilizarea imunoglobulinei G pe substrat polimeric.....	214
VIII.2. Aspecte experimentale privind imobilizarea proteinei A și IgG pe suprafața PVDF tratată în plasmă.....	218
VIII.3. Rezultatele spectroscopiei FTIR-ATR privind imobilizarea IgG pe substratul polimeric.....	220
VIII.4. Evaluarea imobilizării IgG pe PVDF prin tehnica de imagistică chimică în infraroșu apropiat (CI-NIR).....	223
VIII.5. Evaluarea imobilizării IgG pe suprafața PVDF prin spectroscopie fotoelectronică de raze X (XPS).....	228
VIII.6. Caracterizarea suprafețelor modificate prin microscopie de forță atomică (AFM)....	236
VIII.7. Determinarea unghiului de contact cu apa.....	241
VIII.8. Concluzii.....	243
CAPITOLUL IX. IMOBILIZAREA FIBRINOGENULUI PE SUPRAFAȚA POLI(FLUORUREI DE VINILIDEN) TRATAT ÎN PLASMĂ RECE DE RADIOFRECVENȚĂ.....	245
IX.1. Investigarea imobilizării fibrinogenului prin tehnica FTIR-ATR.....	246
IX.2. Evaluarea depunerii de fibrinogen pe suprafața PVDF prin Imagistică Chimică în Infraroșu Apropiat (CI-NIR).....	248
IX.3. Determinarea prin Spectroscopie Fotoelectronică de Raze X a compoziției chimice de suprafață.....	250
IX.4. Determinarea unghiului de contact.....	253
IX.5. Investigarea morfologiei suprafeței prin Microscopia de Forță Atomică (AFM).....	254
IX.6. Concluzii.....	256

CAPITOLUL X. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE.....	257
BIBLIOGRAFIE.....	268
ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT.....	303

INTRODUCERE

Subiectul abordat în această teză de doctorat, de modificare a suprafețelor polimerice încercând să se păstreze proprietățile de volum ale materialului, este de un interes contemporan extraordinar datorită importanței sale esențiale în multe și variate (bio)aplicații (de ex. adeziune, aplicarea de acoperiri, imobilizări pe suprafață, separarea gazelor și a amestecurilor de lichide, etc.). Alegerea unei metode de tratare, potrivită pentru o anumită suprafață, depinde de natura chimică a acesteia, de caracteristicile fizice ale acesteia și de domeniul de aplicabilitate. În acest sens, se poate apela la metode chimice, fizice, sau utilizarea combinată a celor două. Fiecare din metodele de tratare a suprafețelor prezintă atât avantaje cât și dezavantaje.

Plecând de la premiza că proprietățile de suprafață ale polimerilor sunt de o importanță fundamentală în numeroase sectoare industriale, lucrarea de față își propune elaborarea de noi suprafețe polimerice cu scopul de extindere a domeniului de aplicabilitate a substratului polimeric ales, precum și elucidarea unor noi aspecte privind modificarea proprietăților de suprafață ale unor polimeri sintetici cu ajutorul unor compuși naturali receptivi/adaptivi la acțiunea unor factori externi cu aplicații în domeniul medical și al ambalajelor alimentare bioactive.

Poli(etilena) este materialul plastic cel mai răspândit, utilizat în cele mai variate domenii ca și material pentru ambalaje (pungi de plastic, membrane, folii, containere etc.), plăci extrudate (care se pot freza, termosuda, termoforma), din care se pot fabrica compostatoare, uși, site industriale, rafturi, țevi și fittinguri, etc. Totuși, în anumite domenii polietilena nu poate fi utilizată cu succes datorită limitărilor induse de caracterul inert, prezentând energie liberă de suprafață mică, umectabilitate și adeziune scăzută.

Poli(fluorura de viniliden) (PVDF) este un fluoropolimer termoplastic, nereactiv. PVDF este utilizat în general în aplicații care necesită puritate înaltă și rezistență mecanică la solvenți, acizi, baze, la încălzire și generarea redusă de fum în timpul arderii. În comparație cu alți fluoropolimeri, acesta este topit ușor datorită punctului de topire relativ scăzut, în jurul valorii de 177°C. Prezintă o densitate mică și un cost scăzut atunci când se compară cu ceilalți fluoropolimeri. Este prelucrabil sub formă de conducte, plăci, tuburi, filme izolatoare pentru sârme premium. Poate fi injectat, turnat sau sudat și se utilizează de obicei în industria chimică, a semiconductorilor, în industria medicală și de apărare, precum și în bateriile cu ion de litiu. Membranele PVDF sunt utilizate în tehnica *Western-Blot* pentru imobilizarea

proteinelor, datorită afinității nespecifice pentru aminoacizi. Piezoelectricitatea acestora este utilizată în detecții ultrasonice și electro-mecanice, precum și în domeniul elaborării de (bio)senzori. Dezavantajul PVDF pentru utilizarea în domeniul biomedical este în principal caracterul hidrofob și energia liberă de suprafață foarte scăzută la interfața cu aerul astfel fiind susceptibil la depuneri necontrolate de compuși biologici.

Obiectivul principal al tezei a constat în obținerea de noi suprafețe polimerice multifuncționale prin modificarea și îmbunătățirea proprietăților de suprafață ale polimerilor mai sus menționați pentru a le lărgi aria de aplicabilitate, prin elaborarea de suprafețe cu caracteristici noi și conferirea de proprietăți speciale (receptivitate/adaptabilitate la diferiți factori externi, biocompatibilitate, caracter antimicrobian/antioxidant/bioactiv). În acest sens s-a avut în vedere utilizarea unor procedee nepoluante de modificare a suprafețelor precum și explorarea unor tehnici de acoperire inovatoare precum tehnica de *electrospraying/electrospinning*.

Teza de doctorat intitulată „**Elaborarea de suprafețe polimerice receptivă la factori externi**” este alcătuită din două părți și conține zece capitole. **Partea I** cuprinde două capitole ce reprezintă o sistematizare a datelor de literatură existente cu privire la stadiul actual privind modificarea și elaborarea de suprafețe polimerice receptivă la factori externi. În **primul capitol** se sumarizează principalele aspecte privind metodele de modificare a suprafețelor polimerice, clasificarea și caracteristicile principale ale acestora precum și exemple de utilizare a diferitelor tehnici de modificare pentru diverse materiale polimerice. În **Capitolul II** se definește mai întâi termenul de material receptiv la stimuli, principalele clase de compuși receptivi la stimuli externi precum și se trece în revistă unele suprafețe polimerice care prezintă receptivitate. Prima parte a tezei se încheie cu o secțiune de concluzii. În urma analizei datelor de literatură existente în domeniu se poate concluziona că utilizarea complementară a metodelor fizice cu cele chimice este recomandată pentru obținerea de suprafețe polimerice cu caracteristici multifuncționale și o stabilitate bună în diferite medii chimice sau biologice.

Partea a II-a reprezintă contribuțiile proprii în domeniul modificării și elaborării de noi suprafețe polimerice receptivă la factori externi (Capitolele III-IX). În **capitolul III** se prezintă pe larg reactivii, materialele și solvenții precum și tehnicile de lucru, instrumentele și aparatele utilizate pentru obținerea și caracterizarea tuturor sistemelor polimerice multifuncționale prezentate în lucrare.

Capitolele IV-IX ale tezei descriu contribuțiile proprii aduse în vederea elaborării de noi suprafețe polimerice receptivă la stimuli externi, prin utilizarea combinată atât a

metodelor fizice cât și a celor chimice de funcționalizare a suprafețelor polimerice inerte (polietilena (Capitolele IV și V) și poli(fluorura de viniliden) (Capitolele VI-IX)) și imobilizarea inedită a unor compuși receptivi/adaptivi la factori externi (chitosan, vitamina E, albumina din serul bovin, proteina A, imunoglobulina G, fibrinogen, etc.).

Teza se încheie cu un ultim capitol, **Capitolul X**, ce cuprinde concluziile generale asupra tezei precum și perspective viitoare, și în final referințele bibliografice.

Lucrarea se extinde pe 309 pagini și cuprinde 103 figuri, 23 scheme, 13 ecuații, 30 tabele și 521 referințe bibliografice.

Rezumatul tezei cuprinde într-o formă concentrată rezultatele originale obținute. În rezumat se menține numerotarea tabelor, figurilor și schemelor din materialul tezei.

PARTEA a II-a - CONTRIBUȚII ORIGINALE -

Elaborarea de suprafețe polimerice receptive la factori externi

CAPITOLUL III. MATERIALE ȘI METODE DE LUCRU

III.1. Materiale

Materialele utilizate pentru realizarea acestui studiu pot fi împărțite în două categorii și anume:

- materiale polimerice tip substrat pentru elaborare de suprafețe receptive la stimuli externi și anume poli(etilena) (PE) și poli(fluorura de viniliden) (PVDF).
- substanțele utilizate pentru crearea acestor suprafețe multifuncționale pe materialele substrat au fost: chitosan (CHT) cu diferite mase moleculare, vitamina E (VE) sub formă de α -tocoferol sintetic, albumina din serul bovin (BSA), proteina A (PrA), triglicina (TG) (glicil-glicil-glicina), imunoglobulina G (IgG) extrasă din ser uman, fibrinogen (Fb) extras din plasma bovină.

Alte substanțe chimice, utilizate pentru elaborarea de suprafețe receptive la stimuli externi, au fost: clorhidrat de 1-etil-3-[3-dimetil amino propil] carbodiimida (EDC) și N-hidroxisuccinimida (NHS) - agenți de cuplare a grupărilor carboxil de grupările aminice și N,N' - carbonildiimidazol (CDI), care poate să activeze acizii carboxilici sau grupările hidroxil pentru conjugarea acestor cu alte grupări nucleofile, creând legături amidice sau legături de tip N-alchil carbamat.

III.2. Procedee experimentale

III.2.1. Tratarea suprafeței polietilenei în plasma descărcării corona și acoperirea cu chitosan și amestec chitosan/vitamina E.

Filmele de polietilenă au fost tratate în plasma descărcării corona utilizând un echipament de tratare a suprafețelor Enerkon Corona Osman Onder. Pentru tratarea foliilor de PE s-au utilizat următorii parametrii: intensitatea curentului electric aplicat a fost de 20 A, o frecvență de 30 kHz, distanța dintre electrozi a fost 7 mm și puterea plasmei de $\approx 45 \text{ kJ/m}^2$.

Pentru depunerea chitosanului pe suprafețele de PE tratate corona s-au utilizat mai multe procedee de acoperire și anume:

- *imersarea* foliilor de PE în soluția de chitosan cu concentrații diferite de 1%, 3% și 5%;

- **întinderea pe suprafață** a soluției de chitosan cu aceleași concentrații;
- și prin metoda de **electropulverizare** (*electrospraying/electrospinning*).

Soluțiile de chitosan s-au realizat în acid acetic 8%, etanol 30% și apă bidistilată. Adaosul de etanol a avut ca scop creșterea vitezei de evaporare a solventului. Soluții de chitosan/vitamina E de concentrații 2,5% CHT și 0,5% VE raportat la chitosan s-au realizat în soluție apoasă de acid acetic de concentrație 70%.

Pentru **imobilizarea chimică** a chitosanului pe suprafața PE s-a recurs la utilizarea agenților chimici de cuplare, EDC și NHS. În acest sens, filmele de PE scoase din camera de descărcare corona au fost imersate mai întâi în soluția ce conține 75 mM EDC + 15 mM NHS în apă și ulterior s-a realizat acoperirea cu chitosan. În cazul depunerii prin electropulverizare a amestecului CHT/VE s-a realizat o comparație între agenții de cuplare EDC și NHS cu CDI. Depunerea pe suprafața PE a soluției de chitosan a fost urmată de uscare la temperatura camerei și apoi în vid la 50 °C timp de 24 ore.

III.2.2. Modificarea suprafeței poli(fluorurei de viniliden) în plasmă rece de microunde generată în diferite atmosfere gazoase și imobilizarea de proteine diferite.

a. Activarea suprafeței în plasmă de microunde (MW)

Filmele de PVDF au fost tratate în plasmă de microunde generată în atmosfere diferite. Gazele de descărcare utilizate au fost: dioxid de carbon, azot și un amestec de azot și hidrogen în raport de 1:3 N₂/H₂.

Următorii parametri experimentali au fost variați: timpul de expunere (t, 5-60 s), puterea descărcării (P, 10-70 W), debitul de gaz (Q, 8×10^{-8} - 50×10^{-8} m³s⁻¹), presiunea (20-30 Pa), poziția probelor în respect cu surfatronul (d, $2,5 \times 10^{-2}$ - 15×10^{-2} m), ceea ce a permis poziționarea probelor atât în zona de descărcare cât și în cea de post-descărcare.

S-au stabilit parametrii optimi de tratament ai suprafeței de PVDF utilizând plasma generată în atmosferă de CO₂, deoarece cei pentru plasma de N₂ și N₂/H₂ au fost determinați anterior în cadrul altui studiu [Pascu, *et al.* 2005].

b. Adsorbția fizică a triglicinei (TG), proteinei A (PrA) și albuminei serice bovine (BSA)

După curățarea substratului polimeric prin spălarea cu etanol și ultrasonare, filmul de PVDF a fost tratat în plasmă de microunde și apoi 10 μL de soluție proteică - **proteina A sau triglicină**, de concentrație $c = 2,5$ mg mL⁻¹, a fost împrăștiată (depusă) pe întreaga suprafață.

Probele au fost menținute peste noapte la 4 °C (cel puțin 15 h). Excesul de proteină a fost îndepărtat prin spălare cu soluție tampon fosfat (PBS), pH = 7,4.

Adsorbția albuminei s-a realizat prin procedura de imersare în soluție apoasă de albumină 2% și uscare, la temperatura camerei. Raportul masic polimer/albumină s-a păstrat aproximativ constant de ½. Determinarea cantitativă a albuminei imobilizată pe suprafața filmului s-a realizat prin măsurători gravimetrice, înainte și după imersarea probelor în soluția de albumină, urmată de uscare la 60°C, timp de 1 oră și 30 minute.

c. Imobilizarea covalentă a triglicinei și proteinei A

Suprafețele de PVDF expuse acțiunii plasmei de **microunde** generată în atmosferă de CO₂, N₂ și N₂/H₂ au fost tratate timp de o oră cu o soluție de activare a grupărilor carboxilice, conținând 75 mM EDC și 15 mM NHS, și ulterior s-au depus pe suprafețele astfel activate soluțiile proteice - proteina A sau triglicina, utilizând un volum de 10 μL de soluție de concentrație $c = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$. După aceasta probele au fost menținute la 4°C, timp de 15 ore, acestea fiind condițiile pentru desfășurarea reacției de cuplare și evitarea denaturării proteinelor.

Excesul de proteină a fost îndepărtat prin spălare cu PBS (pH 7,4). Înainte de analiza probelor acestea au fost menținute la 4 °C.

III.2.3. Modificarea suprafeței poli(fluorurei de viniliden) în plasmă de radiofrecvență (RF) și imobilizarea proteinei A, imunoglobulinei G și fibrinogenului.

a. Adsorbția fizică a proteinei A, imunoglobulinei G (IgG) și fibrinogenului (Fb) pe suprafața PVDF

După etapa de curățare a suprafeței de PVDF și expunerea acesteia la acțiunea plasmei de radiofrecvență generată în diferite atmosfere gazoase (CO₂, N₂ și N₂/H₂) s-a depus pe suprafață un volum de 10 μL de soluție proteică și anume: soluție de proteina A cu o concentrație de 2,5 mg/mL, imunoglobulina G și fibrinogen cu o concentrație de 1 mg/mL, soluții realizate în PBS pH = 7,4. Probele astfel tratate au fost lăsate timp de 15 ore la 4 °C. După această perioadă excesul de proteină a fost îndepărtat prin spălare cu soluție tampon fosfat, pH 7,4.

b. Protocolul de legare covalentă a proteinelor pe substratul polimeric tratat în plasmă de RF a fost identic cu cel descris mai sus pentru proteina A și triglicină

Filmele de PVDF tratate în plasmă de RF generată în atmosferă de N_2 și N_2/H_2 au fost imersate în soluțiile celor trei proteine – PrA, IgG și Fb, care conțin EDC 75 mM și NHS 15 mM. Probele astfel pregătite au fost lăsate la incubat timp de 4 ore, la 4 °C. Excesul de proteină a fost îndepărtat prin spălare cu PBS (pH 7,4). Înainte de analiza probelor acestea au fost păstrate la 4 °C.

c. Protocolul de imobilizare a IgG pe suprafața poli(fluorurei de viniliden) prin intermediul proteinei A

Filmele de PVDF tratate în plasmă de RF având deja imobilizată proteina A pe suprafață au fost imersate în soluție de IgG ($c = 1 \text{ mg/mL}$ în PBS) timp de 24 de ore și păstrate la 4°C. După această perioadă, probele au fost spălate în mod intens cu soluție de PBS pentru a îndepărta imunoglobulina G nelegată după care suprafețele au fost uscate în curent de azot. Probele astfel pregătite au fost păstrate în frigider până s-a trecut la investigarea acestora.

III.3. Metode analitice de caracterizare

Pentru caracterizarea fizico-chimică a suprafețelor polimerice noi obținute s-au utilizat tehnici analitice specifice, precum: spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier și reflectanță totală atenuată (FTIR-ATR), imagistica chimică în infraroșu apropiat (NIR-CI), spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS), titrarea potențiomtrică și polielectrolitică, microscopia electronică de baleiaj (SEM) cuplată cu spectrometria de raze X dispersivă în energie, microscopia de forță atomică (AFM), determinări de unghi de contact, măsurători de potențial zeta, tehnica de nanoindentare, metoda de micro-zgâriere („*micro-scratch*”). Evaluarea proprietăților compușilor în soluție și a suprafețelor polimerice s-a realizat prin utilizarea unor metode de analiză specifice, și anume: măsurători reologice, testări de permeabilitate la oxigen, determinarea activității antioxidante prin metoda cu DPPH, teste de imunofluorescență și antimicrobiene, analiza senzorială a alimentelor, tehnica cu microbalanța cu cristal de cuarț (QCM).

CAPITOLUL IV. MODIFICAREA SUPRAFETEI POLIETILENEI PRIN TRATAMENT CORONA ȘI ACOPERIREA CU CHITOSAN

Spectrele ATR-FTIR corespunzătoare suprafețelor de PE acoperite cu chitosan prin imersare (Figura IV.1(a)), întindere pe suprafață (Figura IV.1(b)) și prin electropulverizare (Figura IV.2) relevă unele diferențe între probele obținute prin diferite procedee.

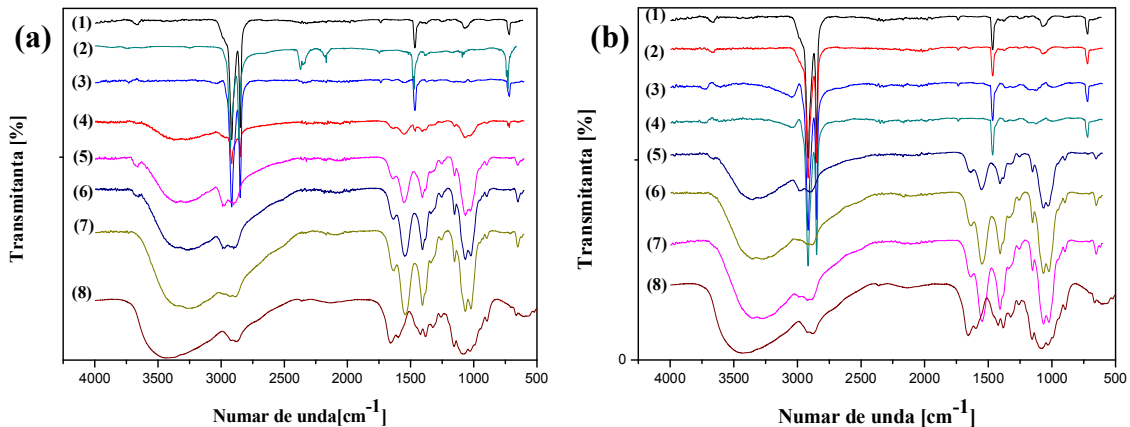


Figura IV.1. Spectrele FTIR-ATR pentru polietilenă (1) și filmele de PE acoperite cu chitosan prin *imersare* (a): PE/I/1CHT; (3) PE/I/3CHT; (4) PE/I/5CHT; (5) PEcor/I/1CHT; (6) PEcor/I/3CHT (7) PEcor/I,5CHT; (8) CHT și prin *întindere pe suprafață* (b): (2) PE/S/1CHT; (3) PE/S/3CHT; (4) PE/S/5CHT; (5) PEcor/S/1CHT; (6) PEcor/S/3CHT (7) PEcor/S/5CHT. [Munteanu, Pâslaru *et al.* 2013]

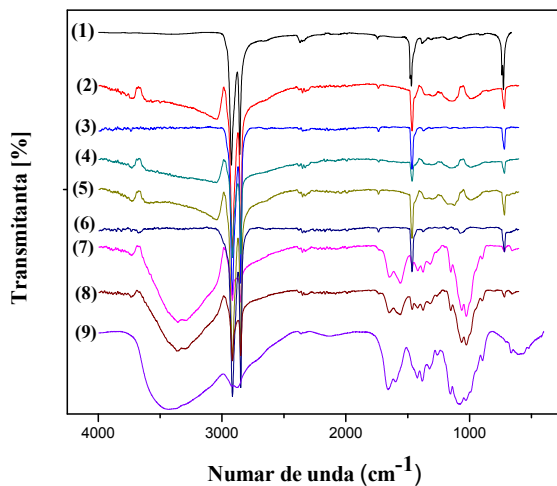


Figura IV.2. Spectrele FTIR-ATR pentru probele acoperite cu chitosan prin *electropulverizare* utilizând diferite condiții experimentale (variind distanța dintre vârful acului și colector, tensiunea aplicată și timpul de depunere). (1) PE, (2) PE/5CHT_5cm_25kV_30min; (3) PE/5CHT_11cm_29kV_10min; (4) PEcor/5CHT_5cm_25kV_30min; (5) PE/5CHT_11cm_29kV_20min; (6) PEcor,5CHT_8.5cm_25kV_17min; (7) PEcor/5CHT_5cm_26kV_20min; (8) PEcor/5CHT_11cm_30kV_20min; (9) Chitosan. [Munteanu, Pâslaru *et al.* 2013]

Spectrul FTIR al chitosanului prezintă o bandă de absorbție largă cuprinsă între 3550 și 3030 cm^{-1} atribuită vibrației de întindere a grupării $-\text{OH}$ și între 2980 cm^{-1} și 2830 cm^{-1} bandă datorată vibrației de alungire a legăturii C-H alifatică [Saraswathy *et al.* 2001]. O altă bandă importantă cu un maxim de absorbție la 1597 cm^{-1} se datorează grupărilor aminice libere din poziția C₂ a glucozaminei. Banda de la 1657 cm^{-1} este atribuită grupărilor aminice acetilate din chitosan, ceea ce indică faptul că proba nu este complet deacetilată (cu un grad de deacetilare cuprins între 75-85%). Banda de absorbție cu un maxim la 1384 cm^{-1} indică vibrația de alungire a legăturii $-\text{C}-\text{O}$ a grupărilor hidroxilice primare ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). Benzile de la 1155 cm^{-1} (vibrația de alungire antisimetrică a punții C-O-C), 1081 cm^{-1} și 1029 cm^{-1}

(vibrația catenei principale, care implică alungirea legăturii C-O suprapusă cu vibrația de alungire a grupării $-NH_2$) sunt caracteristice structurii zaharidice a chitosanului.

