

ACADEMIA OAMENILOR DE ȘTIINȚĂ DIN ROMANIA



VALORIFICAREA POLIMERILOR TERMOPLASTICI – RECICLATI

Membrane nanostructurate pe baza de PET reciclat si nanostructuri biologice active

Dr.Ing. Alexandru-Mihai GRUMEZESCU

2017



CUPRINS

Obiective Generale.....	4
Obiective Specifice	4
1. Introducere	5
2. Materiale si Metode	6
2.1. Materiale	6
2.2. Metode de obtinere	6
2.2.1. Obtinerea de membrane nanostructurate pe baza de PET reciclat	6
2.2.2. Obtinerea de membrane pe baza de PET si nanoparticule de argint	7
2.2.3. Obtinerea de membrane pe baza de PET si nanoparticule de magnetita functionalizate cu acid usnic.....	8
2.2.4. Obtinerea de membrane pe baza de PET si nanoparticule de oxid de zinc.....	8
2.3. Metode de caracterizare	8
2.3.1. Microscopia de Infrarosu	8
2.3.2. Difractia de Raze X.....	8
2.3.3. Microscopia Electronica de Baleiaj	9
2.3.4. Microscopia Electronica prin Transmisie Difractia de Electroni pe Arie Selectata.....	9
2.3.5. Proliferarea celulara - MTT assay (Vybrant MTT cell Proliferation Assay kit, Molecular Probe)	9
2.3.6. Protocol de lucru pentru evaluarea stresului oxidativ (GSH-Glo™ Glutathione Assay, Promega) 10	
2.3.7. Cresterea microorganismelor planctonice (plutitoare) in prezenta materialelor	10
2.3.8. Evaluarea aderentei si a formarii de biofilme	11
2.3.9. Evidentierea rezistentei la biodegradare	11
3. Rezultate si Discutii	12
3.1. Caracterizari fizico-chimice	12
3.1.1. Membrane pe baza de PET si nanoparticule de magnetita functionalizate cu acid usnic 12	
3.1.2. Membrane pe baza de PET si nanoparticule de argint	14
3.1.3. Membrane pe baza de PET si nanoparticule de oxid de zinc	17
3.2. Caracterizari biologice	19
3.2.1. Profilul microbiologic si fungic	19
3.2.2. Profilul citotoxic	25
4. Concluzii	27
5. Diseminare stiintifica	27



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

5.1.	Articole	27
5.2.	Carti.....	27
5.3.	Participari la conferinte interantionale.....	28
6.	Bibliografie	28



Obiective Generale

Proiectul are ca obiectiv major identificat valorificarea unor deșeuri polimerice și implicit, eliminarea unor deșeuri din natura prin reintroducerea acestora într-un ciclu de producție cu valoare adăugată ridicată, în special prin comparare cu valorificarea prin incinerare. Proiectul se va finaliza astfel prin identificarea și realizarea unor tehnologii de reciclare și a unor produse cu valoare adăugată mare cu aplicații non-medicale diverse – inclusiv ambalaje active.

Obiective Specifice

- realizarea unor tehnologii de reciclare și reutilizare a polimerilor termoplastici;
- dezvoltarea unor tehnologii de obținere a unor produse cu valoare adăugată superioară, în special comparativ cu valorificarea prin incinerare a acestora;
- dezvoltarea de produse finite cu aplicații în industria alimentară – ambalaje clasice și ambalaje active/antimicrobiene, industria auto, aerospațială, etc.;
- compatibilizarea polimerilor termoplastici reciclați cu fibre naturale/sintetice în vederea obținerii de materiale cu proprietăți mecanice, termice, etc. îmbunătățite;
- caracterizarea adecvată a precursorilor și a produselor finite dezvoltate;
- creșterea vizibilității colectivului de lucru și a AOSR prin publicarea de articole și participarea la conferințe de profil.



1. Introducere

Reciclarea reprezintă procesul de transformare a deșeurilor sau a unor reziduuri în materiale și obiecte noi cu ajutorul unor lanțuri tehnologice dezvoltate în acest scop.