Se observă o ușoară deplasare a benzilor caracteristice structurii chitosanului către numere de undă mai mici în cazul probelor de PE tratate corona și acoperite cu chitosan, posibil datorită interacțiunii dintre grupările funcționale carboxilice, implantate pe suprafață după activarea corona, și grupările aminice ale chitosanului. Benzile caracteristice chitosanului apar doar cu intensitate foarte mică în cazul probelor de PE netrate corona dar acoperite cu chitosan. În acest caz, datorită vâscozității relativ mare a soluțiilor de chitosan o cantitate foarte mică de biopolimer aderă fizic pe suprafață după uscarea probelor. După activarea corona a substratului polimeric benzile de vibrație în IR specifice chitosanului sunt mult mai intense și bine definite. Mai mult, intensitățile benzilor de vibrație atribuite chitosanului au o tendință de creștere dependentă de concentrația soluției de chitosan utilizată și acoperirea devine semnificativă doar după pretratamentul corona al substratului de PE.

Spectrele IR pentru probele de PE netratate și tratate corona acoperite cu 5% chitosan prin electropulverizare sunt prezentate în Figura IV.2. Benzile specifice chitosanului se observă numai în cazul a două probe, care au fost pretratate corona și acoperite cu chitosan utilizând următorii parametri: $d = 5\text{cm}$, $V = 26\text{ kV}$, $t = 20\text{ min}$ (Figura IV.2. – Spectrul 7) și $d = 11\text{cm}$, $V = 30\text{kV}$, $t = 20\text{ min}$. Luând în considerare rezultatele FTIR, condițiile de electropulverizare menționate anterior s-au concluzionat ca fiind cele optime.

Comparând spectrele FTIR obținute pentru aceeași concentrație a soluției de chitosan dar utilizând metode diferite de depunere pe substrat rezultă că metoda bazată pe imersarea filmului de PE în soluția de chitosan este mai eficientă atunci când se compară cu metoda de întindere a soluției pe suprafață. Pe de altă parte, metoda de electropulverizare este mult mai versatilă deoarece permite un control mai precis al conținutului de chitosan depus pe unitatea de suprafață prin varierea timpului de depunere. [Munteanu, Pâslaru *et al.* 2013]

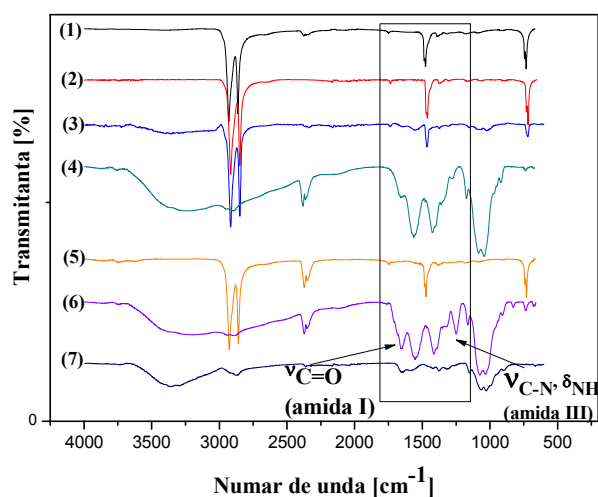


Figura IV.3. Compararea spectrelor FTIR-ATR a filmelor de PE acoperite cu chitosan prin adsorbție fizică și cuplare chimică: (1) PE; (2) PE_{cor}; (3) PE/CHT; (4) PE_{cor}/CHT; (5) PE/EDC+NHS/CHT; (6) PE_{cor}/EDC+NHS/CHT, și (7) CHT.

[Pâslaru *et al.* 2013a]

Pentru a evidenția modificările ce apar în urma utilizării agenților de cuplare (clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetil amino propil) carbodiimida (EDC) și N-hidroxisuccinimida (NHS)) se prezintă o comparație a spectrelor IR pentru probele pe bază de polietilenă modificate cu chitosan cu și fără activatori - Figura IV.3.

În cazul utilizării agenților chimici de cuplare EDC și NHS (Figura IV.3 – Spectrul 6) apar diferențe evidente în spectrul IR comparativ cu probele acoperite cu chitosan după tratamentul corona. Trei benzi localizate la 1654 cm^{-1} , 1547 cm^{-1} și 1258 cm^{-1} care sunt atribuite vibrațiilor de întindere a grupărilor $\text{C}=\text{O}$ (Amidă I), de îndoire a legăturii N-H din amidă, și vibrațiilor de alungire a legăturii C-N (Amidă II) precum și o bandă complexă constând în vibrații de alungire a grupării C-N și oscilații de deformare în plan a legăturii N-H (banda Amidă III), susțin legarea covalentă a chitosanului de suprafața PE tratată corona atunci când se utilizează agenții chimici de cuplare. [Pâslaru *et al.* 2013a]

IV.1.3. Determinarea prin XPS a compoziției chimice de suprafață

Utilizând spectrele generale XPS s-a putut determina compoziția chimică a suprafeței și concentrațiile atomice (at %) pentru filmul PE de referință, cel expus la descărcarea corona și acoperit cu chitosan. În tabelul IV.3. sunt prezentate procentele atomice ale elementelor determinate la suprafața probelor, înregistrate în cel puțin două puncte diferite de pe suprafață, în tabel prezentându-se valorile medii.

După tratamentul corona conținutul de carbon de pe suprafața polietilenei scade, probabil datorită ruperii catenelor aflate la suprafața polimerului și a reorganizării chimice induse de electronii generați în timpul descărcării corona. Se observă în același timp o creștere a procentului de oxigen. Noi picuri de emisie caracteristice oxigenului și azotului apar în spectrele XPS înregistrate pentru probele acoperite cu chitosan.

Deoarece singura sursă de azot pe suprafața PE este reprezentată de acoperirea cu chitosan, conținutul de azot (în procente atomice) poate fi utilizat pentru evaluarea eficienței acoperirii. Comparând probele modificate prin imersare în soluție de chitosan 1% se observă că cel mai mare conținut de azot se determină în cazul probei $\text{PE}_{\text{cor}}/\text{EDC}+\text{NHS}/\text{CHT}$. În consecință, se poate menționa că procedura de imobilizare covalentă utilizând agenți chimici de cuplare este cea mai eficientă metodă, în termeni de stabilitate a stratului bioactiv depus pe suprafață.

Tabel IV.3. Compoziția elementală experimentală (% atomice) a probelor de PE tratate corona și acoperite cu chitosan obținute prin analiza spectrelor XPS. [Munteanu, Paslaru *et al.* 2013]

Proba	C (% atomice)	O (% atomice)	N (% atomice)
PE	99,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	-
PE _{cor}	94,2 ± 0,3	5,6 ± 0,1	-
Metoda de imersare			
PE/1CHT	97,4 ± 1,0	2,2±1,0	-
PE _{cor} /1CHT	70,02 ± 0,5	23,1 ± 0,6	4,4 ± 0,1
PE _{cor} /EDC+NHS/1CHT	69,8 ± 0,3	24,9 ± 0,3	5,4 ± 0,02
PE/3CHT	98,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	-
PE _{cor} /3CHT	67,8 ± 0,9	26,0 ± 1,1	5,7 ± 0,2
PE/5CHT	99,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	-
PE _{cor} /5CHT	67,8 ± 0,2	26,7 ± 0,2	5,5 ± 0,03
Metoda de întindere pe suprafață			
PE/1CHT	98,4 ± 1,0	1,6±1,0	-
PE _{cor} /1CHT	78,3 ± 6,8	18,6 ± 4,5	3,1 ± 2,3
PE/3CHT	99,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	-
PE _{cor} /3CHT	69,4 ± 0,3	25,5 ± 0,1	4,6 ± 0,2
PE/5CHT	99,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	-
PE _{cor} /5CHT	67,9 ± 0,1	26,3 ± 0,4	5,9 ± 0,4
Electropulverizare			
PE _{cor} /ES/5CHT(11cm,30kV,20min)	85,7 ± 3,2	13,3 ± 2,9	1,0 ± 0,4

În figura IV.4. se prezintă spectrele se înaltă rezoluție C1s atât pentru PE de referință cât și pentru filmele tratate corona și modificate cu chitosan prin metoda de imersare, iar în tabelul IV.4 se prezintă variația ariilor picurilor obținute în urma deconvoluției, evidențiindu-se diferențele dintre probe.

Spectrele C1s ale probelor PE_{cor}/CHT și PE_{cor}/EDC+NHS/CHT pot fi fitate cu trei componente ale picului. Două picuri intense (C1 și C2) de la 284,8 și 286,4 sunt asociate cu atomii de carbon implicați în legăturile de tipul C-C și respectiv C-N și un pic cu intensitate mai mică (C3) la 288,0 eV a fost atribuit atomilor de carbon implicați în legături amidice (N-C=O) și/sau O-C-O - grupare specifică naturii zaharidice a chitosanului.

Imobilizarea covalentă a chitosanului pe suprafața PE tratată corona s-a realizat prin formarea de legături amidice între substratul ce prezintă funcționalități ce conțin oxigen și grupările amino din chitosan prin intermediul agenților de cuplare (EDC+NHS). Conform variației ariei procentuale a atomilor de carbon implicați în diferite legături pe suprafață, s-a observat că utilizarea agenților de cuplare conduce la o creștere a ariei picului C3, care este direct proporțională cu concentrația atomică. Semnalul este datorat în principal atomului de

carbon implicat în legătura amidică ($\text{N}-\underline{\text{C}}=\text{O}$), sugerând o imobilizare stabilă a chitosanului pe suprafața PE.

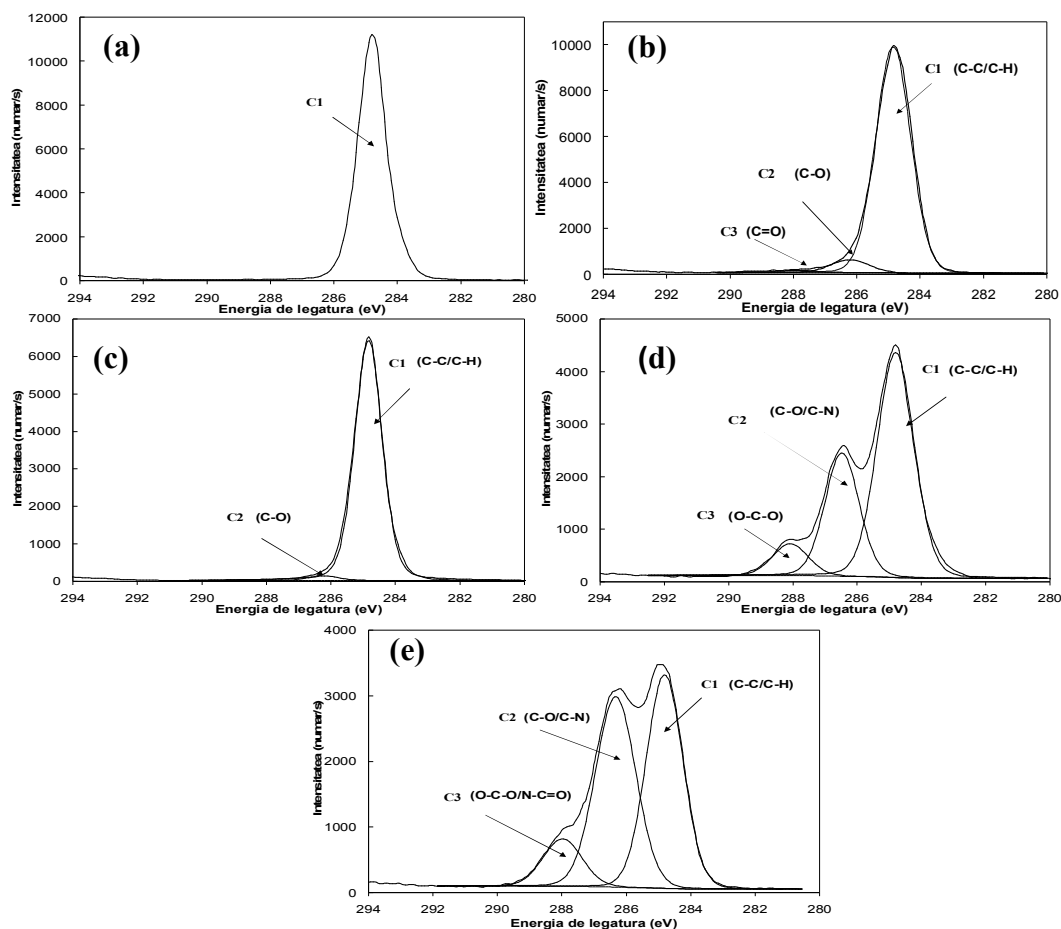


Figura IV.4. Spectrele de înaltă rezoluție C1s: (a) PE și (b) PEcor, (c) PE/CHT, (d) PEcor/CHT, (e) PEcor/EDC+NHS/CHT. [Pâslaru *et al.* 2013a]

IV.1.4. Titrări potențiometrice în soluții apoase

Izotermele de sarcină experimentale, normalizate la masa probei, sunt redată în Figura IV.5, iar conținutul mediu de sarcină împreună cu valorile pK sunt sumarizate în Tabelul IV.5. Cantitatea de sarcină detectată pe suprafața de PE netratată corona și acoperită cu chitosan este foarte mică, deoarece în acest caz chitosanul nu prezintă aderență față de substrat și este îndepărtat ușor de pe suprafață. Sarcina electrostatică medie crește în cazul probelor expuse în prealabil la descărcare corona și acoperite ulterior cu chitosan, fiind direct proporțională cu concentrația soluției de chitosan utilizată.

În cazul suprafeței de PE acoperite cu chitosan prin electropulverizare s-a determinat o sarcină medie de suprafață mult mai mică decât în cazul utilizării procedurii de imersare a

substratului, dar acest strat foarte subțire se dovedește a fi suficient pentru a inhiba activitatea microbiană. [Munteanu, Pâslaru *et al.* 2013]

În utilizării agenților de cuplare pentru imobilizarea chitosanului se observă o scădere a cantității de grupe protonate, deoarece o parte din grupele amino care pot fi protonate sunt implicate în reacția de cuplare cu substratul funcționalizat și formarea de grupe amidice, mult mai greu protonabile.

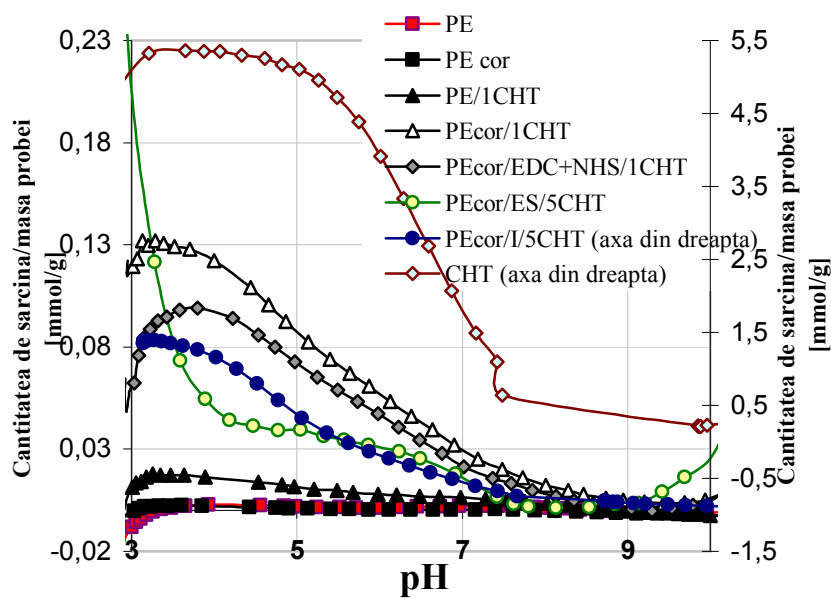


Figura IV.5. Izotermele experimentale de sarcină, normalizate la masa probei, rezultate din titrarea potențiometrică.

Valoarea pKa experimentală a chitosanului a fost calculată ca fiind 6,5. S-a observat că, prin creșterea concentrației de chitosan valorile pKa ale probelor de PE acoperite cu chitosan se apropie de cea a chitosanului.

Tabel IV.5. Cantitatea medie de sarcină și valorile pKa determinate din izotermele de sarcină.

Proba	Sarcina/masă [mmol/kg]	pKa
PE	Nedetectabil	-
PEcor	Nedetectabil	-
Chitosan	5250,0	6,55
PE/I/1CHT	18,34	3,8
PEcor/I/1CHT	113,04	6,0
PEcor/EDC+NHS/1CHT	94,78	5,9

PE/I/5CHT	33,30	5,7
PEcor/I/5CHT	2252,60	6,20
PE/ES/5CHT,	Nedetectabil	-
PEcor/ES/5CHT	80,32	6,15

IV.1.5. Determinarea potențialului zeta

Comparativ cu PE netratată, toate probele modificate prezintă o deplasare evidentă a punctului izoelectric către valori mai mari de pH însemnând existența a noi funcționalități bazice. După acoperirea cu chitosan, funcția $ZP = f(\text{pH})$ prezintă o inversare a încărcării electrostatice spre valori pozitive și mai mult apar caracteristici amfotere tipice și punctul izoelectric se deplasează către regiuni de pH mai mare (spre domeniu bazic). Cantitatea de grupări amino de pe suprafața tratată corona și acoperită cu biopolimer explică valorile puternic pozitive sau negative a potențialului zeta la nivelul de platou a curbelor caracteristice probelor. Acest lucru este de așteptat deoarece acoperirile cu chitosan reduc aciditatea aparentă a suprafeței filmelor de PE. [Pâslaru *et al.* 2013a]

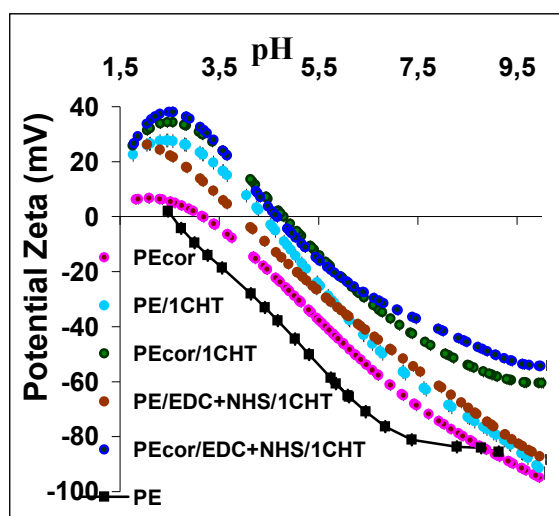


Figura IV.6. Potențialul zeta în funcție de pH (în soluții apoase de electrolit anorganic, KCl 1mM). [Pâslaru *et al.* 2013a]

Se obține o acoperire mai bună a suprafeței PE cu chitosan atunci când substratul este tratat corona și ulterior activat cu agenții de cuplare EDC+NHS, afirmație susținută de faptul că punctele izoelectrice ale probelor PEcor/CHT și PEcor/EDC+NHS/CHT sunt cele mai apropiate de valoarea pKa a chitosanului.

IV.2. Studiul desorbției chitosanului de pe suprafața PE

Pentru a evalua diferența dintre adsorbția fizică și legarea covalentă a chitosanului pe suprafața PE și eficiența de acoperire s-au realizat studii de desorbție prin titrare polielectrolitică.

IV.2.1. Evaluarea desorbției chitosanului prin titrare polielectrolitică

Caracteristica principală pentru toate probele este aceea că la $\text{pH} = 6,5$ desorbția chitosanului a fost mai lentă decât la $\text{pH} = 3,5$ - Figura IV.8. Acest comportament poate fi explicat prin aceea că la pH acid toate grupările amino primare ale chitosanului sunt protonate, NH_3^+ , chitosanul trecând mult mai ușor în soluție.

O comparație între proba PEcor/CHT și cea în care se utilizează în plus agenți de cuplare relevă faptul că, pentru prima probă cantitatea de chitosan desorbită de pe suprafață a fost mai mare și procesul este unul oscilant la $\text{pH} 6,5$. În acest caz desorbția chitosanului a fost cvasi-reversibilă, posibil datorită caracterului instabil al stratului de chitosan depus pe acea suprafață. Mai mult, cantitatea de chitosan determinată la echilibru în vasul de desorbție – $\text{pH} 3.5$ – pentru proba PEcor/CHT a fost de trei ori mai mare decât în cazul probei PEcor/EDC+NHS/CHT aceasta evidențiind importanța utilizării agenților de cuplare în obținerea unui strat stabil de biopolimer pe suprafața PE tratate corona.

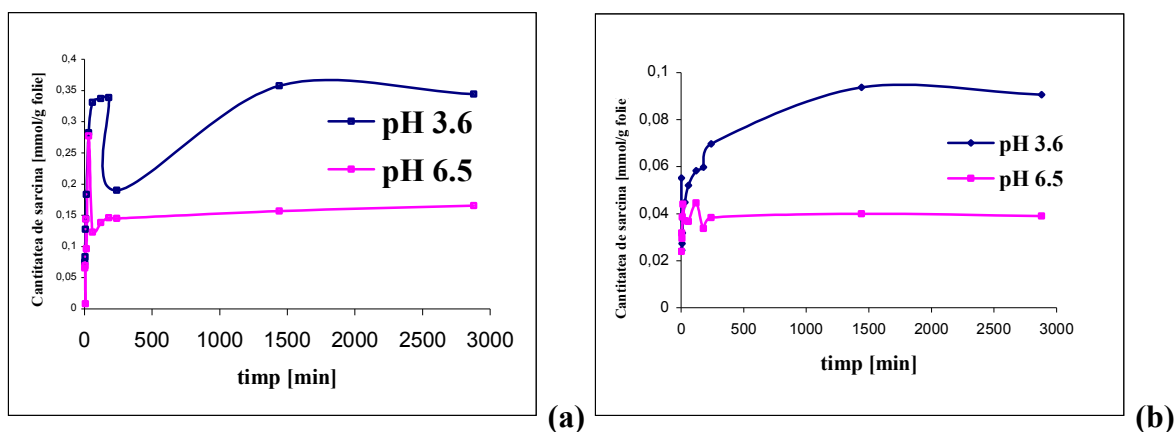


Figura IV.8. Curbele cinetice de desorbție a chitosanului la diferite pH -uri (3,6 și 6,5): (a) PEcor/CHT și (b) PEcor/EDC+NHS/CHT. [Pâslaru et al. 2013a]

IV.2.2. Titrarea potențiometrică după desorbție

Comparând scăderea cantității de grupări amino protonabile după procesul de desorbție la $\text{pH} 3.6$ se observă că aceasta este mai pronunțată pentru proba PEcor/CHT (de 57%) decât în cazul probei PEcor/EDC+NHS/CHT (cu o scădere de 40%).

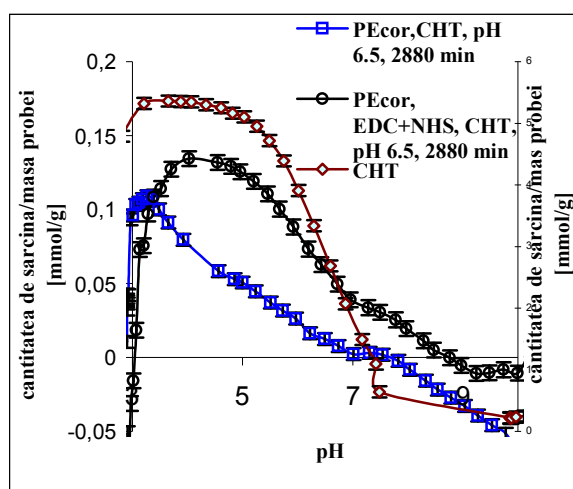


Figura IV.10. Izotermele de sarcină pentru probele: PEcor/CHT/pH 6,5/2880min; PEcor/EDC+NHS/CHT/pH 6,5/2880min și chitosan (CHT). [Pâslaru et al. 2013a]

IV.2.3. Datele spectroscopice FTIR-ATR după desorbție

Spectrele FTIR-ATR ilustrate în figura IV.11 demonstrează prezența benzilor de vibrație caracteristice chitosanului doar în cazul în care substratul este tratat corona sugerând stabilitatea stratului de biopolimer depus pe suprafața PE chiar la acțiunea unui mediu puternic acid.

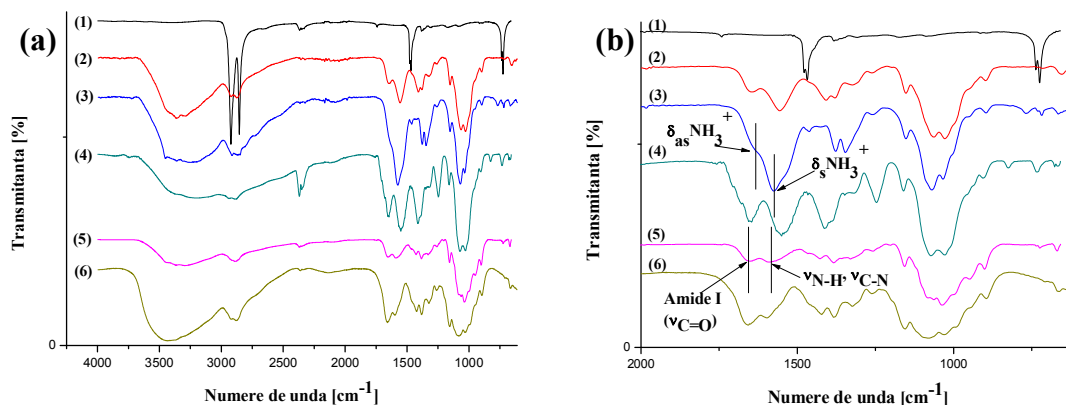


Figura IV.11. Spectrele FTIR-ATR ale suprafețelor de PE acoperite cu chitosan pe regiunea (a) 4250-610 cm^{-1} și (b) 2000-610 cm^{-1} : (1) PE; (2) PEcor/CHT; (3) PEcor/CHT/pH 6,5/2880 min; (4) PEcor/EDC+NHS/CHT; (5) PEcor/EDC+NHS/CHT/pH 6,5/2880min; (6) CHT.

[Pâslaru et al. 2013a]

Protonarea funcționalităților aminice ale chitosanului este mult mai evidentă pentru proba PEcor/CHT/pH 6,5 – Figura IV.6 (Spectrul 3) – sugerată fiind de existența a două benzi, ambele fiind atribuite grupei NH_3^+ , și anume pentru vibrația de deformare asimetrică

(δ_{as}) ce apare la 1633 cm^{-1} (umăr) și vibrația de deformare simetrică (δ_s) la 1575 cm^{-1} . Pe de altă parte, proba PE acoperită cu chitosan, care a fost activată cu agenți de cuplare după tratamentul corona, este mai puțin protonată după supunerea la desorbție în soluție de pH, un fenomen care poate fi explicat prin reducerea numărului de grupări amino primare care au fost convertite în grupări amidice (Figura IV.11 (Spectrul 5) – benzile de la 1651 cm^{-1} și 1588 cm^{-1} sunt atribuite vibrațiilor amidă I și respectiv amidă II).

IV.3. Testarea permeabilității la oxigen

Filmele de polietilenă acoperite cu chitosan, cu o aderență îmbunătățită după tratamentul corona, prezintă o permeabilitate la oxigen redusă comparativ cu filmul de PE de referință ($3833\text{ mL/m}^2\cdot\text{zi}$) și o scădere drastică se observă în cazul probei PEcor/I/5CHT ($778\text{ mL/m}^2\cdot\text{zi}$). Proprietățile de barieră la oxigen sunt influențate de grosimea stratului de chitosan depus, în consecință depunerea realizată prin electropulverizare prezintă o viteză de transmisie a oxigenului mai mică comparativ cu cea a filmului de referință dar nu la fel de semnificativă ca în cazul probei PEcor/I/5CHT (care prezintă stratul de chitosan cel mai gros).

IV.4. Evaluarea caracteristicilor mecanice de suprafață

Pentru determinarea proprietăților micro-mecanice de suprafață (duritatea și elasticitatea – Figura IV.13) s-a utilizat tehnica de nanoindentare, prin realizarea a numeroase indentări consecutive pe suprafața probei. Pentru acest studiu s-a ales filmul de polietilenă nemodificat și proba modificată cu biopolimer (chitosan), care s-a evidențiat prin metodele analitice anterioare ca fiind proba cu gradul de modificare al suprafeței cel mai mare și anume PEc/EDC+NHS/1CHT.

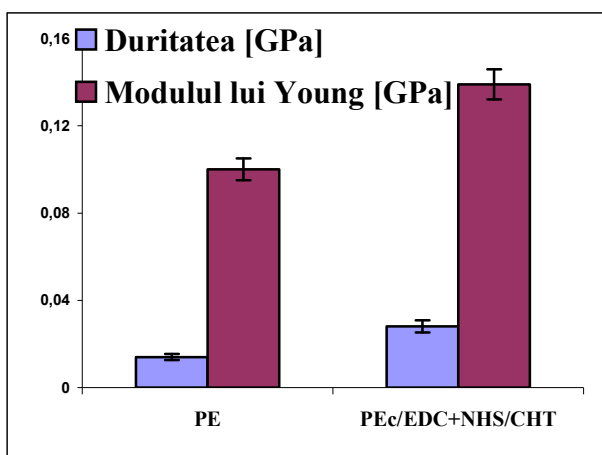


Figura IV.13. Valorile experimentale medii ale parametrilor mecanici pentru proba martor (PE) și cea modificată cu chitosan. [Pâslaru et al. 2013b]

Este evidentă o creștere atât a durității cât și a modulului lui Young odată cu imobilizarea chimică a chitosanului pe suprafața polietilenei. Această creștere este de aproximativ 50%.

IV.5. Determinarea rezistenței la zgâriere

Studiul de micro-zgâriere (*micro-scratch*) s-a realizat pe probele de PE de referință, acoperite cu chitosan prin adsorbție fizică și prin legare covalentă, prin două metode: în regim static și dinamic. Probele acoperite cu chitosan prezintă o foarte bună rezistență la zgâriere în comparație cu filmul de PE nemodificat, caracteristică sugerată de scăderea coeficientului de frecare (COF) (în regim de forță constantă) și creșterea forței normale și a forței de frecare maxime (în regim dinamic) după depunerea biopolimerului – Figura IV.14. Cea mai bună rezistență la micro-zgâriere fiind manifestată de proba obținută prin imobilizarea chimică a chitosanului pe substrat (PEc/EDC+NHS/CHT).

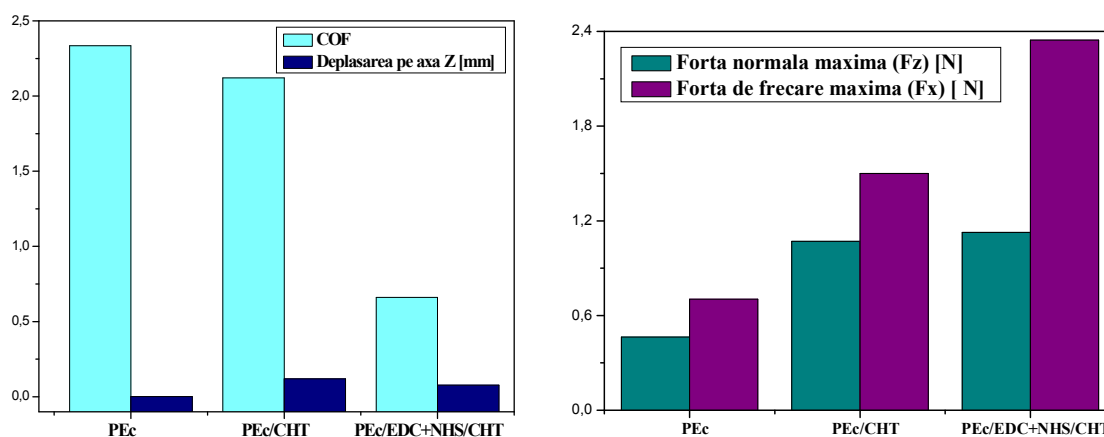


Figura IV.14. Rezultatele testului de micro-zgâriere în regim de forță constantă aplicată (a) și în regim dinamic (b). [Pâslaru et al. 2013b]

IV.6. Testarea activității antimicrobiene

S-a investigat activitatea de inhibare a filmelor de PE acoperite cu chitosan împotriva a două bacterii Gram-negative, și anume *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*, și o bacterie Gram-pozitivă, *Listeria monocytogenes*. Imaginile microscopice ale culturilor bacteriene sunt ilustrate în Figura IV.16.

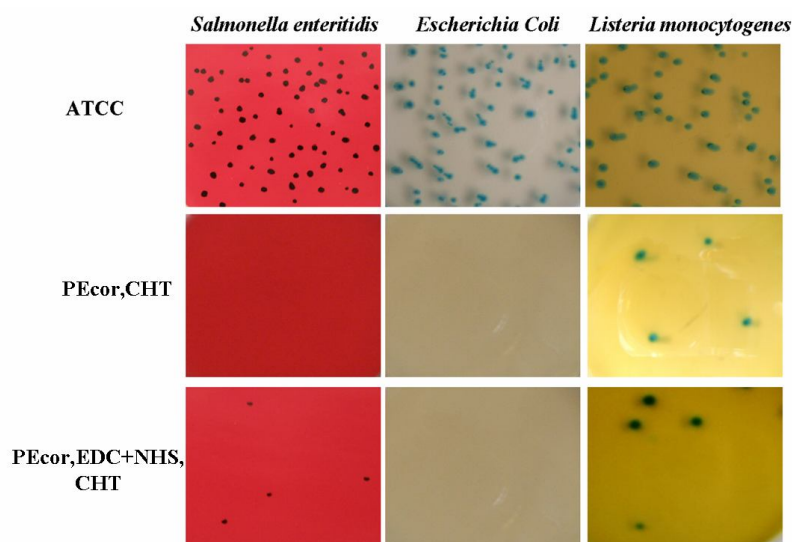


Figura IV.16. Aspecte microscopice ale coloniilor bacteriene dezvoltate în absența (ATCC) și în prezența filmelor de PE acoperite cu chitosan. [Pâslaru et al. 2013a]

Toate probele acoperite cu chitosan manifestă activitate antibacteriană, observându-se o ușoară influență a concentrației numai în cazul bacteriei *Listeria monocytogenes*. Acest comportament poate fi explicat prin faptul că, chitosanul sau derivații acestuia s-au dovedit mult mai eficienți pentru inhibarea bacteriilor Gram-negative decât a celor Gram-pozitive. [Chen et al. 2002] Procedura de legare covalentă a chitosanului pe substrat nu influențează semnificativ activitatea antibacteriană a acestuia.

IV.7. Evaluarea receptivității la pH

Pentru evaluarea receptivității la pH a suprafețelor de polietilenă modificate cu chitosan s-a determinat variația unghiului de contact cu pH-ul soluției folosite în măsurătorile goniometrice. pH-ul soluțiilor tampon a fost variat în domeniul de pH cuprins între 2 și 11.

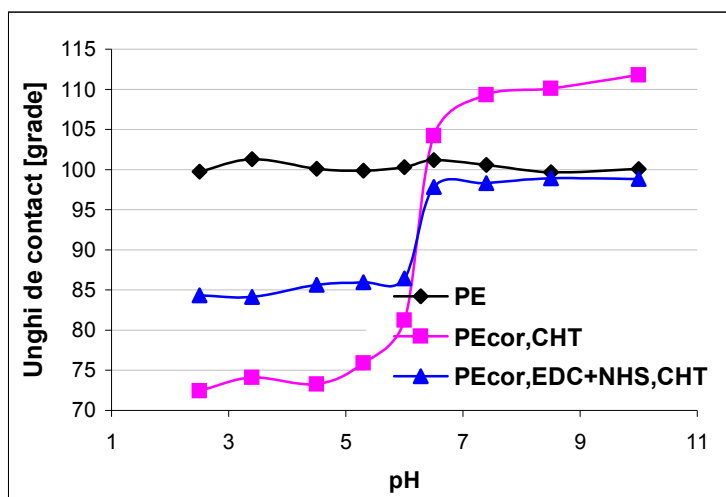


Figura IV.17. Variația unghiului de contact în funcție de pH-ul soluției. [Pâslaru et al. 2013b]

În cazul substratului de PE nu s-a observat o influență a pH-ului soluției asupra unghiului de contact. În timp ce, după depunerea chitosanului pe suprafața substratului polimeric se observă că prin modificarea pH-ului de la valori acide la valori bazice unghiul de contact crește, prezentând un salt semnificativ în jurul valori de $\text{pH} = 6$. Dacă la pH acid ($\text{pH} = 2,5$) unghiul de contact este de 70° având caracteristici hidrofile, la pH bazic ($\text{pH} = 10$) acesta are o valoare de aproximativ 110° suprafața devenind hidrofobă. În cazul utilizării agenților de cuplare se observă micșorarea saltului unghiului de contact, cel mai probabil deoarece o parte din grupările sensibile la pH ale chitosanului sunt implicate în interacțiunea cu substratul, fiind mai greu accesibile la suprafață.

IV.8. Concluzii

- *S-a elaborat o procedură în două etape pentru obținerea de materiale multifuncționale pe bază de polietilenă și chitosan receptivă la pH și cu proprietăți antimicrobiene satisfăcătoare pentru aplicarea în industria ambalajelor alimentare precum și pentru adsorbția controlată de proteine.*
- *Procedura constă în tratamentul corona al polietilenei urmată de acoperirea cu chitosan utilizând diferite proceduri precum imersare, întinderea soluției pe suprafață și electropulverizare.*
- *Toate probele acoperite cu chitosan au prezentat activitate antibacteriană și receptivitate la pH datorită depunerii chitosanului pe suprafața PE care a condus și la îmbunătățirea proprietăților de barieră elaborându-se astfel suprafețe de PE receptivă (sensibile) la stimuli externi (pH și agenți biologici). Pretratamentul corona al substratului polimeric prezintă un rol foarte important în realizarea aderenței biopolimerului la substrat.*
- *Unele proprietăți investigate precum compoziție elementală, cantitatea de sarcină prezentă la suprafață și permeabilitatea la oxigen depind de concentrația de chitosan utilizată.*
- *În termeni de eficiență și consum scăzut de substanțe, metoda de electropulverizare este de departe cea mai potrivită procedură de acoperire a substratului*

CAPITOLUL V. MODIFICAREA SUPRAFETEI DE POLIETILENĂ PRIN DEPUNEREA AMESTECULUI BIOACTIV CHITOSAN/VITAMINA E PRIN ELECTROPULVERIZARE

Prin crearea de formulări pe bază de chitosan și vitamina E (VE) se combină activitatea antibacteriană a polizaharidei cu funcțiile biologice și activitatea antioxidantă ale vitaminei E. În acest capitol se prezintă aplicarea tehnicii de electropulverizare pentru obținerea de materiale hibride pe bază de chitosan/vitamina E depus pe suprafața PE.

Legarea ireversibilă a formulării de substrat a fost realizată prin pretratarea acestuia utilizând o tehnică fără solvenți, ecologică și anume descărcarea corona și ulterior imobilizarea covalentă a formulării bioactive utilizând diferiți agenți de cuplare (hidroclorura de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida și N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) și carbonildiimidazol (CDI).

V.1. Caracterizarea formulării chitosan/vitamina E

V.1.1. Proprietăți reologice

Soluția de chitosan luată în studiu a avut o concentrație de 2,3 %. Concentrația vitaminei E a fost variată în domeniul 0,5-3 % raportat la chitosan în domeniul liniar viscoelastic (LVE) cuprins între (0-100 rad/s).

Forma curbelor de vâscozitate evidențiază clar scăderea atât a vâscozității complexe (η^*) cât și a vâscozității la forță de forfecare zero (η) odată cu creșterea frecvenței și respectiv a vitezei de forfecare, indicând faptul că toate soluțiile au un comportament ne-Newtonian (pseudoplastic) de fluide care se subțiază prin forfecare. În figura V.1. se compară vâscozitatea complexă (η^*) cu cea staționară (η) pentru soluțiile de chitosan și amestec chitosan/vitamina E în diferite concentrații.

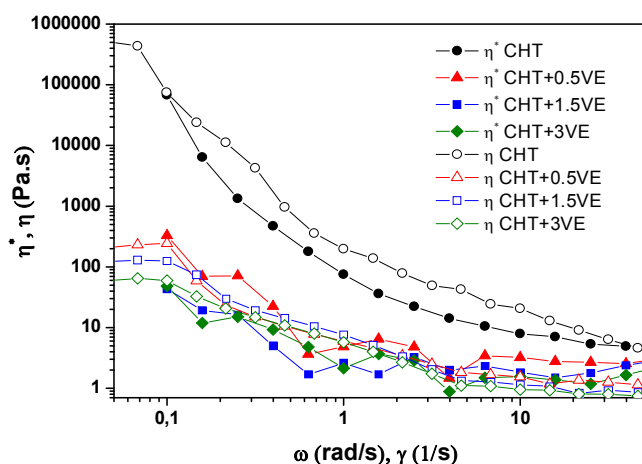


Figura V.1. Compararea vâscozității complexe (η^*) și a vâscozității de forfecare la stare de echilibru (η) pentru soluțiile pe bază de chitosan cu conținut diferit de vitamina E. [Pâslaru et al. 2013c]

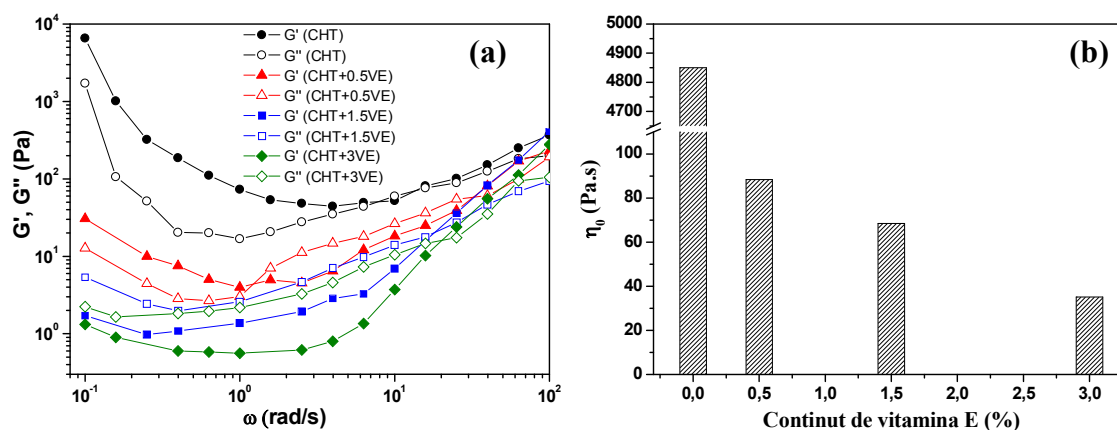


Figura V.2. Efectul adaosului de vitamina E în soluțiile pe bază de chitosan asupra modulilor dinamici (G' , G'') în funcție de frecvență la 25°C (a) și vâscozitatea la forță de forfecare zero în funcție de conținutul de vitamina E (b). [Pâslaru et al. 2013c]

Cea mai semnificativă scădere a vâscozității cu viteza de forfecare s-a înregistrat pentru soluția de chitosan. Modulii dinamici, G' și G'' , cât și vâscozitatea la forță de forfecare zero (Figura V.2) scad odată cu creșterea concentrației de vitamina E din soluție, cele mai mari valori fiind corespunzătoare soluției de chitosan fără adaos de vitamina E. La frecvențe unghiulare mici, modulul de stocare (G') determinat pentru chitosan este mai mare decât modulul de pierdere (G''), indicând astfel un comportament de gel al soluției pe când, pentru toate probele ce conțin vitamina E valorile modulului de pierdere devin mai mari decât cele pentru modulul de stocare sugerând un comportament de fluid normal.

V.1.2. Morfologia - Microscopie electronică de baleiaj

Electropulverizarea chitosanului conduce la formarea de picături polimerice pe suprafața substratului fără a se observa formarea de nanofire. Acest lucru poate fi explicat pe baza incapacității chitosanului de a forma un jet stabil în timpul procesului datorită vâscozității mari și a structurii pseudoplastice în soluție. Complementar cu vâscozitatea este și faptul că biopolimerul este un polielectrolit ce prezintă sarcini electrice nete în soluție. Prin urmare forțele repulsive puternice dintre grupările ionogene din catena polielectrolitului împiedică formarea de fibre continue. Prin adăugarea vitaminei E s-au obținut pe suprafața substratului filme subțiri cu nanostructuri diferite, de la nanosfere la acoperiri tridimensionale prin formare de particule conectate (un conținut de 1,5% și 3% VE). Se poate afirma că

adaosul de vitamina E poate conduce la îmbunătățirea proprietății de electrofilare a chitosanului – Figura V.3.