Până în prezent, complexitatea reciclării unui produs era stabilită în funcție de amestecul de materiale din care acesta era confecționat. Un produs realizat din mai multe materiale este de obicei dezmembrat fiind necesară separarea materialelor înainte de reciclare, multe produse fabricate încadrându-se în această categorie. De exemplu, un telefon mobil sau o placă video pot fi fabricate din numeroase materiale de la plastic la metale comune și metale prețioase. Aceste produse sunt complexe comparativ cu sticlele din plastic, care sunt fabricate în mod normal din plastic (96%) având etichetă de hârtie sau plastic (4%). Cu cât sunt utilizate mai multe materiale la fabricarea produsului, cu atât devine mai complexă separarea acestora [1].

Polietilen tereftalatul (PET) este cel mai utilizat material la nivel mondial pentru fabricarea sticlelor de apă și băuturi răcoritoare. Acest material este utilizat datorită proprietăților excelente precum rezistența la rupere și greutatea foarte scăzută a recipientelor comparativ cu cele fabricate din sticlă având același volum. În comparație cu alți polimeri folosiți pentru ambalare, PET are, de asemenea, o transparență ridicată, și servește de asemenea ca barieră împotriva umidității și oxigenului. În consecință, PET a înlocuit cu succes sticla și materialele metalice. În zilele noastre, sticlele realizate din PET sunt folosite pentru băuturi răcoritoare, apă minerală, băuturi energizante, ceaiuri de gheață, precum și pentru băuturi alcoolice cum ar fi berea și vinul [2].

Pentru o perioadă lungă de timp, reciclarea materialelor pentru ambalare post-consumabile și refolosirea acestora era posibilă numai pentru recipiente și borcane din sticlă, dar și pentru cutii metalice. Pentru materialele de ambalare realizate din polimeri nu a fost posibilă reciclarea și refolosirea în domeniul alimentar din cauza lipsei informațiilor cu privire la contaminare polimerilor în urma primei utilizări. În plus, eficiența decontaminării proceselor de reciclare a fost, în majoritatea cazurilor, necunoscută. Prin urmare, legislația a interzis mult timp refolosirea acestor materiale pentru ambalarea produsele alimentare. Principala problemă este că substanțele din băuturi, precum și compușii periculoși ce se găsesc în agenții de curățare pentru uz casnic ar putea fi absorbiți în polimer. Dacă în timpul reciclării acești poluanți absorbiți după consumare nu sunt îndepărtați din polimerul folosit pentru fabricarea ambalajului, aceștia ar putea migra în alimente. În plus, aditivii care nu sunt aprobați pentru materialele de ambalare pentru alimente pot intra în fluxul tehnologic de



ambalare a produselor alimentare dacă materialele de ambalare a produselor nealimentare realizate din același tip de polimer au fost, de asemenea, recoltate și reciclate împreună cu materialele de ambalare alimentare [2].

Potrivit statisticilor realizate de Petcore, rata de reciclare a PET-urilor la nivel european în 2014 a fost de 57%, fiind foarte mare comparativ cu alte materiale plastice. Procesul de reciclare PET este alcătuit din mai multe etape: colectarea, sortarea și reprocesarea într-un produs. Colectarea PET în Europa este reglementată de Directiva Uniunii Europene privind ambalajele și deșeurile de ambalaje (2004/12 / CE). Această directivă prevede că fiecare stat membru trebuie să instituie o schemă de colectare, dar este liber să aleagă metoda cea mai potrivită. Metodele de colectare existente sunt colectarea de tip *curbside*, transportarea în locuri speciale sau realizarea unui sistem de reîncărcare și depozitare. Factorii importanți în acest flux sunt reprezentați de cantitățile globale de colectare și cantitatea de contaminare. Fiecare sistem are avantajele și dezavantajele sale. Între diferitele state membre, cantitățile colectate diferă destul de mult [3].

După colectare, PET-ul este sortat fiind separat de celelalte deșeuri de plastic contaminante (HDPE, PVC etc.) prin sortarea manuală sau prin sistemele automate și apoi comprimat în baloturi pentru a fi mai ușor de transportat. În cele din urmă, PET-urile sunt reprocesate în produse noi, în principal fiind utilizate ca produse de ambalare (sticle și recipiente), dar pot fi transformate și în fibre putând fi folosite pentru noi aplicații. Aceste fluxuri tehnologice de reprocesare a PET-urilor trebuie să fie cât mai curate posibil pentru a evita contaminările, ceea ce duce în mod inevitabil la o scădere a proprietăților finale sau la dificultăți în reprocesare [3].

2. Materiale si Metode

2.1. Materiale

Materialele prime si solventii utilizati au fost de puritate ACS. Exceptie face PET-ul care a fost procurat din comert, fiind ambalajul unei sticle de suc carbogazos.

2.2. Metode de obtinere

2.2.1.Obtinerea de membrane nanostructurate pe baza de PET reciclat

Pentru obtinerea de membrane nanostructurate pe baza de PET reciclat s-a utilizat metoda *electrospinning*. Aceasta metoda a permis obtinerea de membrane formate dintr-o retea fibroasa, cu fibre interconectate, suprapuse si distribuite aleator.



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

Membranele pe baza de PET (reciclat, utilizate in experimente ca si control) au fost obținute prin dizolvarea a 1g de PET provenit dintr-un ambalaj de suc carbogazos, într-o soluție de 20 mL clorură de metilen si 2 mL acid trifloroacetic. Soluția a fost omogenizată prin intermediul unui agitator magnetic.

Soluția de PET de concentrație 4.54% a fost depusă prin intermediul tehnicii *electrospinning* pe suport de aluminiu.

Experimetul a fost realizat la 4 debite de depunere diferite: 10mL/h, 7.5mL/h, 5mL/h și 2.5mL/h. Iar parametrii aparatului pentru cele 4 variante experimentale au fost:

-output1: -5,73KV

-output2: 17.53KV

-încalzire: 0.6KW

-umiditate: 35%

-temperatură: 27°C

Probele obținute in urma depunerii prin intermediul tehnicii *electrospinning* au fost indepartate de pe suprafata suportului de aluminiu și sectionate in fragmente cu dimensiunea de 1cm x 1cm.

Membranele pe baza de PET reciclat, au fost ulterior utilizate ca suport pe suprafata carora au fost depuse 3 tipuri de nanoparticule: nanoparticule de magnetita functionalizate cu acid usnic, nanoparticule de argint si nanoparticule de oxid de zinc (experimentele realizandu-se la cele 4 debite menționate anterior, obtinandu-se 12 variante experimentale.

-PET@nanoAg (10mL/h, 7.5mL/h, 5mL/h și 2.5mL/h)

-PET@Fe₃O₄@UA (10mL/h, 7.5mL/h, 5mL/h și 2.5mL/h)

-PET@ZnO (10mL/h, 7.5mL/h, 5mL/h și 2.5mL/h)

2.2.2.Obtinerea de membrane pe baza de PET si nanoparticule de argint

Au fost obținute 2 soluții, una de azotat de argint 0.1% (0.1g AgNO₃ + 99.9 mL H₂O) și una de agent reducător (300mL H₂O + 3g NaOH + 1g D-glucoză). Sectiunile de 1cm x 1cm



de PET au fost introduse în soluția de AgNO_3 și lasate timp de 10 minute sub agitare energica, ulterior au fost scoase și imersate în soluția de agent reducător același interval de timp. Probele astfel obținute au fost spălate cu apă distilată și lăsate la uscat la temperatura camerei.

2.2.3.Obținerea de membrane pe baza de PET și nanoparticule de magnetita funcționalizate cu acid usnic

Au fost preparate 2 soluții, soluția 1 - FeCl_3 și FeSO_4 (prin omogenizarea a 1g de FeCl_3 și 1.6g de FeSO_4 în 300mL de H_2O) și soluția 2 - NH_3 și acid usnic (prin dizolvarea a 0.1g de acid usnic în 300 de mL de H_2O și 9mL NH_3 - 28%). Secțiunile de 1cm x 1cm de PET au fost introduse în soluția 1 și lasate timp de 10 minute sub agitare energica, ulterior au fost scoase și introduse în soluția 2 același interval de timp. Probele astfel obținute au fost spălate cu apă distilată și lăsate la uscat la temperatura camerei.

2.2.4.Obținerea de membrane pe baza de PET și nanoparticule de oxid de zinc

Au fost preparate 2 soluții, soluția 1 de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (prin dizolvarea a 3g de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ în 97 de mL de alcool metilic) și soluția 2, de NaOH (prin dizolvarea a 3g NaOH în 97mL de H_2O). Secțiunile de PET au fost introduse în soluția 2 și lasate timp de 10 minute sub agitare magnetica, ulterior au fost scoase și introduse în soluția 1 pentru același interval de timp. Probele astfel obținute au fost lăsate la uscat la temperatura camerei.