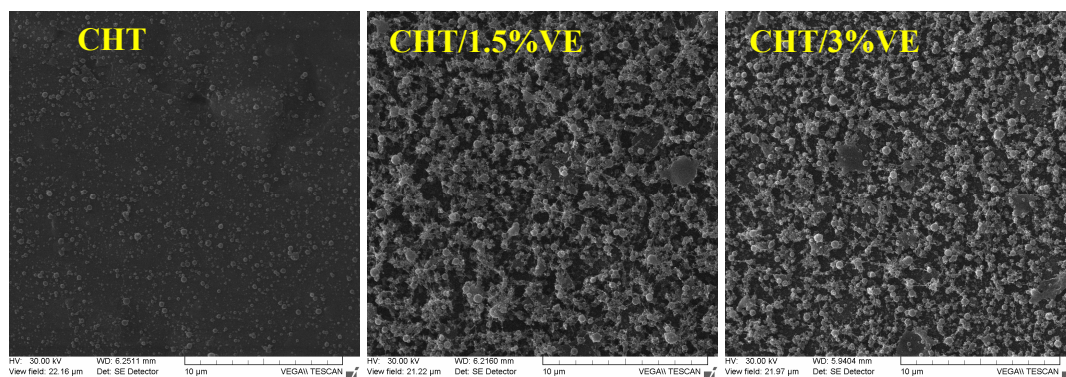


Figura V.3. Imaginile SEM pentru formulările pe bază de chitosan și vitamina E depuse prin electropulverizare. [Pâslaru et al. 2013c]

V.2. Evaluarea depunerii de chitosan/vitamina E prin electropulverizare

V.2.1. Rezultatele FTIR-ATR

Atunci când se compară spectrele IR înregistrate pentru matricea de chitosan cu conținut diferit de vitamina E se poate observa că umărul de la 1740 cm^{-1} este distinctiv pentru adosul de vitamina E, chiar și atunci când conținutul de VE este mai scăzut (de 0,5%), – Figura V.4b.

Benzile caracteristice grupării amino și amidă (Amida I) a chitosanului apar la 1597 cm^{-1} și respectiv 1651 cm^{-1} în spectrul probei de PE acoperite cu CHT/VE. Benzile caracteristice grupării amino și amidă (Amida I) a chitosanului apar la 1597 cm^{-1} și respectiv 1651 cm^{-1} în spectrul probei de PE acoperite cu CHT/VE. Benzile caracteristice grupării amino și amidă (Amida I) a chitosanului apar la 1597 cm^{-1} și respectiv 1651 cm^{-1} în spectrul probei de PE acoperite cu CHT/VE.

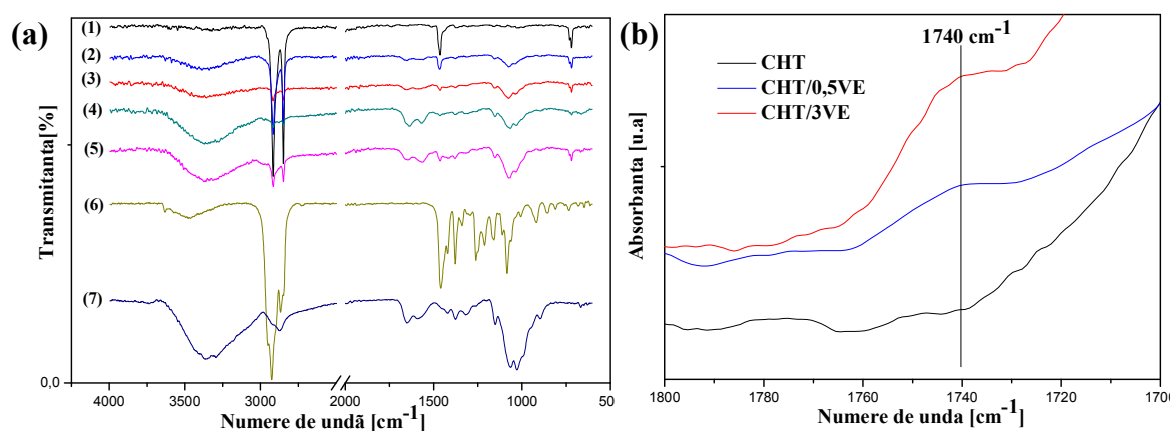


Figura V.4. (a) Spectrele FTIR-ATR pentru suprafețele de PE acoperite cu chitosan/vitamina E prin electropulverizare: (1) PE; (2) PE/CHT+VE; (3) PEcor/CHT+VE; (4)

PEcor/EDC+NHS/CHT+VE; (5) PEcor/CDI/CHT+VE; (6) VE; (7) CHT. (b) Spectrele IR în domeniul 1800-1700 cm⁻¹ pentru matricea de chitosan cu diferite concentrații de vitamina E (0,5% și 3%). [Pâslaru et al. 2013c]

În cazul când anterior depunerii se activează amestecul bioactiv cu agenții chimici de cuplare aceste benzi se deplasează către numere de undă mai mici, după cum se poate observa în Figura V.4a. Aceste rezultate indică interacțiuni puternice între formularea chitosan/vitamina E și suprafața PE tratată corona activată cu agenți de cuplare. În aceste cazuri apar noi benzi în spectrele de absorbție în IR atribuite în principal grupărilor funcționale de tip amidă. Benzile mai sus menționate sunt situate în spectrul IR la 1637 cm⁻¹, atribuită vibrației de alungire a grupării –C=O (Amidă I) și la 1568 cm⁻¹, ceea ce corespunde vibrației de deformare în plan a grupării –NH (δ_{NH}) [Balaban et al. 1983; Chen et al. 2008] în cazul probei obținute prin utilizarea agenților de cuplare EDC și NHS. În cazul cuplării cu carbonildiimidazol (CDI) benzile menționate se regăsesc în spectru IR la 1645 cm⁻¹ și 1564 cm⁻¹. Aceste particularități spectrale estimează legarea chimică a amestecului chitosan/vitamina E pe suprafața PE tratată corona.

Spectrele FTIR-ATR au evidențiat că interacțiunea dintre chitosan și vitamina E este în principal electrostatică și prin intermediul legăturilor de hidrogen.

V.2.2. Spectroscopia XPS

Datele XPS - Tabelul V.1- indică modificarea compoziției chimice a suprafeței substratului după imobilizarea amestecului CHT/VE, amestecul bioactiv fiind legat ireversibil de substratul de PE tratat corona când se utilizează agenții chimici de cuplare, observându-se în aceste cazuri aceleași elemente chimice ca și înainte de procesul de desorbție, și că sistemul de cuplare EDC cu NHS este ușor mai eficient decât cel pe bază de CDI. Rapoartele atomice O/C și N/C a probelor modificate au variat în mod evident cu procesul secvențial de modificare ce include tratamentul corona și depunerea fizică/legarea covalentă a formulării CHT/VE pe substrat.

Tabel V.1. Compoziția elementală și rapoartele atomice pentru probele de PE modificate.

Proba	Compoziția elementală (% atomice)				
	C	O	N	O/C	N/C
PE	99,03	0,97	-	0,011	-
PEcorona	88,54	9,22	0,72	0,104	0,008
PE/CHT+VE	73,16	20,87	4,4	0,285	0,06

PEcor/CHT+VE	69,94	23,54	4,5	0,336	0,064
PEcor/EDC+NHS/CHT+VE	69,13	23,7	5,15	0,342	0,074
PEcor/CDI/CHT+VE	68,06	25,01	4,9	0,367	0,072
PEcor/EDC+NHS/CHT+VE/pH 3,5	68,57	24,35	5,5	0,355	0,08
PEcor/CDI/CHT+VE/pH 3,5	66,08	26,53	6,85	0,401	0,103

Raportul atomic procentual C4/C2 ($N-\underline{C}=\underline{O} / \underline{C}-NH_2$) - Figura V.7 - poate fi utilizat pentru evaluarea formării legăturii amidice. Acest raport crește după utilizarea ambelor căi de cuplare, prezentând o valoare mai mare în cazul utilizării sistemului EDC și NHS, sugerând că sistemul de cuplare EDC cu NHS este ușor mai eficient decât cel pe bază de CDI.

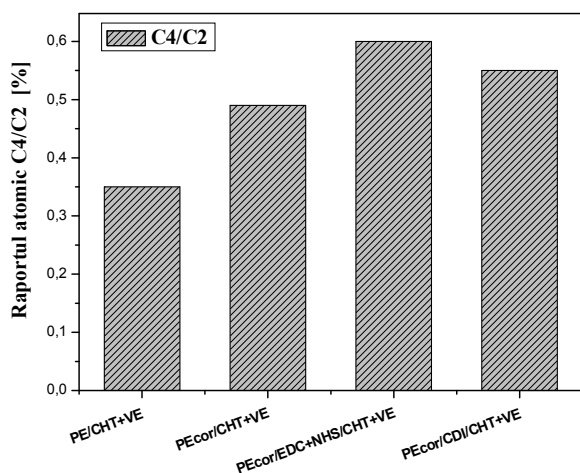


Figura V.7. Rapoartele atomice C4/C2 pentru probele modificate cu chitosan/vitamina E. [Pâslaru et al. 2013c]

V.2.3. Titrarea potențimetrică

Cantitatea totală de sarcină pentru fiecare probă analizată s-a calculat din nivelul de platou a izotermelor de sarcină și rezultatele sunt prezentate în Tabelul V.3.

Tabel V.3. Cantitatea de sarcină totală normalizată la masa probei pentru PE de referință și filmele modificate.

Proba	Cantitatea de sarcină [mmol/kg]
PE	Nedetectabil
PEcor	Nedetectabil
PE/CHTm+VE	21,62
PEcor/CHTm+VE	35,40
PEcor/CDI/CHT+VE	47,94
PEcor/EDC+NHS/CHT+VE	54,92

Proba PEcor/EDC+NHS/CHT+VE prezintă cel mai mare conținut de grupări amino încărcate, acest rezultat fiind corelat și cu conținutul cel mai mare de azot determinat prin XPS.

V.2.4. Titrarea polielectrolitică – Studiul de desorbție

Caracteristica principală a curbelor de desorbție pentru toate probele investigate este aceea că la pH 6,5 desorbția amestecului CHT/VE de pe suprafață este mai lentă decât în cazul utilizării pH-ului 3,6. Această tendință se datorează faptului că la pH acid toate grupările amino primare accesibile din amestecul bioactiv sunt protonate, NH_3^+ , disociind mai ușor în soluție.

În figura V.10 se prezintă spectrele înregistrate după desorbție la pH 3,6. Spectrele evidențiază calitativ prezența amestecului bioactiv chitosan/vitamina E pe suprafața polimerului, chiar și după acțiunea unui mediu acid puternic, numai atunci când substratul este tratat corona și în special când se utilizează imobilizarea covalentă prin intermediul agenților chimici de cuplare.

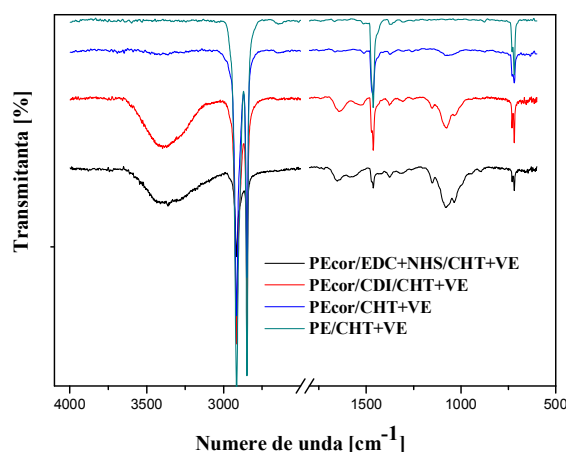


Figura V.10. Spectrele FTIR-ATR a filmelor acoperite cu CHT/VE după desorbție la pH 3,6.

V.2.6. Testarea activității antibacteriene

Testele de evaluare a inhibării creșterii bacteriene (Tabel V.4) de către compozitele stratificate evidențiază că, activitatea antibacteriană a amestecului bioactiv legat covalent de suprafață scade atunci când se compară cu cel adsorbit fizic pe suprafață, dar își menține activitatea de inhibare pentru anumite bacterii. Mai mult, cu toate că s-a demonstrat prin diferite metode analitice că sistemul EDC+NHS este mai eficient ca și protocol de legare covalentă cel de-al doilea sistem, CDI, blochează mai puține grupări amino din amestecul bioactiv care sunt implicate în procesul de inhibare bacteriană.

Tabel V.4. Activitatea antibacteriană a compozitelor stratificate obținute.

Compoziția probei	Inhibare 48h <i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> ATCC 25922 (%)	Inhibare 48h <i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 25922 (%)	Inhibare 48h <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 25922 (%)
PE	39	14	25
PEcor/CHT+VE	95,18	100,00	89,58
PEcor/EDC+NHS/CHT+VE	39,94	78,46	29,17
PEcor/CDI/CHT+VE	77,11	86,15	87,50

V.2.7. Evaluarea activității antioxidante

În Tabelul V.5 sunt prezentate rezultatele testului cu DPPH pentru probele de PE acoperite cu amestec de CHT/VE cu procent diferit de α -tocoferol. Probele obținute prezintă activitate antioxidantă, manifestând o dezactivare eficientă a radicalului liber 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Activitatea antioxidantă s-a testat și în cazul probelor supuse anterior studiului de desorbție în mediu acid, înregistrându-se o valoare RSA de 18,5% după 30 minute. Se evidențiază astfel că, vitamina E rămâne stabilă pe substratul de PE încorporată în matricea de chitosan și materialul obținut prezintă activitate antioxidantă chiar și în aceste condiții.

Tabel V.5. Activitatea de dezactivare a radicalului (RSA) DPPH pentru compozitele stratificate.

Proba	RSA/100 mg probă (%) (după 30 min)	RSA/100 mg probă (%) (după 24 ore)
PE	0,0	0,0
PEcor/CHT+0,5%VE	25,8	77,7
PEcor/CHT+1,5%VE	57,8	100,0
PEcor/CHT+3%VE	83,4	100,0

V.2.8. Determinarea receptivității la pH

Saltul unghiului de contact apare în jurul valorii de pH 6 în cazul probei PEcor/CHT în timp ce în cazul probelor care conțin VE acest punct se deplasează ușor către valori mai mari de pH - Figura V.12. Acest lucru poate sugera o ușoară acidifiere a suprafeței prin adăugarea vitaminei E. În plus, utilizarea agenților de cuplare nu conduce numai la o deplasare a punctului de tranziție ci și la o micșorare a diferenței între unghiul de contact minim și

maxim. Utilizarea carbonildiimidazolului ca agent de cuplare chimică conduce la obținerea unei tranziții **hidrofil-hidrofob** mai pronunțată decât în cazul utilizării sistemului EDC+NHS. Compozitele stratificate obținute prezintă receptivitate la pH prezentând un răspuns de tip **suprafață hidrofilă/hidrofobă**, ce poate fi exploatată în domeniu biomedical în special pentru culturi de celule.

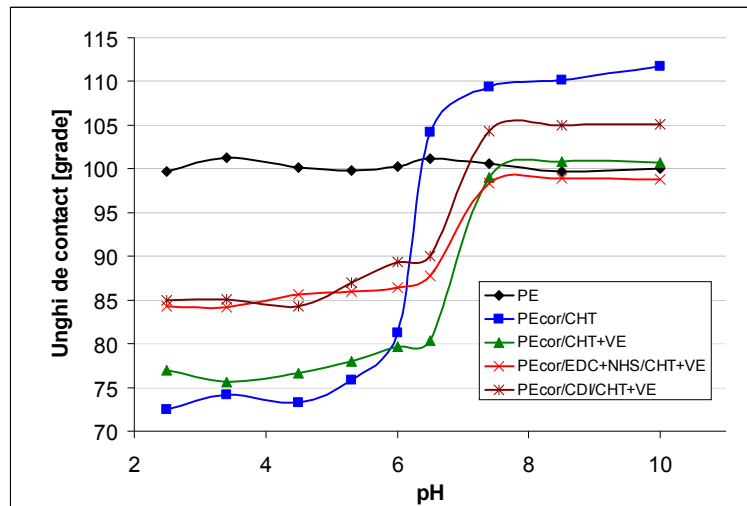


Figura V.12. Variația unghiului de contact în funcție de pH-ul soluției. [Pâslaru et al. 2013d]

V.3. Utilizarea compozitelor stratificate ca și ambalaje alimentare

Compozitele stratificate pe bază de polietilenă și amestec chitosan+vitamina E s-au testat ca și ambalaj bioactiv pentru carnea de pui tocată prin analiza senzorială, determinarea pH-ului, reacția cu hidrogen sulfurat (H_2S) și determinarea numărului total de germeni mezofili aerobici (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Proteus vulgaris* și *Yersinia enterocolitica*) înainte de ambalare cât și după 48 de ore de depozitare. Caracteristicile cărnii tocate ambalate în compozitele stratificate sunt superioare în comparație cu proba de control și a celei ambalate în folie de LDPE (Tabel V.7).

Tabel V.7. Caracteristicile cărnii de pui tocate în timpul examinării probelor. [Pâslaru *et al.* 2013b]

Parametri	Proba de referință (carnea proaspătă)	Caracteristici după 48 de ore de depozitare (după expirarea termenului de valabilitate) în condiții normale			
		CONTROL (proba ținută în caserola inițială)	PEc/EDC+NHS/CHT+VE/I	PEc/EDC+NHS/CHT+VE/ES	LDPE
Aspectul	Aspectul suprafeței: omogen, de culoare roz deschis, lucios	alterat	Relativ proaspăt	proaspăt	alterat
	Consistență elastică	alterat	Relativ proaspăt	Proaspăt	Relativ proaspăt
	Aspect umed în secțiune, caracteristici lucioase	Relativ proaspăt	Proaspăt	Proaspăt	Relativ proaspăt
Mirosul	Plăcut și caracteristic speciei	alterat	Relativ proaspăt	Relativ proaspăt	Alterat
Supa rezultată în urma fierberii și sedimentarea	Transparent, clar, aromatic, la suprafață se separă un strat compact și insulite de grăsime, gust și miros plăcut	alterat	Relativ proaspăt	Relativ proaspăt	Alterat
pH	5,7	6,9	6,3	5,8	6,5
Reacția cu H ₂ S	negativ	Negativ (devine pozitiv în timp)	Negativ (devine pozitiv în timp)	Negativ	Negativ (devine pozitiv în timp)
Numărul total de germeni, CFU/g	$1,9 \times 10^3$	$8,3 \times 10^9$	$8,2 \times 10^7$	$9,4 \times 10^4$	$5,6 \times 10^8$

V.4. Concluzii

- *S-au obținut compozite stratificate dual-bioactive pe bază de polietilenă (ca și substrat polimeric sintetic) și amestec de chitosan cu vitamina E, prin explorarea tehnicii de electropulverizare prin crearea de noi suprafețe multireceptive la stimuli externi.*
- *Adaosul de vitamina E în matricea de biopolimer conduce la modificarea proprietăților reologice, care ulterior influențează procesul de electropulverizare și morfologia acoperirii depuse.*
- *Imobilizarea chimică a amestecului chitosan/vitamina E pe substratul tratat corona s-a realizat prin utilizarea a două sisteme chimice de cuplare: cu clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida și N-hidroxisuccinimida (EDC+NHS) și N-carbonildiimidazol (CDI), primul fiind mai eficient în reacția de cuplare.*
- *S-a stabilit că, componentele formulării bioactive (CHT/VE) interacționează în principal electrostatic și prin legături de hidrogen.*
- *Materialele obținute prezintă caracter triplu bioactiv, prezentând atât activitate antibacteriană cât și antioxidantă și receptivitate la pH, care sunt menținute și după supunerea la acțiunea unui mediu puternic acid. Aceste proprietăți recomandă compozitele stratificate obținute pentru aplicații în domeniul biomedical și/sau al ambalajelor alimentare active.*

CAPITOLUL VI. ADSORBȚIA ALBUMINEI PE SUPRAFAȚA PVDF UTILIZÂND PLASMA DE MICROUNDRE

Poli(fluorura de viniliden) a fost supusă modificărilor succesive ale suprafeței prin tratament în plasmă de microundre utilizând diferite atmosfere, urmate de acoperirea cu albumina din serul bovin (BSA) prin adsorbție fizică directă.

VI.2. Rezultate gravimetrice

Determinarea cantitativă a albuminei imobilizată pe suprafața filmului s-a realizat prin măsurători gravimetrice utilizând o balanță cu precizie înaltă. Tratamentul în plasmă determină o creștere semnificativă a cantității de albumină care aderă la suprafața PVDF (în special când se utilizează ca și gaz de descărcare N_2/H_2), posibil datorită caracterului polar indus în timpul expunerii la plasmă - Figura VI.1.

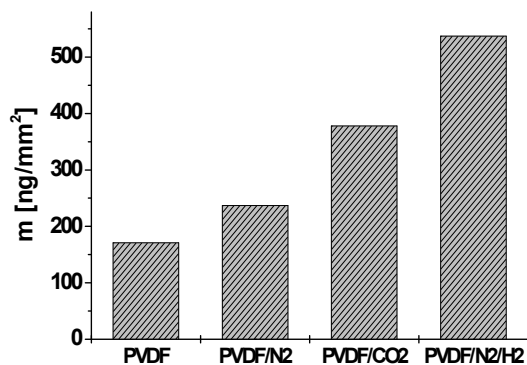


Figura VI.1. Cantitatea de albumină adsorbită pe suprafețele de PVDF, netratată și tratată în plasmă utilizând diferite gaze.

VI.3. Măsurători de unghi de contact

Figura VI.2 se prezintă imaginile picăturilor de apă formate pe suprafața filmelor de PVDF. Se observă o scădere semnificativă a unghiului de contact pentru filmul de PVDF activat și acoperit cu albumină (~ 67-77°), ceea ce poate fi atribuită creșterii caracterului hidrofil al PVDF în urma tratamentului în plasmă și adsorbției BSA. Această scădere este mai pronunțată în cazul utilizării plasmelor N₂/H₂. [Baican, Pâslaru *et al.* 2011a]

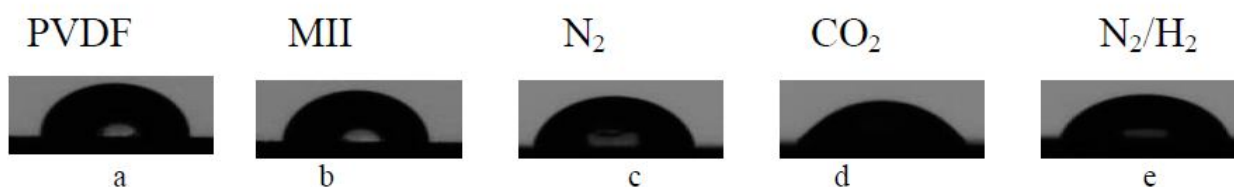


Figura VI.2. Imaginile picăturii de apă pe suprafețele de PVDF netratat și tratat în plasmă după imobilizarea albuminei.