2.3. Metode de caracterizare

2.3.1.Microscopia de Infraroșu

Hărțile în infraroșu au fost efectuate cu un microscop Nicolet iN10 MX FT-IR cu un detector MCT răcit cu nitrogen lichid cu intervalul de măsurare între 4000 - 700 cm^{-1} . Colectarea spectrelor s-a făcut în modul de reflexie la o rezoluție de 4 cm^{-1} . Pentru fiecare spectru, 32 de scanări au fost co-adăugate și convertite în absorbanță folosind software-ul OmnicPicta (Thermo Scientific).

2.3.2.Difractia de Raze X

Difrakția de raze X cu incidență razantă (GIXRD) s-a realizat cu un difractometru PANalytical Empyrean folosind radiația CuK ($\lambda = 1.541874\text{\AA}$), echipat cu un monocromator hibrid 2 x GE (2 2 0) pentru Cu și un colimator cu plăci paralele pe detectorul PIXcel3D.



Scanarea s-a efectuat pe axa 2θ în intervalul de $5-80^\circ$ cu un unghi de incidență de 0.5° , cu dimensiunea pasului de 0.04° și timpul pentru fiecare pas de 3 secunde

2.3.3. Microscopia Electronica de Baleiaj

În scopul investigării morfologiei și dimensiunii membranelor nanostructurate, probele au fost introduse în incinta de analiză a unui microscop electronic de baleiaj achiziționat de la compania FEI (Oregon, Statele Unite ale Americii), imaginile obținute fiind realizate prin înregistrarea fasciculului de electroni secundari rezultat, cu energie de 30 keV.

2.3.4. Microscopia Electronica prin Transmisie | Difractia de Electroni pe Arie Selectata

În scopul obținerii imaginilor de microscopie electronică prin transmisie, probele au fost amplasate pe o grilă de cupru acoperită cu carbon, la temperatura camerei. Obținerea imaginilor TEM a fost posibilă prin analizarea probei cu ajutorul unui microscop electronic prin transmisie de înaltă rezoluție de tip Tecnai™ G2 F30 S-TWIN echipat cu SAED, achiziționat de la compania FEI (Oregon, Statele Unite ale Americii). Acest microscop funcționează în modul de transmisie la o tensiune de 300 kV, rezoluția punctuală și cea de linie garantate având valorile de 2 Å, respectiv 1 Å.

Analiza SAED pentru nanoparticulele de magnetită a fost efectuată în câmp luminos cu ajutorul microscopului electronic de înaltă rezoluție model Tecnai™ G2 F30 S-TWIN echipat cu SAED, achiziționat de la compania FEI (Oregon, Statele Unite ale Americii).

2.3.5. Proliferarea celulara - MTT assay (Vybrant MTT cell Proliferation Assay kit, Molecular Probe)

Pe baza acestei metode colorimetrice cantitative se permite aprecierea proliferarii, viabilitatii si citotoxicitatii celulare. Metoda se bazeaza pe reducerea unei saruri de tetrazoliu galbene MTT (bromura de 3-(4,5-dimetiltiazoliu)-2,5-difeniltetrazoliu) la formazan de culoare albastru-închis. Reducerea realizata de enzime mitocondriale (în special succinat dehidrogenaza) este un indiciu al integritatii celulare/mitocondriale. Formazanul insolubil în apa poate fi solubilizat cu izopropanol, dimetilsulfoxid sau alt solvent organic. Densitatea optica (DO) a formazanului solubilizat este evaluata spectrofotometric, obtinandu-se o functie absorbanta-concentratie colorant-numar de celule active metabolic din cultura. AFSC se cultiva în placute cu 96 de godeuri, având o densitate de însamantare de 3000 celule /godeu în diferite conditii experimentale. Ulterior s-a adăugat 10 μ l 12 mM MTT și s-a incubat la 37°C timp de 4 ore. Se adaugă ulterior 100 μ l solutir SDS-HCl, și se pipeteaza



energic pentru solubilizarea cristalelor de formazan. Se incubeaza 1 ora, apoi se pipeteaza pentru omogenizare si se elimina bulele pentru a nu interfera cu citirea. Se citeste la spectrofotometru la 570 nm (TECAN, Männedorf, Switzerland).