VI.4. Rezultatele AFM

Imaginile AFM ale suprafeței PVDF netratată și neacoperită, și tratată și acoperită cu albumină indică o suprafață neregulată și variația topografică este de aproximativ 35 nm Figura VI.4. Imaginea în contrast de fază oferă detalii clare despre adsorbția BSA, deoarece evidențiază muchii granulare și nu este afectată de diferențele mari de scală a înălțimii. Prin compararea imaginilor de fază înainte și după adsorbție, s-a găsit că tratamentul în plasmă și acoperirea cu BSA fac suprafața filmului mai netedă și mai uniformă (Figura VI.5).

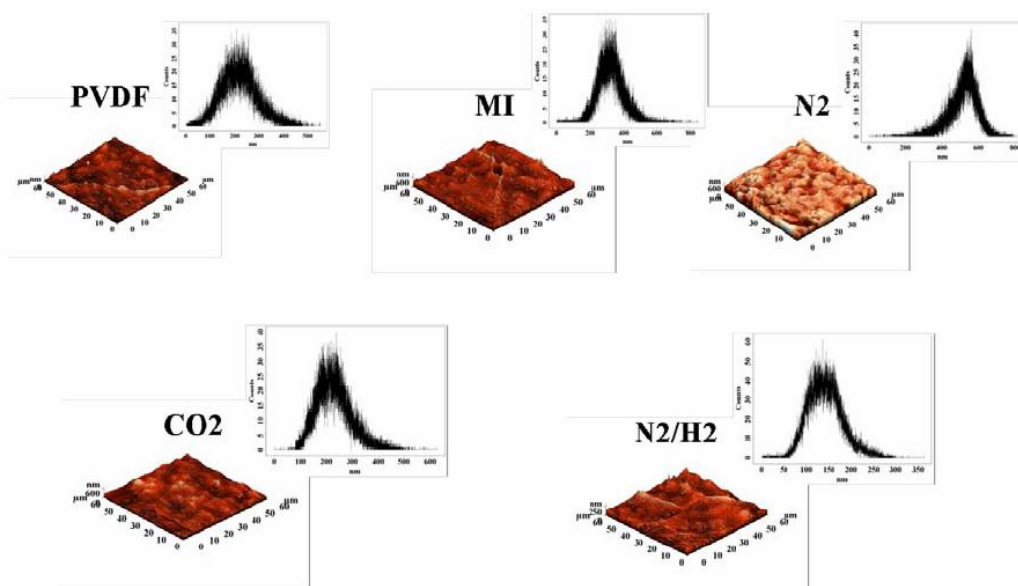


Figura VI.4. Imaginile AFM și histogramele pentru: filmul PVDF de referință, MI-netratat, N_2 , CO_2 , și N_2/H_2 – filme tratate în plasmă utilizând N_2 , CO_2 , și N_2/H_2 ca și gaze de descărcare, după imobilizarea albuminei.

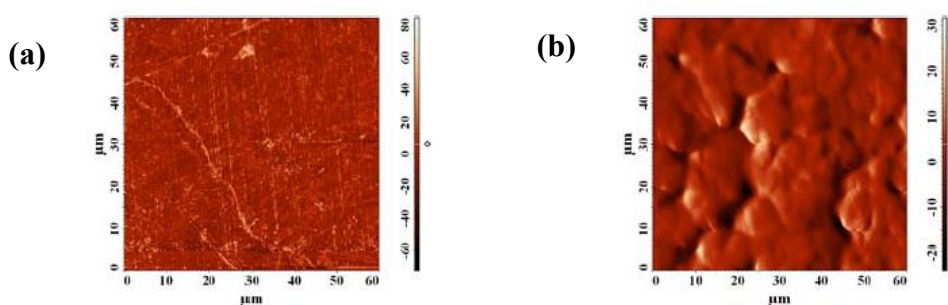


Figura VI.5. Imaginile în contrast de fază ale suprafeței de PVDF înainte (a) și după adsorbția de albumină (b).

VI.5. Rezultatele FTIR-ATR

Spectrele FTIR-ATR a filmelor de PVDF tratate în plasmă de microunde utilizând diferite gaze de descărcare sunt redată în Figura VI.7. După tratamentul în plasmă și acoperirea cu proteină pe suprafața PVDF se găsesc grupări funcționale noi, acestea fiind atribuite grupărilor amidice, aminice și carboxilice din BSA. Prin urmare, spectrele FTIR evidențiază imobilizarea albuminei pe suprafața PVDF. Expunerea în plasmă induce un caracter polar suprafeței PVDF și face posibilă reținerea albuminei. Benzile corespunzătoare albuminei din serul bovin au o intensitate mai mare în cazul tratamentului în plasmă N_2/H_2 , indicând o cantitate mai mare de BSA imobilizată.

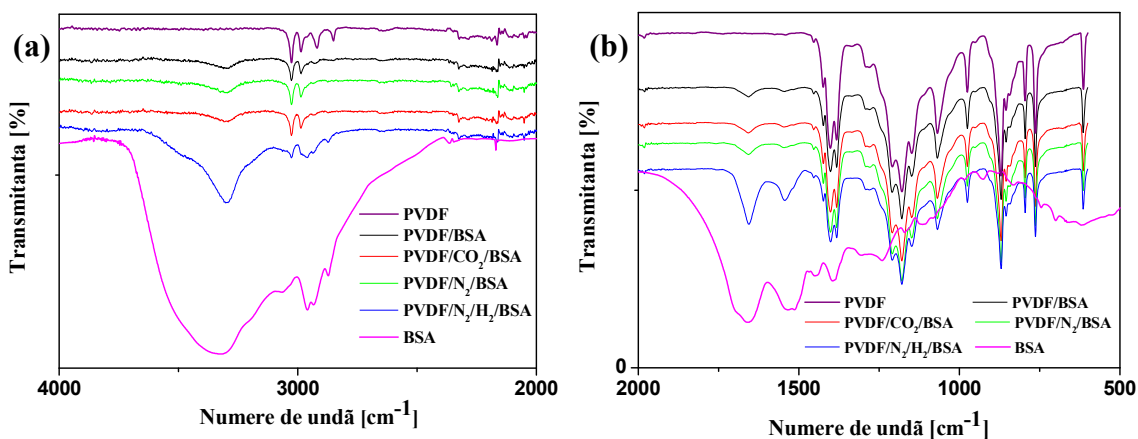


Figura VI.7. Spectrele FTIR-ATR pentru suprafețele PVDF tratate în plasmă și acoperite cu albumină pe domeniul $4000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ (a) și $2000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (b).

Conform rezultatelor experimentale obținute se poate concluziona că albumina din serul bovin interacționează diferit cu suprafața PVDF funcționalizată prin expunerea la cele trei tipuri diferite de plasmă - Figura VI.10.



Figura VI.10. Reprezentarea schematică a interacțiunii BSA cu diferitele suprafețe PVDF.

VI.6. Evaluarea receptivității la pH

Suprafața substratului polimeric (PVDF) nu prezintă receptivitate la pH, manifestând același unghi de contact pe întreg domeniul de pH. Prin expunerea la diferite tipuri de plasmă și acoperirea cu albumină suprafața substratului nu mai prezintă constanță în ceea ce privește valorile unghiului de contact cu varierea pH-ului.

La pH puternic acid suprafețele cu BSA prezintă caracter hidrofil puternic și prin creșterea pH-ului, în jurul valorii $\text{pH} \sim 4,5$ are loc o creștere bruscă a unghiului de contact urmată fiind de un domeniu constant până la $\text{pH} \sim 7$ când unghiul de contact începe iar să scadă. Acest comportament se explică pe baza caracterului amfoter al proteinei. Comportamentul receptiv/adaptiv la pH este mai pronunțat în cazul tratării substratului în plasmă de N_2 și ulterior acoperit cu albumină.

în

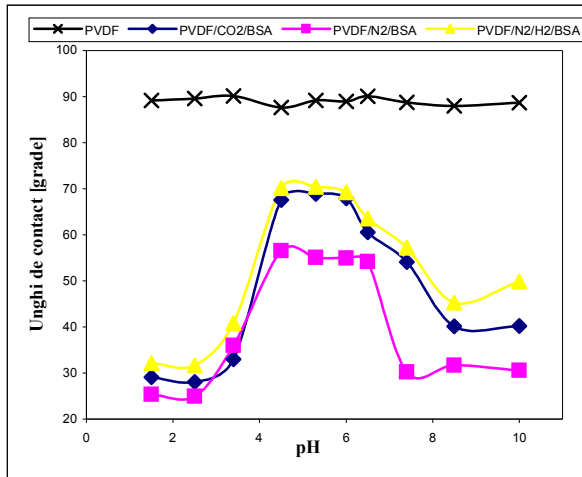


Figura VI.11. Variația unghiului de contact funcție de pH-ului soluției pentru proba martor și suprafețele de PVDF tratate în plasmă și acoperite cu albumină.

VI.7. Concluzii

- S-a elaborat o procedură în două etape pentru imobilizarea BSA pe suprafețele PVDF, care constă în tratamentul în plasmă urmat de adsorbția proteinei pe suprafață.
- Prin utilizarea spectroscopiei FTIR-ATR s-a demonstrat prezența grupărilor funcționale a BSA pe suprafața PVDF.
- Măsurătorile unghiului de contact cu apă și analiza AFM arată o creștere a caracterului hidrofil și scăderea heterogenității, în principal în cazul tratamentului în plasmă de microunde cu N_2/H_2 ca și gaz de descărcare, care este cea mai convenabilă modalitate de imobilizare a BSA.
- Tratamentul în plasmă de microunde a PVDF, urmat de acoperirea cu BSA s-a demonstrat a fi foarte util pentru modificarea adecvată a proprietăților de suprafață, acest lucru conducând la o receptivitate la pH precum și la o posibilă creștere a caracteristicilor de biocompatibilitate a PVDF hidrofob.
- Scopul acestor acoperiri receptivă la pH este acela de a crea suprafețe biocompatibile receptivă la stimuli externi pentru aplicații medicale (în special pentru controlul atașării/detașării celulelor de pe matrici solide).

CAPITOLUL VII. ACTIVAREA ÎN PLASMĂ DE MICROUNDE A SUPRAFEȚEI DE POLI(FLUORURĂ DE VINILIDEN) PENTRU IMOBILIZAREA TRIGLICINEI ȘI PROTEINEI A

PVDF se propune ca și suport pentru imobilizarea de două proteine, triglicina și proteina A ca proteine model. Filmul de PVDF a fost supus la modificări de suprafață succesive prin activarea în plasmă de microunde (pretratament) în diferite atmosfere (CO_2 , N_2 și N_2/H_2), urmată de acoperirea cu proteine prin adsorbție directă și grefare. S-a realizat optimizarea parametrilor descărcării pentru

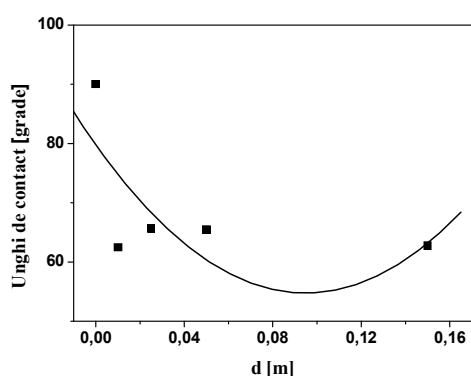
funcționalizarea suprafeței utilizând plasmă CO₂ de microunde, și a procedurilor de imobilizare a unor proteine pe suprafețele tratate.

VII.1. Tratatamentul în plasmă de CO₂ și caracterizarea suprafeței modificate

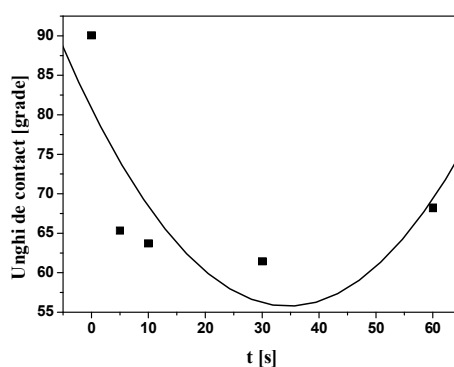
După expunerea în plasmă de CO₂ a filmelor de PVDF componenta acid-bază a energiei libere de suprafață crește semnificativ, în cazul tuturor parametrilor de descărcare experimentali variați (Figura VII.1). Creșterea valorii componentei acid-bază a energiei libere de suprafață evidențiază încorporarea de funcțiuni polare (specii oxigenate). Caracteristicile de biocompatibilitate sunt de asemenea îmbunătățite prin tratare în plasmă, tensiunea de la interfața cu sângele și țesuturile scade semnificativ de la 27 mN m⁻¹, în cazul PVDF netratat, la valori care tind spre zona de biocompatibilitate (mai mic de 9 mN m⁻¹).

S-au stabilit următoarele condiții experimentale ca fiind optime:

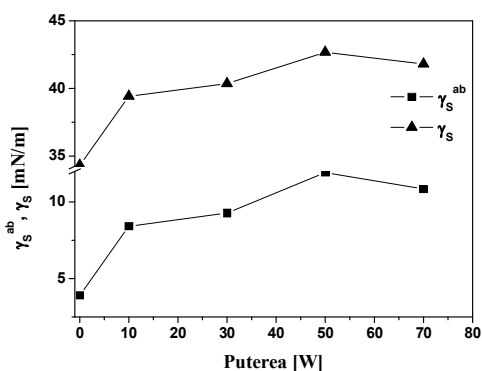
- plasma CO₂: Q = 16×10⁻⁸ m³ s⁻¹, P = 50W, t = 30 s, d = 0,1m;
- iar pentru plasma generată în N₂: d = 0.1m; Q = 16 × 10⁻⁸ m³ s⁻¹, P = 50W, t = 60 s;
- și amestec N₂/H₂ în raport 25/75: Q = 16 × 10⁻⁸ m³ s⁻¹, P = 50W, t = 60 s, d = 0,1 m.



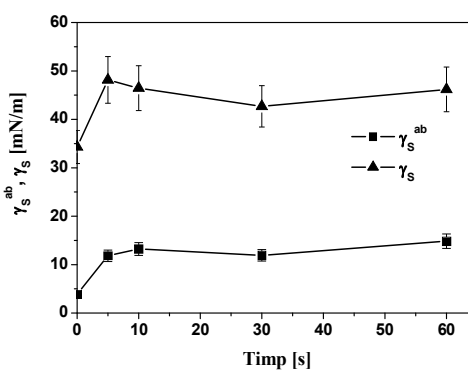
(a)



(b)



(c)



(d)

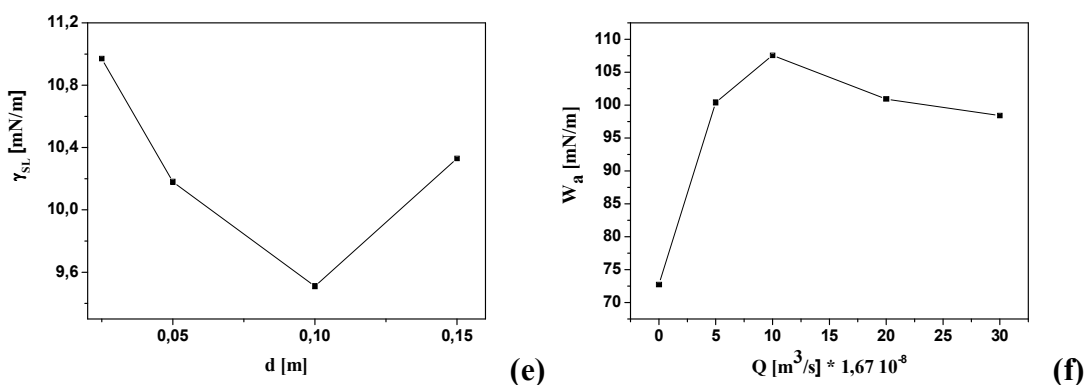


Figura VII.1. Proprietățile de suprafață ale filmului de PVDF după expunerea în plasmă variind parametrii de descărcare. Unghiul de contact în funcție de distanța dintre probă și surfatron (a) și timpul de expunere (b); componenta acid-bază a energiei libere se suprafață în funcție de puterea de descărcare (c) și timpul de tratare (d); tensiunea la interfață dintre sânge și suprafață în funcție de distanța dintre probă și surfatron (e); lucrul mecanic de adeziune în funcție de debitul gazului (f). [Vasile, Pâslaru et al. 2011b]

Atunci când se compară între ele spectrele XPS se observă că speciile chimice dominante prezente pe suprafața substratului polimeric sunt carbonul și fluorul. Noi picuri de emisie caracteristice oxigenului și azotului apar în spectrele probelor de PVDF modificate, datorită tratamentului în plasmă și/sau a etapelor ulterioare de modificare. Atomii de oxigen se găsesc atât sub formă de grupări hidroxil (C-OH) sau/și carbonil (C=O) și radicali epoxi, pe când atomii de azot apar sub formă de grupări aminice (-NH₂). Suprafețele acoperite cu proteine prezintă o creștere semnificativă a procentului în care se găsește atomul de carbon implicat în legătura directă cu azotul, C-N, și în gruparea amidică. Când se utilizează triglicină conținutul de azot este mai mare în cazul în care proteina este legată chimic pe suprafață (Tabel VII.1).

După tratamentul cu plasmă toate suprafețele devin mai hidrofile, datorită implantării de funcțiuni polare care conțin azot sau oxigen. În cazul adsorbției/legării chimice de proteine, atât grupările acide cât și/sau cele bazice ale acestora vor interacționa cu situsurile active complementare bazice sau acide, create pe suprafață prin expunerea în plasmă de N₂ și N₂/H₂ sau respectiv CO₂.

În cazul tratamentului în plasmă de N₂/H₂ triglicina a fost mai bine legată pe suprafața PVDF decât proteina A, pe când în urma tratamentului în plasmă de CO₂ și N₂, proteina A a fost imobilizată covalent mai puternic.

Tabel VII.1. Compoziția atomică experimentală (%) și diferite rapoarte atomice obținute prin analiza XPS pentru suprafețele activate în plasmă și modificate cu proteina A și triglicină.

Proba	% C	% F	% O	% N	O/C	O/F	N/F	N/C
PVDF	53,8	43,2	2,4	0,2	0,045	0,06	0,005	0,003
a) Plasmă CO₂ *lc = legată covalent								
PVDF/CO ₂	81,3	8,8	7,5	0,4	0,093	0,85	0,05	0,005
PVDF/CO ₂ / PrA	62,9	11,7	13,8	5,6	0,219	1,18	0,50	0,089
PVDF/CO ₂ / PrA lc	63,8	16,3	10,9	5,2	0,171	0,67	0,32	0,081
PVDF/CO ₂ /TG	68,1	11,1	7,8	1,0	0,163	0,70	0,090	0,015
b) Plasmă N₂								
PVDF/N ₂	66,1	16,6	5,62	2,3	0,085	0,34	0,14	0,03
PVDF/N ₂ /PrA	63,7	9,4	16,7	6,2	0,262	1,78	0,66	0,097
PVDF/N ₂ /PrA lc	70,6	9,5	11,3	4,4	0,160	1,19	0,46	0,06
PVDF/N ₂ /TG	48,7	7,19	6,04	2,9	0,124	0,84	0,403	0,06
PVDF/N ₂ /TG lc	57,5	7,93	7,88	4,6	0,137	0,994	0,58	0,08
c) Plasmă N₂/H₂								
PVDF/N ₂ /H ₂	69,8	21,55	9,05	1,25	0,129	0,42	0,058	0,0179
PVDF/N ₂ /H ₂ /PrA	57,6	20,1	14,2	1,7	0,247	0,71	0,084	0,0295
PVDF/N ₂ /H ₂ /PrA lc	45,2	7,82	8,84	1,9	0,195	1,13	0,243	0,042
PVDF/N ₂ /H ₂ /TG	67,0	8,7	13,0	2,7	0,194	1,49	0,310	0,040
PVDF/N ₂ /H ₂ /TG lc	56,4	7,2	15,1	3,6	0,267	2,09	0,5	0,064

VII.2.1. Determinarea unghiului de contact

Comparând probele tratate în plasmă de diferite gaze se observă că, în toate cazurile, unghiul de contact cu apa scade în raport cu PVDF de referință – **Figura VII.5.**

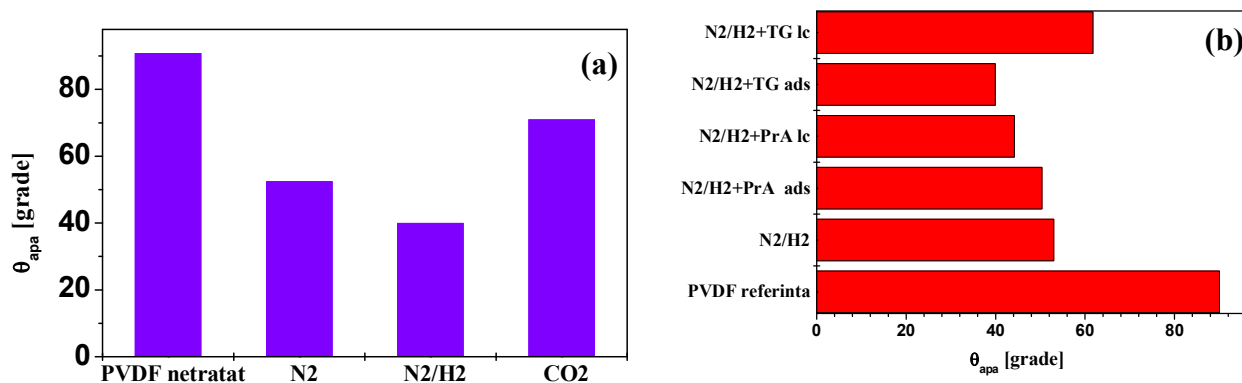


Figura VII.5. Variația unghiului de contact cu apa pentru PVDF de referință și tratat în plasmă de diferite gaze (a) și după adsorbția fizică/legarea covalentă de proteine (b).

VII.2.3. Determinarea prin microscopie de forță atomică (AFM) a morfologiei depunerilor

Imaginile AFM 3D arată suprafețe rugoase, indiferent de natura tratamentului aplicat suprafeței, pe când imaginile înregistrate în contrast de fază (Figura VII.7) induce ideea de suprafețe mai netede, în special în cazurile activării cu plasmă de N_2 și N_2/H_2 și adsorbție fizică/legare covalentă de proteine. Pe suprafețele aminate se realizează o adsorbție fizică/legare covalentă mai eficientă decât în cazul celorlalte suprafețe.

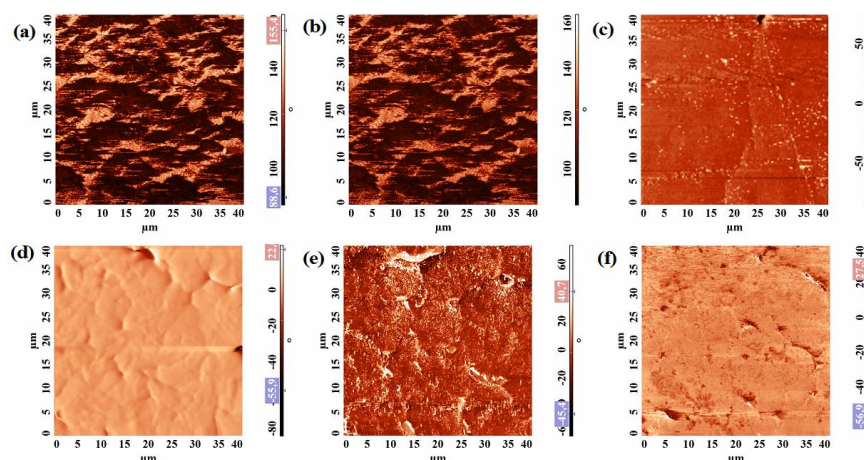


Figura VII.7. Imaginile AFM în contrast de fază pentru suprafețele PVDF tratate în plasmă și acoperite prin legare covalentă cu PrA și TG: (a) PVDF/CO₂; (b) PVDF/CO₂/PrA lc; (c) PVDF/N₂/PrA lc; (d) PVDF/N₂/H₂; (e) PVDF/N₂/H₂/PrA lc; (f) PVDF/N₂/H₂/TG lc.

VII.2.4. Testele de imunofluorescență

Pe suprafața polimerului pretratată în plasmă și acoperită cu proteine s-a depus 5 μL de ser polivalent anti-*Escherichia coli*. Anticorpul de pe suprafață sunt marcați cu un fluorocrom (anticorpul treponemic fluorescent cu absorbție – FTA-Abs). Prin reacția specifică dintre anticorpul anti-*Escherichia coli* și antigen (reprezentat de microorganismul *Escherichia coli*) se formează un imunoprecipitat care poate fi monitorizat prin spectroscopia de fluorescență.

Procesul de legare chimică al proteinelor induce zone de fluorescență mult mai mari, cea mai mare fiind observată pentru PVDF activat în plasmă de N_2/H_2 și acoperit prin legare chimică cu triglicină. Rezultate similare au fost obținute pentru suprafețele activate în plasmă de CO_2 sau N_2 , dar în aceste cazuri zone mai mari de fluorescență apar atunci când se depune pe substratul polimeric proteina A, deoarece, în aceste situații acoperirea suprafeței cu această proteină a fost cea mai eficientă.

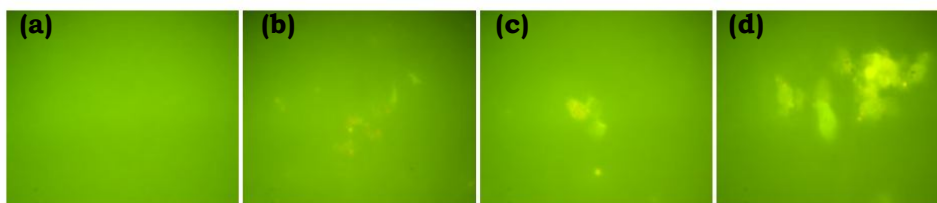


Figura VII.9. Rezultatele testelor de imunofluorescență pentru detecția microorganismului *Escherichia coli*: (a) PVDF; (b) PVDF/ N_2/H_2 + TG adsorbită; (c) PVDF/ N_2/H_2 + PrA legată covalent; (d) PVDF/ N_2/H_2 + TG legată covalent. [Vasile, Pâslaru et al. 2011b]

Testele de imunofluorescență au demonstrat incontestabil prepararea cu succes a suprafețelor de PVDF pentru detecția de microorganisme.

VII.3. Concluzii

- *Tratamentul în plasmă de CO_2 al filmului de PVDF conduce la modificări de suprafață fizico-chimice, în principal prin încorporarea la suprafață de grupări acide, datorită interacțiunilor dintre suprafața polimerică și speciile reactive prezente în faza de plasmă, ceea ce induce o funcționalizare caracterizată de prezența grupărilor oxigenate pe suprafață.*
- *S-au elaborat două noi metode pentru funcționalizarea suprafeței polimerice care constau în imobilizarea proteinei A și triglicinei prin adsorbție fizică/legare covalentă pe o suprafață de PVDF anterior tratată în plasmă de microunde generată în diferite atmosfere gazoase, precum CO_2 , N_2 și N_2/H_2 .*
- *Utilizând spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS) și în infraroșu (ATR-FTIR) s-a evidențiat formarea grupărilor COF, COOH și O=C- după tratamentul în plasmă de CO_2 și a grupărilor amidă și amină după activarea în celelalte două tipuri de plasmă și adsorbția fizică/legarea covalentă de proteine. Măsurătorile de unghi de contact cu apa au arătat o scădere graduală a unghiurilor de contact după adsorbția fizică/legarea covalentă a proteinelor, indicând o creștere a hidrofilității în urma acestor două etape de modificare a substratului. S-a stabilit că TG a fost imobilizată mai bine pe suprafața activată în plasmă de N_2/H_2 , pe când proteina A pe suprafețele expuse în plasmă de CO_2 și N_2 .*

- *Proteinele immobilizate pe suprafața PVDF au fost utilizate cu succes pentru detecția de microorganisme, conform testelor de imunofluorescență.*
- *Procedura propusă în acest studiu prezintă potențial în elaborarea de bioenzori, în special utilizând proprietatea de piezoelectricitate a PVDF, care poate juca un rol clinic important.*

CAPITOLUL VIII. IMOBILIZAREA ORIENTATĂ A IMUNOGLOBULINEI G PE SUPRAFAȚA POLI(FLUORUREI DE VINILIDEN)

În acest capitol se prezintă modificarea suprafeței de PVDF în etape succesive prin expunerea la plasmă de radiofrecvență (RF) generată în diferite atmosfere (CO₂, N₂ și N₂/H₂), și immobilizarea ulterioară a imunoglobulinei G (IgG) direct sau prin intermediul proteinei A (prin adsorbție fizică sau legare covalentă – utilizând agenții de cuplare EDC+NHS). Știind faptul că proteina A poate lega selectiv IgG, complecși de tip antigen legat de IgG și IgM precum factori reumatoidici și complexe imune circulante, s-a realizat o immobilizare orientată a anticorpului pe suprafața polimerului sintetic.

VIII.4. Evaluarea immobilizării IgG pe PVDF prin tehnica de imagistică chimică în infraroșu apropiat (CI-NIR)

Spectrul NIR al probei N₂/IgG legată covalent (Figura VIII.3 – Spectrul 3) dezvăluie benzile de vibrație caracteristice IgG de la 2057 nm și 2185 nm și mai mult se observă că aceste benzi apar suprapuse peste cele ale proteinei A în cazul probei N₂/PrA legată covalent/IgG (Figura VIII.3 – Spectrul 2).

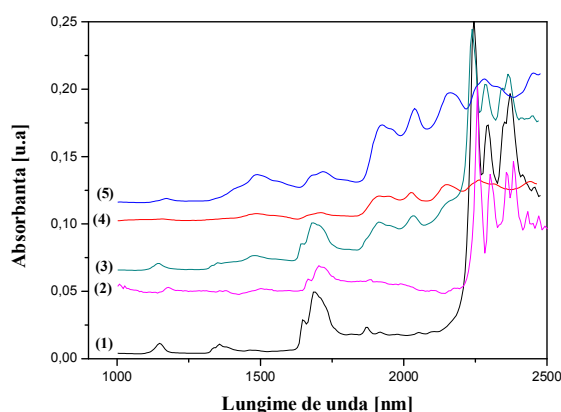


Figura VIII.3. Spectrele NIR pentru: (1) PVDF tratat în plasmă de N₂; (2) PVDF/N₂/PrA legată covalent/IgG; (3) PVDF/N₂/IgG legată covalent; (4) Proteina A; (5) Imunoglobulina G.

Omogenitatea și distribuția proteinelor pe suprafața PVDF sunt ilustrate în Figura VIII.4 (a) și (b). Din figură se evidențiază prezența imunoglobulinei G și a proteinei A pe suprafața PVDF, immobilizarea IgG mediată de proteina A și de asemenea formarea unor noi legături între aceste componente și suprafața PVDF prin apariția unui nou compus (necunoscut).

Cu ajutorul modelului PLS-DA a fost estimat conținutul de IgG depus pe suprafața PVDF și acesta a fost de $3,2 \% \pm 0,31$ în cazul imobilizării directe a IgG (Figura VIII.4(a)) și $22,02 \% \pm 0,13$ în cazul imobilizării IgG prin intermediul proteinei A. În ultimul caz conținutul de proteina A a fost estimat ca fiind $11,96 \% \pm 0,5$ (Figura VIII.4(b)). Când IgG este imobilizată direct pe suprafața substratului tratat în plasmă apare o componentă necunoscută în procent de 12,7%, care apare în urma interacțiunii substratului cu IgG.

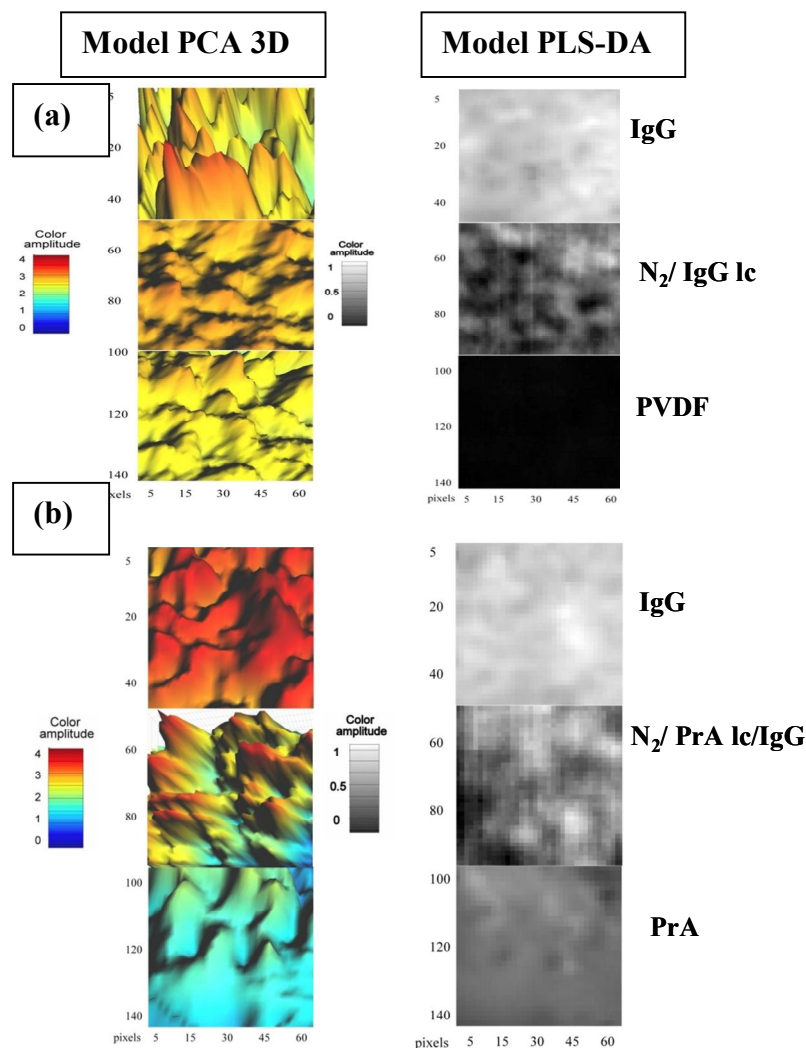


Figura VIII.4. Modelele PCA 3D și PLS-DA pentru probele: (a) N_2/IgG legată covalent și (b) N_2/PrA legată covalent/IgG. [Pâslaru et al. 2013 e-f]

VIII.5. Evaluarea imobilizării IgG pe suprafața PVDF prin XPS

Prin analiza spectrelor XPS în cazul imobilizării IgG prin intermediul proteinei A pe suprafața PVDF tratată în plasmă de N_2/H_2 s-a evidențiat cel mai mare conținut atomic procentual de azot pe suprafață – Tabel VIII.2. Se sugerează astfel că această probă prezintă cea mai mare cantitate de IgG depusă și că imobilizarea moleculelor de IgG pe suprafață prezintă o orientare de tip "ends-on" predominantă.

Tabel VIII.2. Compoziția atomică experimentală (% atomice) pentru suprafețele de PVDF modificate.

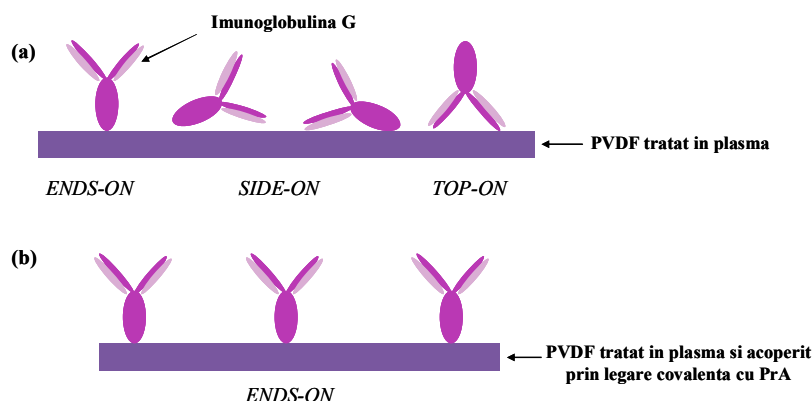
Proba	C (%)	F (%)	O (%)	N (%)	S (%)	F/C	O/C	N/C
PVDF	50,40	48,74	0,86	-	-	0,967	0,017	-
PVDF/CO ₂	53,73	43,24	2,38	0,42	-	0,804	0,044	0,007
CO ₂ /PrA ads	62,9	11,7	13,8	5,6	-	0,186	0,219	0,089
CO ₂ /PrA ads/IgG	63,83	0,37	19,03	11,36	0,05	0,005	0,298	0,177
CO ₂ /EDC+NHS/PrA	63,8	16,3	10,9	5,2	-	0,255	0,171	0,081
CO ₂ /EDC+NHS/PrA/IgG	57,48	0,39	24,71	11,84	0,10	0,006	0,429	0,205
PVDF/N ₂	66,13	16,65	13,35	2,32	-	0,25	0,200	0,035
N ₂ /PrA ads	66,27	3,06	20,24	4,74	-	0,046	0,305	0,067
N ₂ /PrA ads/IgG	54,05	0,16	25,35	10,91	0,17	0,003	0,469	0,201
N ₂ /EDC+NHS/PrA	70,6	9,5	11,3	4,4	-	0,134	0,160	0,06
N ₂ /EDC+NHS/PrA/IgG	60,78	-	16,52	14,04	0,25	0,000	0,271	0,230
PVDF/N ₂ /H ₂	65,26	8,65	15,56	4,33	-	0,132	0,238	0,066
N ₂ /H ₂ /PrA ads	57,6	20,1	14,2	1,7	-	0,348	0,247	0,0295
N ₂ /H ₂ /EDC+NHS/PrA	45,2	7,82	8,84	1,9	-	0,173	0,195	0,042
N ₂ /H ₂ /EDC+NHS/PrA/IgG	65,86	-	13,49	16,02	0,32	0,000	0,204	0,243

Imobilizarea orientată a imunoglobulinei G pe suprafața PVDF s-a evidențiat și cu ajutorul tehnicii QCM (microbalanță cu cristal de cuarț). Cristalele de cuarț acoperite cu PVDF și având imobilizat pe suprafață IgG, direct sau prin intermediul proteinei A, au fost testate pentru detecția unui antigen (o tulpină de *Salmonella typhimurium*). S-a observat că, cantitatea de *Salmonella* adsorbită în cazul probei modificate cu IgG prin intermediul proteinei A a fost de trei ori mai mare decât în cazul imobilizării directe a IgG pe substrat. Acest fapt sugerând o interacțiune specifică de legare anticorp-antigen îmbunătățită atunci când imobilizarea IgG este mediată de proteina A.

VIII.6. Caracterizarea suprafețelor modificate prin microscopie de forță atomică (AFM)

Întrucât lungimea și lățimea moleculei de IgG sunt diferite, o configurație orientată aleatoriu are ca rezultat modificarea topografiei suprafeței [Bae *et al.* 2008] comparativ cu cea a substratului polimeric (Schema VIII.4(a) *Adaptată din* [Schramm *et al.* 1993]).

Schema VIII.4. Stările teoretice în cazul imobilizării directe a imunoglobulinei G pe suprafața de PVDF tratată în plasmă (a) și prin intermediul proteinei A (b).



S-a găsit că rugozitatea suprafeței stratului de IgG depus pe substratul PVDF tratat în plasmă crește odată cu creșterea eficienței expunerii la plasmă în următoarea secvență $N_2/H_2 > N_2 > CO_2$, N_2/H_2 conducând la cele mai pronunțate modificări ale proprietăților de suprafață.

Compararea histogramelor obținute prin AFM pentru proba cu IgG imobilizată chimic pe substratul PVDF tratat în plasmă N_2/H_2 și pentru proba obținută prin intermediul proteinei A se observă că în primul caz suprafața este foarte heterogenă, cu o histogramă foarte largă pe când în cazul celei de-a doua suprafața este mult mai omogenă prezentând o histogramă a înălțimilor mult mai îngustă. În ultimul caz imobilizarea IgG realizându-se cu orientare specifică. [Pâslaru *et al.* 2013e]

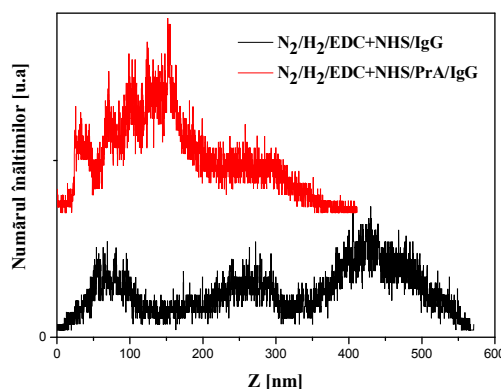


Figura VIII.10. Histogramele AFM pentru:

- (a) $N_2/H_2/EDC+NHS/IgG$;
- (b) $N_2/H_2/EDC+NHS/PrA/IgG$.

VIII.8. Concluzii

- Polimerul sintetic, poli(fluorura de viniliden), a fost utilizat în acest studiu ca și substrat pentru obținerea unui ansamblu proteic ce include proteina A care leagă specific porțiunea Fc a imunoglobulinei G.
- Tratamentul în plasmă generată în diferite atmosfere gazoase conduce la îmbunătățirea caracterului hidrofил al suprafeței și capacității de imobilizare a proteinelor. Datele FTIR-ATR și XPS au dovedit că tratamentul în plasmă de radiofrecvență utilizând N_2 and N_2/H_2

ca și gaze de descărcare pentru funcționalizarea suprafeței PVDF, prin implantarea de funcționalități în general nucleofile pe bază de azot, conduce la imobilizarea cu succes a imunoglobulinei G prin intermediul proteinei A.

- Atunci când IgG este imobilizată direct pe suprafața PVDF există prea multe posibilități de orientare a moleculelor pe suprafață, în schimb prin utilizarea proteinei A numărul acestor posibilități scade și imobilizarea se realizează într-o manieră specifică orientată.
- Studiile realizate au indicat o posibilă preferință a imobilizării IgG prin intermediul proteinei A pe substratul PVDF tratat în plasmă de N_2/H_2 cu o orientare de tip “ends-on”, în acest mod situsurile de legare ale antigenului rămânând libere. Imobilizarea orientată a imunoglobulinei G pe suprafața PVDF a fost evidențiată și cu ajutorul tehnicii QCM, prin captarea specifică a unei tulpine de *Salmonella typhimurium*.
- În concluzie, s-a elaborat un sistem multistrat receptiv la stimuli externi pe bază de PVDF și proteina A capabil să imobilizeze specific un anticorp, imunoglobulina G. Proprietățile piezoelectrice vor fi exploatate într-o lucrare viitoare.

CAPITOLUL IX. IMOBILIZAREA FIBRINOGENULUI PE SUPRAFAȚA POLI(FLUORUREI DE VINILIDEN) TRATATĂ ÎN PLASMĂ RECE DE RADIOFRECVENȚĂ

În studiul de față s-a realizat imobilizarea fibrinogenului pe suprafața PVDF, prin adsorbție fizică și legare covalentă mai întâi prin funcționalizarea la suprafață a polimerului prin expunerea la plasmă rece de radiofrecvență (RF) generată în diferite atmosfere gazoase (CO_2 , N_2 și N_2/H_2). Poli(fluorura de viniliden) este deja utilizată în culturile de celule datorită naturii hidrofobe însă prezintă dezavantajul adsorbției nespecifice a celulelor. Prin acoperirea cu fibrinogen s-a urmărit obținerea unui substrat cu caracteristici specifice îmbunătățite, cu utilitatea ulterioară în domeniul biomedical.

IX.2. Evaluarea depunerii de fibrinogen pe suprafața PVDF prin Imagistică Chimică în Infraroșu Apropiat (CI-NIR)

În cazul depunerii fibrinogenului prin adsorbție fizică (PVDF/ N_2 /Fb ads) spectrul NIR - Figura IX.2 - prezintă numai benzile de absorbție caracteristice substratului polimeric, în timp ce prin imobilizarea proteinei plasmatică cu ajutorul agenților de cuplare se evidențiază în spectru și benzile caracteristice fibrinogenului pe lângă cele ale substratului. În acest ultim caz realizându-se o acoperire legată covalent de substrat.

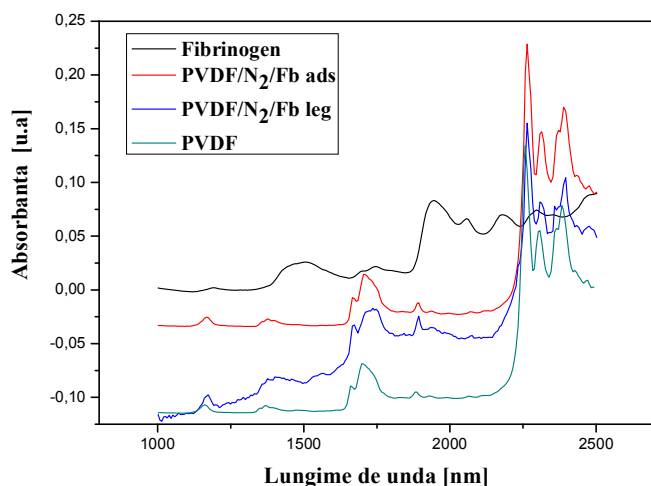


Figura IX.2. Spectrele NIR pentru: fibrinogen, proba de PVDF tratată în plasmă de N_2 ; substrat acoperit cu fibrinogen prin adsorbție fizică (PVDF/ N_2 /Fb ads) și prin imobilizare covalentă (PVDF/ N_2 /Fb leg).

Imaginea optică 3D creată pe baza absorbției diferite a componentelor probei în prezența luminii, pe baza modelului componentului principal identificat în probă (PCA) este prezentată în Figura IX.3.

Modelarea datelor optice a suprafețelor de PVDF modificate cu fibrinogen, conform predicției raportului între componenți realizat pe baza modelului PLS-DA, arată o distribuție uniformă a fibrinogenului pe suprafața polimerică numai în cazul imobilizării covalente a acestuia, după cum poate fi observat în Figura IX.3. În Tabelul IX.1 se prezintă conținutul procentual al fiecărei componente din probele tratate în plasmă de azot și acoperite cu fibrinogen

Tabel IX.1. Procentul fiecărei componente determinat în baza predicției PLS-DA. [Pâslaru *et al.* 2013 f]

Proba	PVDF (%)	Fibrinogen (%)	Compus nou (%)
PVDF/ N_2 /Fb ads	$95,85 \pm 0,13$	$3,96 \pm 0,07$	0,19
PVDF/ N_2 /Fb leg cov	$89,29 \pm 1,53$	$1,5 \pm 0,4$	5,7

Conform predicțiilor în baza modelului PLS-DA procentul de compus nou identificat în în cazul imobilizării chimice a fibrinogenului este mult mai mare sugerând apariția unor legături covalente noi între substratul tratat în plasmă de azot și fibrinogen.

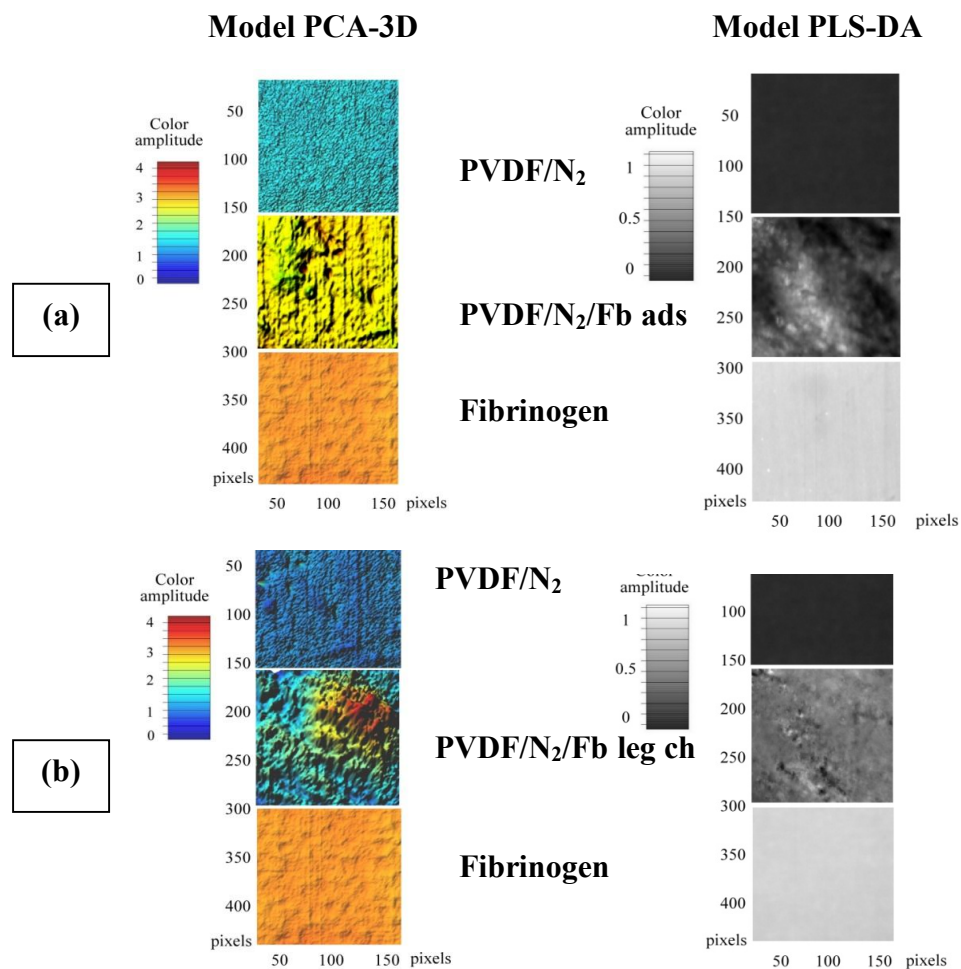


Figura IX.3. Modelele PCA-3D și PLS-DA pentru probele: proba de PVDF tratat în plasmă de N_2 și cu fibrinogen imobilizat pe suprafață prin adsorbție fizică (a) și legare covalentă (b). [Pâslaru *et al.* 2013 f]

IX.3. Determinarea prin XPS a compoziției chimice de suprafață

Pe baza spectrelor XPS generale s-a determinat conținutul atomic procentual al elementelor chimice prezente pe suprafața probelor -Tabelul IX.2.

Tabel IX.2. Compoziția atomică experimentală (% atomice) pentru suprafețele de PVDF modificate în plasmă și acoperite cu firbinogen. [Pâslaru *et al.* 2013 f]

Proba	C (%)	O (%)	N (%)	S (%)	F (%)
PVDF	50,40	0,86	-	-	48,74
PVDF/CO ₂	53,73	2,38	0,42	-	43,24
PVDF/CO ₂ /Fb ads	68,00	17,46	13,99	0,38	0,17
PVDF/CO ₂ /Fb lc	66,72	16,92	15,98	0,38	-
PVDF/N ₂	66,13	13,35	2,32	-	16,65
PVDF/N ₂ /Fb ads	67,39	18,22	14,04	0,35	-
PVDF/N ₂ /Fb lc	68,56	16,42	14,67	0,35	-
PVDF/N ₂ /H ₂	65,26	15,56	4,33	-	8,65
PVDF/N ₂ /H ₂ /Fb ads	67,44	17,03	14,93	0,30	0,30
PVDF/N ₂ /H ₂ /Fb lc	67,38	17,80	14,12	0,42	0,28

După tratamentul în plasmă, utilizând diferite gaze de descărcare, procentul de fluor de pe suprafața PVDF scade semnificativ fiind însoțit de creșterea procentelor de azot și oxigen.

După depunerea fibrinogenului pe suprafața PVDF tratată în diferite tipuri de plasmă (CO_2 , N_2 și N_2/H_2) se observă apariția semnalului datorat sulfului, caracteristic punților disulfidice create între lanțurile din structura fibrinogenului, demonstrând existența unui strat extern depus pe suprafața polimerului sintetic constituit din lanțurile de proteină plasmatică.

După acoperirea cu fibrinogen fluorul aproape dispare din spectrul XPS, sugerând că depunerea este uniformă și cu o grosime mai mare de 10 nm. Gradul de modificare cel mai pronunțat este evidențiat pentru substratul pretratată în plasmă de N_2 .

IX.4. Determinarea unghiului de contact

După tratamentul în plasmă unghiul de contact cu apa scade pentru toate probele în comparație cu filmul PVDF de referință, umectabilitatea suprafeței fiind mult îmbunătățită, datorită grupărilor funcționale polare care au fost inserate la suprafața polimerului- Figura IX.6. Se observă în toate cazurile o scădere a unghiului de contact comparativ cu cel al substratului nemodificat, prin urmare depunerea fibrinogenului contribuie la îmbunătățirea umectabilității suprafeței.

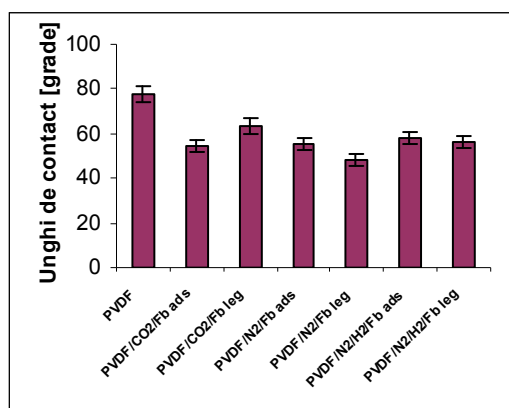


Figura IX.6. Variația unghiul de contact cu apa în cazul probelor acoperite cu fibrinogen. [Pâslaru et al. 2013 f]

IX.5. Investigarea morfologiei suprafeței prin AFM

Imaginile AFM 2D și 3D (inserate) - Figura IX.7 - pentru suprafețele de PVDF modificate cu fibrinogen certifică prezența unui nou strat proteic la suprafața substratului polimeric, cu evidențierea unor morfologii globulare prezentând conexiuni scurte între ele.

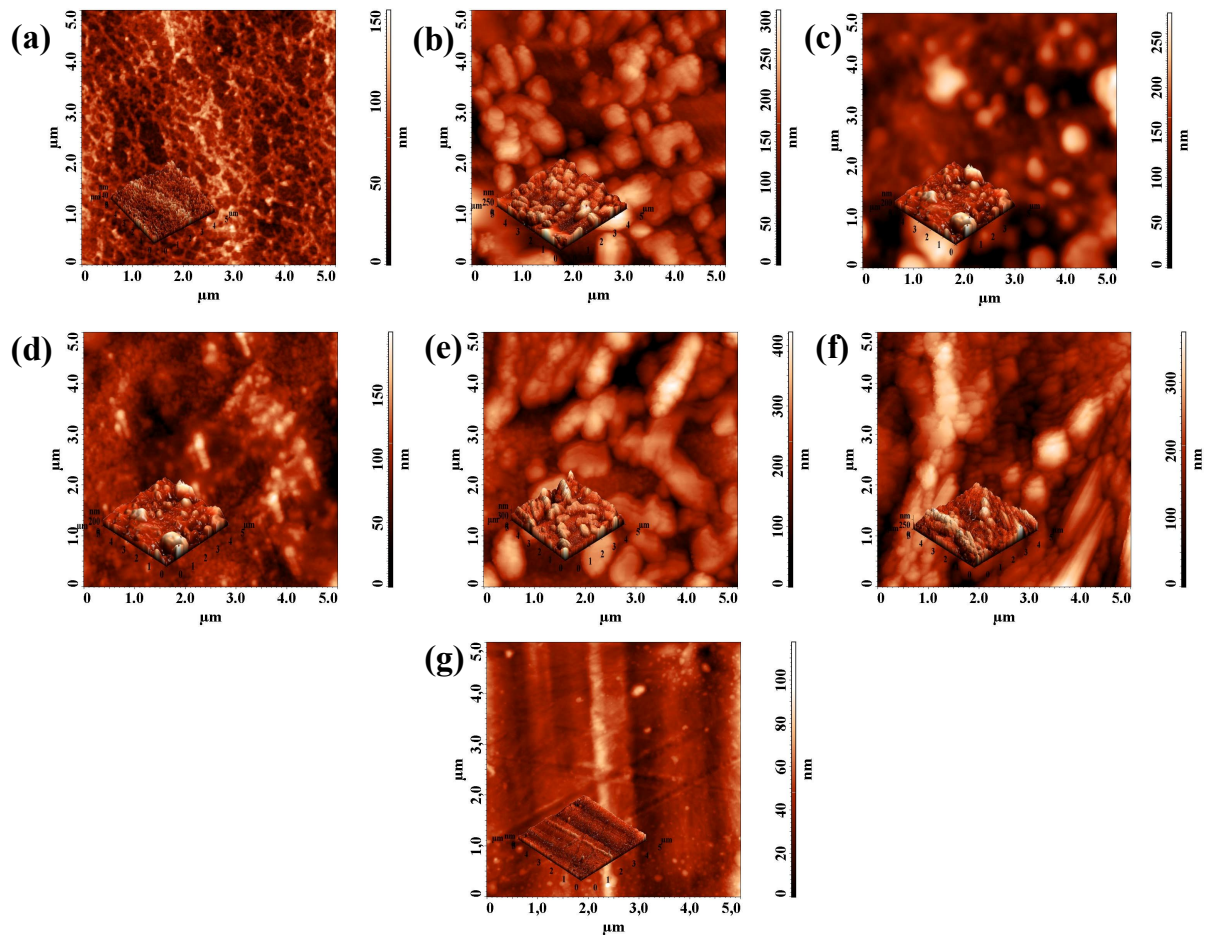


Figura IX.7. Imaginile AFM 2D (inserate cele 3D) pentru filmele de PVDF acoperite cu fibrinogen: (a) $\text{CO}_2/\text{Fb ads}$; (b) $\text{CO}_2/\text{Fb lc}$; (c) $\text{N}_2/\text{Fb ads}$; (d) $\text{N}_2/\text{Fb lc}$; (e) $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{Fb ads}$; (f) $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{Fb lc}$; (g) PVDF.

IX.6. Concluzii

- Plasma de radiofrecvență generată în diferite atmosfere gazoase s-a dovedit și în acest caz o metodă adecvată pentru implantarea de funcțiuni chimice la suprafața PVDF și utilizarea acestor pentru imobilizarea fibrinogenului.
- Acoperirea cu fibrinogen îmbunătățește proprietățile de suprafață ale substratului polimeric și prin utilizarea agenților de cuplare se obține o imobilizare ireversibilă a proteinei pe suprafață, cu un grad de modificare mai mare atunci când se utilizează plasma de azot.
- Aceste rezultate recomandă utilizarea substratului din poli(fluorură de viniliden) acoperit cu fibrinogen pentru aplicații biomedicale (în special pentru culturi de celule).

CAPITOLUL X. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE

Alegerea unei metode de tratare, potrivită pentru o anumită suprafață, depinde atât de natura chimică a acesteia, de caracteristicile fizice cât și de domeniul de aplicabilitate în care se dorește utilizarea ulterioară a acesteia. Fiecare din metodele de tratare de suprafață prezintă atât avantaje cât și dezavantaje. În acest sens, se poate apela la o metodă chimică, fizică, sau o utilizare combinată a celor două pentru a obține caracterul și proprietățile dorite de suprafață, încercând să se păstreze proprietățile de volum ale materialului.

Cercetările în domeniul modificării suprafeței pentru imobilizarea de compuși receptivi/daptivi sau bioactivi au ca scop dezvoltarea domeniului biomedical (organe, înlocuirea țesuturilor moi, noi formulări farmaceutice, etc.) dar și cel al biosenzorilor pentru detecția rapidă a agenților patogeni și precum și a celor biochimici. Interesul în acest domeniu crește continuu pe măsura descoperirii unor noi reactivi pentru bioconjugare. Tehnicile ideale de modificare a suprafeței vor fi cele care vor introduce un monostrat cu grupele funcționale dorite fără a cauza corodarea neregulată sau a produce deșeuri nedorite.

După natura stimulului sau a factorului extern la care răspund, suprafețele polimerice receptive se pot clasifica în:

- ✚ receptive la pH;
- ✚ receptive la temperatură (termoreceptive);
- ✚ receptive la câmpul electric;
- ✚ receptive la câmpul magnetic;
- ✚ receptive la forțe mecanice;
- ✚ receptive la prezența unor reactivi;
- ✚ receptive la anumiți compuși biologici.

Receptivitatea suprafețelor polimerice la stimuli biologici (de ex. pH, reducere-oxidare, enzime, glucoză, antigeni) și factori externi aplicați (de ex. temperatură, lumină, calitatea solventului) reprezintă un interes deosebit în diferite aplicații biomedicale precum eliberarea controlată de principii active, ingineria tisulară, diagnosticarea medicală și bioseparare.

CAPITOLUL IV

Pentru a diminua unele din dezavantajele polietilenei pentru utilizare în domeniul biomedical și alimentar s-a recurs la acoperirea cu chitosan a suprafeței acestui polimer sintetic, ce reprezintă o procedură care a condus la obținerea de suprafețe receptive la stimuli externi cu permeabilitate scăzută la gaze, cu proprietăți antibacteriene receptive la pH recomandabile de asemenea pentru aplicații în adsorbția controlată de proteine. S-a evidențiat imobilizarea covalentă a chitosanului pe

suprafața polietilenei prin utilizarea agenților chimici de cuplare, EDC și NHS, rezultând un strat de suprafață stabil chiar și la acțiunea unui pH puternic acid.

După acoperirea cu chitosan, funcția potențial zeta ($ZP = f(pH)$) prezintă o inversare a încărcării electrostatice spre valori pozitive și mai mult prezintă caracteristici amfotere tipice, deplasarea punctului izoelectric către regiuni de pH mai mare (spre domeniu bazic), apropiindu-se de valoarea pK a chitosanului. Micrografiile electronice de baleiaj au arătat că stratul de chitosan depus pe suprafața PE prin metodele de imersare și întindere este uniform și compact. În schimb, stratul depus prin electropulverizare prezintă o morfologie diferită, evidențiindu-se microparticule sferice distribuite aleatoriu pe suprafață.

Acoperirea cu chitosan a îmbunătățit proprietățile de barieră la oxigen a PE și de asemenea i-a conferit caracteristici antimicrobiene împotriva a două bacterii Gram-negative, și anume *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*, și o bacterie Gram-pozitivă, *Listeria monocytogenes*, rezultând un material foarte promițător pentru industria ambalajelor alimentare.

În cazul substratului de PE nu s-a observat o influență a pH-ului soluției asupra unghiului de contact. În timp ce, după depunerea chitosanului pe suprafața substratului polimeric se observă că prin modificare pH-ului de la valori acide la valori bazice unghiul de contact crește, prezentând un salt semnificativ în jurul valori de pH = 6, rezultând astfel o **suprafață receptivă/adaptivă la pH**.

CAPITOLUL V

Prin crearea de formulări pe bază de chitosan și vitamina E (VE) s-a combinat activitatea antibacteriană a polizaharidei cu funcțiile biologice și activitatea antioxidantă ale vitaminei E. Pentru depunerea amestecului bioactiv pe substratul polimeric s-a utilizat tehnica de electropulverizare pentru obținerea de materiale hibride.

Spectrele FTIR-ATR au evidențiat că interacțiunea dintre chitosan și vitamina E este în principal electrostatică și prin intermediul legăturilor de hidrogen. De asemenea, adaosul de vitamina E modifică proprietățile reologice ale chitosanului în soluție, prin scăderea vâscozității și modificarea comportamentului soluției de la unul de gel la unul de fluid normal. Modificarea caracteristicilor reologice a influențat și morfologia depunerilor obținute prin electropulverizarea amestecului chitosan/vitamina E pe substrat de PE.

Legarea ireversibilă a formulării de substrat a fost realizată prin pretratarea acestuia utilizând o tehnică fără solvenți, ecologică și anume descărcarea corona și ulterior imobilizarea covalentă a formulării bioactive utilizând diferiți agenți de cuplare (hidroclorura de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida și N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) și carbonildiimidazol (CDI).

Proba PEcor/EDC+NHS/CHT+VE prezintă cel mai mare conținut de grupări amino încărcate, acest rezultat fiind corelat și cu conținutul cel mai mare de azot determinat prin XPS.

Cu toate că s-a demonstrat prin diferite metode analitice că sistemul EDC+NHS este mai eficient ca și protocol de legare covalentă cel de-al doilea sistem, CDI, blochează mai puține grupări amino din amestecul bioactiv care sunt implicate în procesul de inhibare bacteriană.

Suprafețele noi obținute prezintă activitate antioxidantă, manifestând o dezactivare eficientă a radicalului liber 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Compozitele stratificate pe bază de PE/CHT+VE prezintă receptivitate la pH, răspuns de tip **suprafață hidrofیلă/hidrofobă**, ce poate fi exploatată în domeniul biomedical în special pentru culturi de celule.

Compozitele stratificate pe bază de polietilenă și amestec chitosan+vitamina E s-au testat ca și ambalaj bioactiv pentru carnea de pui tocată prin analiza senzorială, determinarea pH-ului, reacția cu hidrogen sulfurat (H₂S) și determinarea numărului total de germeni mezofili aerobici (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Proteus vulgaris* și *Yersinia enterocolitica*) înainte de ambalare cât și după 48 de ore de depozitare. Caracteristicile cărnii tocate ambalate în compozitele stratificate sunt superioare în comparație cu proba de control și a celei ambalate în folie de LDPE.

CAPITOLUL VI

Poli(fluorura de viniliden) a fost supusă la modificări succesive ale suprafeței prin tratament în plasmă de microunde utilizând diferite atmosfere, urmate de acoperirea cu albumina din serul bovin (BSA) prin adsorbție fizică directă.

Prin utilizarea spectroscopiei FTIR-ATR s-a demonstrat prezența grupărilor funcționale a BSA pe suprafața PVDF. Măsurătorile unghiului de contact cu apa și analiza AFM arată o creștere a caracterului hidrofیل după modificarea în două etape a suprafeței și scăderea heterogenității, în principal în cazul tratamentului în plasmă de microunde cu N₂/H₂ ca și gaz de descărcare, care este cea mai convenabilă modalitate de imobilizare a BSA. Tratamentul în plasmă de microunde a PVDF urmat de acoperirea cu BSA este foarte util pentru modificarea adecvată a proprietăților de suprafață, acest lucru conducând la o obținerea unei suprafețe receptive la pH precum și la o posibilă creștere a caracteristicilor de biocompatibilitate a PVDF hidrofob. Scopul acestor acoperiri receptive la pH este acela de a crea suprafețe biocompatibile pentru aplicații medicale (în special pentru controlul atașării/detașării celulelor de pe matrici solide).

CAPITOLUL VII

S-au elaborat două metode noi pentru funcționalizarea suprafeței polimerice care constau în imobilizarea proteinei A și triglicinei prin adsorbție fizică sau legare covalentă pe o suprafață de PVDF anterior tratată în plasmă de microunde generată în diferite atmosfere gazoase, precum CO₂, N₂ și N₂/H₂.

Tratamentul în plasmă de CO₂ al filmului de PVDF conduce la modificări de suprafață fizico-chimice, în principal prin încorporarea la suprafață de grupări acide, datorită interacțiunilor dintre suprafața polimerică și speciile reactive prezente în faza de plasmă (incluzând specii CO₂ în diferite stări energetice, metastabile, ioni, atomi și radicali), ceea ce induce o funcționalizare caracterizată de prezența grupărilor oxigenate pe suprafață.

Utilizând spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS) și în infraroșu (ATR-FTIR) s-a evidențiat formarea grupărilor COF, COOH și O=C- după tratamentul în plasmă de CO₂ și a grupărilor amidă și amină după activarea în celelalte două tipuri de plasmă și adsorbția fizică/legarea covalentă de proteine. Măsurătorile de unghi de contact cu apa au arătat o scădere graduală a unghiurilor de contact după adsorbția fizică/legarea covalentă a proteinelor, indicând o creștere a caracterului hidrofil în urma acestor două etape de modificare a substratului. S-a stabilit că TG a fost imobilizată mai bine pe suprafața activată în plasmă de N₂/H₂, pe când proteina A este imobilizată mai eficient pe suprafețele expuse în plasmă de CO₂ și N₂.

Proteinele imobilizate pe suprafața PVDF au prezentat activitatea așteptată de cuplare a anticorpului anti-*Escherichia coli* pentru detecția eficientă a microorganismului *Escherichia coli*, conform testelor de imunofluorescență. Procedura propusă în acest studiu prezintă potențial în elaborarea de biosenzori, în special utilizând proprietatea de piezoelectricitate a PVDF, care poate juca un rol clinic important.

Tratamentul în plasmă de microunde a PVDF, urmat de acoperirea cu triglicina și proteina A prin adsorbție fizică sau legare covalentă sunt eficiente pentru modificarea adecvată a proprietăților de suprafață a substratului polimeric, conducând la o posibilă îmbunătățire a caracteristicilor de biocompatibilitate ale acestuia.

CAPITOLUL VIII

A fost utilizat polimerul sintetic, poli(fluorura de viniliden), ca și substrat pentru obținerea unui ansamblu proteic ce include proteina A care leagă specific porțiunea Fc a imunoglobulinei G.

Datele FTIR-ATR și XPS au dovedit că tratamentul în plasmă de radiofrecvență utilizând N₂ and N₂/H₂ ca și gaze de descărcare pentru funcționalizarea suprafeței PVDF, prin implantarea de funcționalități în general nucleofile pe bază de azot (precum grupări aminice), conduce la imobilizarea cu succes a imunoglobulinei G prin intermediul proteinei A.

Atunci când IgG este imobilizată direct pe suprafața PVDF există prea multe posibilități de orientare a moleculelor pe suprafață, în schimb prin utilizarea proteinei A numărul acestor posibilități scade și imobilizarea se realizează într-o manieră specifică orientată. Studiile realizate au indicat o posibilă preferință a imobilizării IgG prin intermediul proteinei A pe substratul PVDF tratat în plasmă de N_2/H_2 cu o orientare de tip “ends-on”, în acest mod pozițiile de legare ale antigenului rămânând libere. Imobilizarea orientată a imunoglobulinei G pe suprafața PVDF a fost evidențiată și cu ajutorul tehnicii QCM, prin captarea specifică a unei tulpine de *Salmonella typhimurium*.

În concluzie, s-a elaborat un sistem multistrat receptiv pe bază de PVDF, și proteina A capabilă să imobilizeze specific un anticorp, imunoglobulina G.

CAPITOLUL IX

Având în vedere explorarea posibilității de imobilizare și a altor proteine pe suprafața poli(fluorurei de viniliden) tratată în plasmă de radiofrecvență, în acest capitol se discută despre imobilizarea unei proteine predominantă în plasma sangvină, fibrinogenul, cunsocându-se utilizarea acesteia cu succes în culturile celulare.

Utilizarea agenților de cuplare (EDC+NHS) pentru imobilizarea fibrinogenului pe substratul tratat în plasmă RF este absolut necesară, deoarece în cazul adsorbției fizice proteina este în mare parte îndepărtată de la suprafața substratului în etapa de spălare cu soluție tampon fosfat (pH 7,4).

Bibliografie selectivă

Bae Y.M., Oh B.-K., Lee W., Lee W.H., Choi J.-W. **2005**, Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer, 21:103.

Baican M., **Pâslaru E.**, Hitruc E.G., Vasile C., **2011a**, Albumin Immobilization On Polyvinylidene Fluoride Surfaces, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6(3):1053.

Balaban A.T., Baciu M., Pogany I.I. **1983**, *Applications of the Physical Methods in Organic Chemistry*, Ed. Stiintifica si Pedagogica: Bucharest.

Chen Y.M. Chung Y.C. Wang L.W. Chen K.T. S.Y.L **2002**, Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 37:1379.

Chen Z., Mo X., He C., Wang H. **2008**, Intermolecular interactions in electrospun collagen-chitosan complex nanofibers, *Carbohydrate Polymers* 72:410.

Munteanu B.S., **Pâslaru E.**, Fras Zemljic L., Sdrobiș A., Pricope G.M., Vasile C. **2013**, Chitosan coatings applied to polyethylene surface to obtain food-packaging materials, *Cellulose Chemistry and Technology*, in press.

Pascu M., Debarnot D., Durand S., Poncin-Epaillard F. **2005**, *Surface modification of PVDF by microwave plasma treatment for electroless metallization in Plasma Processes and Polymers*, d'Agostino R., Favia P., Oehr C., Wertheimer M.R., eds., Wiley-VCH, Weinheim, pp. 157-176.

Pâslaru E., Baican M.C., Hitruc E.G., Nistor M.T., Poncin-Epaillard F., Vasile C. **2013e**, Immunoglobulin G immobilization on PVDF surface, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.11.041.

Pâslaru E., Fras Zemljic L., Bračić M., Vesel A., Petričić I., Vasile C. **2013a**, Stability of a chitosan layer deposited onto a polyethylene surface, *Journal of Applied Polymer Science* 130(4):2444.

Pâslaru E., Hitruc G.E., Baican M.C., Coroaba A., Nistor M., Vasile C. **2013f**, *Imobilizarea imunoglobulinei G și a fibrinogenului pe suprafața poli(fluorurei de viniliden)*, Zilele Academice Ieșene, Iași, România, 4-5 Octombrie 2013.

Pâslaru E., Munteanu S.B., Sdrobiș A., Ioanid E.G., Coroaba A., Vasile C. **2013d**, *Procedures for surface modification of polymers*, POLYMAR Conference, Barcelona, Spain, 3-7 November 2013.

Pâslaru E., Tsekov Y., Munteanu S.B., Kotsilkova R., Vasile C. **2013b**, *Characterization by AFM and nano-indentation method of some stratified nanocomposites destined to food packaging*, International Workshop COST Action FA0904 "Characterisation, Mechanics and Performance of Innovative Polymer Nanomaterials for Food Packaging Application", Varna, Bulgaria, September 24-25 2013.

Pâslaru E., Munteanu B.S., Dumitriu R.P., Coroaba A., Drobotă M., Fras Zemljic L., Vasile C. **2013c**, Electro spraying deposition of stable dual-bioactive chitosan/vitamin e coating on low density polyethylene surface, *Food Hydrocolloids*, trimis spre publicare.

Saraswathy G., Pal S., Rose C., Sastry T.P. **2001**, A novel bio-inorganic bone implant containing deglued bone, chitosan and gelatin, *Bulletin of Materials Science* 24:415.

Schramm W., Paek S.-H., Voss G. **1993**, Strategies for the immobilization of antibodies, *Immunomethods* 3:93.

Vasile C., Baican M.C., Tibirna C.M., Tuchilus C., Debarnot D., **Pâslaru E.**, Poncin-Epaillard F. **2011b**, Microwave plasma activation of a polyvinylidene fluoride surface for protein immobilization, *Journal of Physics D: Applied Physics* 44:475303.

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ ÎN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

Rezultatele originale prezentate în teză au constituit baza a **7 articole științifice** publicate sau în curs de publicare în reviste internaționale sau naționale de profil cotate ISI, a unei lucrări publicate în volumul unei conferințe, precum și unui număr de **10 comunicări orale** și **12 postere** prezentate la diferite manifestări științifice naționale și internaționale de profil.

Articole publicate/în curs de publicare în reviste științifice internaționale sau naționale cotate

ISI:

1. M. Baican, **E. Pâslaru**, E.G. Hitruc, C. Vasile, **2011**, Albumin immobilization on polyvinylidene fluoride surfaces, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6(3):1053–1064; I.F = 1,09.

2. C. Vasile, M. Baican, C.M. Tibirna, C. Tuchilus, D. Debarnot, **E. Pâslaru**, F. Poncin-Epaillard. **2011**, Microwave plasma activation of a polyvinylidene fluoride surface for protein immobilization, *Journal of Physics D: Applied Physics* 44:475303; I.F = 2,53.
3. **E. Pâslaru**, L. Fras Zemljic, M. Bračić, A. Vesel, I. Petrinić, C. Vasile, **2013**, Stability of a chitosan layer deposited onto a polyethylene surface, *Journal of Applied Polymer Science* 130(4): 2444–2457; I.F = 1.4.
4. B.S. Munteanu, **E. Pâslaru**, L. Fras Zemljic, A. Sdrobiș, G.M. Pricope, C. Vasile, **2013**, Chitosan coatings applied to polyethylene surface to obtain food-packaging materials, *Cellulose Chemistry and Technology*, acceptat; I.F = 0,82.
5. R.N. Darie, A. Sdrobiș, **E. Pâslaru**, G. Pricope, A. Baklavaridis, S.B. Munteanu, I. Zuburtikudis, C. Vasile, **2013**, Effectiveness of chitosan as antimicrobial agent in LDPE/CS composite films as poultry minced meat packaging materials, *Cellulose Chemistry and Technology*, acceptat; I.F = 0,82.
6. **E. Pâslaru**, M.C. Baican, E.G. Hitruc, M.T. Nistor, F. Poncin-Epaillard, C. Vasile, **2014**, Immunoglobulin G immobilization on PVDF surface, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 115:139-149, DOI:10.1016/j.colsurfb.2013.11.041; I.F = 3,55.
7. **E. Pâslaru**, B.S. Munteanu, R.P. Dumitriu, A. Coroaba, M. Drobotă, L. Fras Zemljic, C. Vasile, **2013**, Electro spraying deposition of stable dual-bioactive chitosan/vitamin E coating, *Food Hydrocolloids*, trimis spre publicare.

Lucrări publicate în volumele unor conferințe

1. C. Vasile, **E. Pâslaru**, A. Sdrobis, G. Pricope, G.E. Ioanid, R.N. Darie, “Plasma assisted functionalization of synthetic and natural polymers to obtain new bioactive food packaging materials”, Report of the first RCM on *Application of Radiation Technology in Development of Advanced Packaging Materials for Food Products*, Vienna, Austria, 22-26 Aprilie (2013). http://www-naweb.iaea.org/napc/iachem/working_materials/F2-22063-CR-1-report.pdf

Co-autor în publicarea unei cărți:

C. Vasile, **E. Pâslaru**, M. Baican, *Aplicații ale polimerilor în domeniul biosenzorilor*, Editura „Gr. T. Popa” UMF, Iași, **2011**, ISBN: 978-606-544-075-3.

Comunicări în cadrul unor conferințe naționale și internaționale:

1. **E. Pâslaru**, C. Vasile, L. Fras-Zemljic, D. Constantinescu, G. Pricope, “Antimicrobial surface modification of polyethylene”, *International Workshop “Novel nanostructured*

- polymeric materials for food packaging and beyond*”, Espoo, FINLAND, September 15-16 (2011).
2. **E. Pâslaru**, M.C. Baican, E.G. Hitruc, F. Doroftei, C. Vasile, “Proteins immobilization onto poly(vinylidene fluoride) surface”, *Iasi Academic Days "Progress in Organic and Polymer Chemistry" XXIIIrd Edition*, 29 September-1 October (2011);
 3. M.C. Baican, **E. Pâslaru**, G. Hitruc, C. Vasile, “Albumin immobilization on polyvinylidene fluoride surface”, *The “Xth Romanian International Symposium on Cosmetic and Flavor Products”*, Iași, Romania, 31 May-3 June (2011).
 4. **E. Pâslaru**, C. Vasile, L. Fras-Zemljic, B.S. Munteanu, A. Coroaba, M. Bračić, D. Constantinescu, G.Pricope, “Covalent functionalization of PE surface with bioactive components designed for food contact application”, *International Workshop “Processing technology and functional properties of polymer nanomaterials for food packaging”*, Wrocław, Poland September 11-12 (2012).
 5. **E. Pâslaru**, B.S. Munteanu, A. Coroaba, G.E. Hitruc, M.C. Baican, C. Vasile, “(Bio)active layers deposition by electro spraying”, Conferința Facultății de Chimie, Zilele Universității ”Al. I. Cuza”, Iași, România, 25-27 Octombrie (2012).
 6. C. Vasile, **E. Pâslaru**, A. Sdrobis, G. Pricope, G.E. Ioanid, R.N. Darie, “Plasma assisted functionalization of synthetic and natural polymers to obtain new bioactive food packaging materials”, Report of the first RCM on *Application of Radiation Technology in Development of Advanced Packaging Materials for Food Products*, Vienna, Austria, 22-26 Aprilie (2013). http://www-naweb.iaea.org/napc/iachem/working_materials/F2-22063-CR-1-report.pdf.
 7. **E. Pâslaru**, G.E. Hitruc, M. C. Baican, A. Coroaba, M. Nistor, C. Vasile, *Imobilizarea imunoglobulinei G și a fibrinogenului pe suprafața poli(fluorurei de viniliden)*, Zilele Academice Ieșene, Iași, România, 4-5 Octombrie (2013).
 8. B.S. Munteanu, D. Macocinschi, **E. Pâslaru**, G.E. Hitruc, F. Doroftei, C. Vasile, *Depunerea de formulări biocompatibile pe substrat poliuiretanic prin electro spraying/electro spinning*, Zilele Academice Ieșene, Iași, România, 4-5 Octombrie (2013).
 9. **E. Pâslaru**, Y. Tsekov, S.B. Munteanu, R. Kotsilkova, C. Vasile, *Characterization by AFM and nano-indentation method of some stratified nanocomposites destined to food packaging*, International Workshop COST Action FA0904 “Characterisation, Mechanics and Performance of Innovative Polymer Nanomaterials for Food Packaging Application”, Varna, Bulgaria, September 24-25 (2013).

10. **E. Pâslaru**, S.B. Munteanu, A. Sdrobiș, E.G. Ioanid, A. Coroaba, C. Vasile, *Procedures for surface modification of polymers*, POLYMAR Conference, Barcelona, Spain, 3-7 November (2013).

Postere prezentate în cadrul unor conferințe naționale și internaționale:

1. **E. Pâslaru**, M.C. Baican, E.G. Hitruc, D. Debarnot, F. Poncin-Epaillard, C. Vasile, „SAM deposition of Protein A and Immunoglobulin G on PVDF surface”, *APME 2011 „IUPAC 9th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering”*, Cappadocia, TURKEY, September 5th - 8th (2011), p 221;
2. M.C. Baican, **E. Pâslaru**, F. Doroftei, C. Vasile, „Radio Frequency plasma activation of polyvinylidene fluoride surface for fibrinogen immobilization”, *APME 2011 „IUPAC 9th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering”*, Cappadocia, TURKEY, September 5th - 8th (2011), p 250.
3. C. Vasile, R.N. Darie, **E. Pâslaru**, L. Fras-Zemljic, D. Constantinescu, G. Pricope, „Polyolefins Antimicrobial Packaging”, *APME 2011 „IUPAC 9th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering”*, Cappadocia, TURKEY, September 5th - 8th (2011), p 251.
4. M.C. Baican, **E. Pâslaru**, C. Vasile, „Imobilizarea proteinelor pe suprafețe polimere”, „*Zilele Medicamentului ediția a XX-a*”, Iași, România, 19-21 Mai (2011).
5. A. Cojocariu, L. Profire, M.C. Baican, **E. Pâslaru**, C. Vasile, „Hidrogeluri nanocompozite chitosan/nanoargile modificate, de uz farmaceutic”, „*Zilele Medicamentului ediția a XX-a*”, Iași, România, 19-21 Mai (2011).
6. B.S. Munteanu, **E. Pâslaru**, G. Hitruc, M. C. Baican, C. Vasile, “Electrospraying of the chitosan/vitamin E formulations onto various substrates”, *International Workshop “Processing technology and functional properties of polymer nanomaterials for food packaging”*, Wrocław, Poland September 11-12 (2012), p. 37-39.
7. G. Pricope, C. Vasile, R.N. Darie, **E. Pâslaru**, B.S. Munteanu, “Testing of antioxidative and antimicrobial activity of some new food packagings”, Conferința Facultății de Chimie, *Zilele Universității ”Al. I. Cuza”*, Iași, România, 25-27 Octombrie (2012).
8. **E. Pâslaru**, D. Macocinschi, D. Filip, A. Sdrobiș, S.B. Munteanu, M. Lungu, D. Constantin, C. Zgardan, C.Vasile, *Membrane biocompatibile pe bază de poliuretan conținând diferiți compuși naturali și nanoparticule de argint*, *Zilele Academice Ieșene*, Iași, România, 4-5 Octombrie (2013).
9. A. Sdrobiș, R. Darie, **E. Pâslaru**, A. Baklavaridis, R.P. Dumitriu, C. Panayiotou, I. Zuburtikudis, C. Vasile, *Effect of nanoclay hydrophobicity on the PLA/clay nanocomposites*

- properties*, 10th International Conference on Nanosciences and Nanotechnologies, Thessaloniki, Greece, 9-12 July (2013).
10. C. Vasile, M. Lungu, D. Macocinschi, **E. Pâslaru**, R.P. Dumitriu, V. Coroiu, D. Constantin, *Polyurethane/Natural compounds-based composite materials containing silver nanoparticles*, NanotechItaly, Venice, Italy, 27-29 November (2013).
 11. A. Sdrobiș, R.N. Darie, **E. Pâslaru**, C. Vasile, M. Lungu, V. Coroiu, L. Moldovan, Poly (lactic acid) - based nanocomposites, NanotechItaly, Venice, Italy, 27-29 November (2013).
 12. Yu. Tsekov, P. Todorov, R. Kotsilkova, **E. Pâslaru**, C. Vasile, B. Munteanu, *Atomic force microscopy and nanoindentation techniques for fast and effective control over the structure and mechanical properties of electrospun nanofiber meshes*, International Workshop COST Action MP1206 "Electrospinning, Principles, Possibilities and Practice", London, UK, 5 – 6 December (2013).

Stagii de cercetare:

1. Universitatea Maine, Le Mans, Franța, în Laboratorul "Polimeri, Coloizi, Interfețe" coordonat de Prof. Dr. Fabienne Poncin-Epaillard, deplasarea a avut ca scop tratamentul în plasmă rece de radiofrecvență a unor substrate polimerice, perioada 1-28 Noiembrie 2010.
2. Universitatea din Maribor, Slovenia: perioada 8-28 Mai 2011 - STSM Topic: Studies on the obtaining of active and bioactive food packaging COST STSM Reference Number: COST-STSM-FA0904-8201; perioada 5-19 Iunie 2012 - stagiul s-a efectuat în cadrul proiectului EUREKA 295/2010, "Tehnologii noi de obținere a ambalajelor bioactive"; perioada 30 Iunie - 18 Iulie 2013 - mobilitatea s-a efectuat în cadrul proiectului „Functionalization of synthetic polymers for development of new antimicrobial packaging”, Programul: Capacități; FPSNewPack nr: 525/2012.
3. Institutul Tehnologic Educațional al Macedoniei de Vest, Kozani, Grecia, deplasarea efectuându-se în cadrul programului de cooperare bilaterală România-Grecia "Safe, Health-promoting, Green Food Packaging" Program CAPACITĂȚI, nr. 571/2012, perioada 14-23 Noiembrie 2012.
4. Institutul de Mecanică, Academia de Științe a Bulgariei, în cadrul Laboratorului European Deschis de Mecanică Experimentală pentru Micro- și Nanomateriale, sub conducerea Dr. Rumiana Kotsilkova, deplasarea realizându-se în cadrul Acțiunii COST FA0904, având ca scop investigarea prin tehnica AFM și de nanoindentare a unor compozite polimerice stratificate, în perioada 20-31 Mai 2013.

Membru în echipe de cercetare pentru proiecte naționale/internationale:

1. Proiect CNCSIS nr. 531/2009, cod ID_2541 (2009-2011): *Studii privind realizarea de biosenzori piezoelectrice folosind un substrat polimeric*; Coordonator: Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa", Iași; director de proiect: Prof. Dr. Mihaela C. Baican,.
2. Program PN-II-PT-PCCA, proiect BIONANOMED nr. 164/2012: *Antimicrobial Bionanocomposites for Medical Applications*, Coordonator: Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni", Iași; director de proiect CSI Dr. Cornelia Vasile.
3. Program CAPACITĂȚI, nr. 571/2012, *Safe, Health-promoting, Green Food Packaging*, Colaborare bilaterală între Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni", Iași, România și Institutul Tehnologic Educațional al Macedoniei de Vest, Kozani, și Universitatea Aristotel, Salonic, din Grecia; responsabil proiect partea română CSI Dr. Cornelia Vasile.
4. Program Capacități; FPSNewPack nr: 525/2012, *Functionalization of synthetic polymers for development of new antimicrobial packaging*, colaborare bilaterală între Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni", Iași și Universitatea Maribor, Slovenia; responsabil proiect partea română CSI Dr. Cornelia Vasile.
5. EUREKA E! 4952 (2010-2012), *New technologies for obtaining bioactive packaging (BIOPACKAGING)*, Coordonator: AMCSIT-Politehnica Bucuresti.
6. IAEA - 17689 (2013-2014), *Ionizing Radiation and Plasma Discharge Mediating Covalent Linking of Stratified Composites Materials for Food Packaging*, proiect finanțat de Agenția Internațională de Energie Atomică, Viena, Austria; director de proiect CSI Dr. Cornelia Vasile.
7. Acțiunea COST FA0904; *Eco-sustainable food packaging based on polymer nanomaterials*.

Cerere de brevet de invenție:

1. "Procedeu și compoziție de obținere a unor compozite stratificate", Nr. A/00132/2013, autori: **Elena Pâslaru**, Bogdanel Silvestru Munteanu, Dumitriu Raluca Petronela, Cornelia Vasile.

Premii și distincții:

1. Premiul I pentru cea mai bună prezentare orală: "Proteins immobilization onto poly(vinylidene fluoride) surface", autori **E. Pâslaru**, M.C. Baican, E.G. Hitruc, F. Doroftei, C. Vasile, *Iasi Academic Days "Progress in Organic and Polymer Chemistry" XXIIIrd Edition*, 29 September-1 October (2011).

2. Premiul I pentru cel mai bun poster: „Imobilizarea proteinelor pe suprafețe polimere”, M.C. Baican, **E. Pâslaru**, C. Vasile, „*Zilele Medicamentului ediția a XX-a*”, Iași, România, 19-21 Mai (2011).