2.3.6. Protocol de lucru pentru evaluarea stresului oxidativ (GSH-Glo™ Glutathione Assay, Promega)

Celulele AFSC (celule stem mezenchimale izolate din lichid amniotic) se insamanteaza la o densitate de 3000 celule in 300 μ l mediu de cultura DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin si 1 % antibiotice (penicilina, streptomicina/neomicina) in placute cu 96 godeuri. La 24 de ore de la insamatare celulele se trateaza cu biomateriale. Stresul oxidativ a fost evaluat utilizand kitul GSH-Glo™ Glutathione Assay kit. Acest kit dozeaza cantitatea de glutatation, un agent antioxidant. Glutatationul produs de celule este transformat de glutatation S-transferaza in glutatation oxidat, cantitatea de glutatation transformat fiind direct proportionala cu cantitatea de enzima glutatation S-transferaza care transforma glutatationul legat cu un precursor de luciferina in glutatation oxidat legat cu luciferina care emite lumina. Cu cat lumina este mai intensa cu atat s-a transformat mai mult glutatation, deci s-a sintetizat mai mult glutatation, deci celula a fost mai stresata. Protocolul de lucru a constat in adaugarea a 100 μ L 1X GSH-Glo™ Reagent si incubarea la 37°C timp de 30 de minute. Apoi s-a adaugat 100 μ l Luciferin Detection Reagent si s-a incubat la 37°C pentru inca 15 de minute. La finalul celor 15 min se omogenizeaza bine mediul din godeurile cu celule si apoi placuta se citeste la luminometru.

2.3.7. Cresterea microorganismelor planctonice (plutitoare) in prezenta materialelor

Pentru testarea efectului materialelor obtinute asupra cresterii microorganismelor in mediu lichid (culturi planctonice), materialele obtinute au fost taiate la dimensiunile de 1cm/1cm si sterilizate prin expunere la radiatii UV timp de 30 min pe fiecare parte. Cate un fragment de material steril a fost depus individual intr-un godeu al unei placi cu 6 godeuri sterile. Peste materialele depuse, in godeuri s-au adaugat 2 mL mediu lichid (bullion simplu pentru bacterii si YPG lichid pentru levuri) si ulterior 20 μ L suspensie microbiana de densitate 0.5 McFarland (bacterii) sau 1McFarland (levuri), pregatita in AFS (apa fiziologica sterila, sol NaCl 0,9%). Placile cu 6 godeuri astfel pregatite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. Dupa expirarea timpului de incubare 200 μ L din suspensiile microbiene obtinute au fost



trasferati in placi cu 96 godeuri sterile si turbiditatea culturilor microbiene (absorbanta) a fost masurata spectrofotometric la 600nm.

2.3.8.Evaluarea aderenței și a formării de biofilme

Pentru testarea efectului materialelor fibrilare obtinute asupra capacității de aderență și a producerii de biofilme, materialele obtinute au fost taiate la dimensiunile de 1cm/1cm și sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 20 min pe fiecare parte. Cate un fragment de material steril a fost depus individual într-un godeu al unei placi cu 6 godeuri sterile. Peste materialele depuse, în godeuri s-au adăugat 2 mL mediu lichid (bullion simplu) și ulterior 20 μ L suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland sau 1McFarland (levuri), pregătită în AFS (apa fiziologică sterilă, sol NaCl 0,9%). Placile cu 6 godeuri astfel pregătite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. După incubare materialele au fost spălate cu AFS și mediul a fost schimbat, pentru dezvoltarea biofilmelor dezvoltate pe acestea. Placutele au fost incubate pentru diferite perioade de timp (24, 48 și respective 72h), pentru evidențierea capacității de aderență și formare de biofilme a microorganismelor. După expirarea fiecărei perioade de incubare luate în calcul, esanționul pe care s-a dezvoltat biofilmul a fost spălat cu AFS și depus într-un tub steril într-un mL AFS. Tubul a fost vortexat energic timp de 30 sec și sonicat 10 sec pentru desprinderea celulelor din biofilm. Suspensia celulară obținută a fost diluată și diferite diluții au fost însămânțate pe placi cu mediu de cultură solidificat în vederea obținerii și cuantificării numărului de unități formatoare de colonii.

2.3.9.Evidențierea rezistenței la biodegradare

Pe suprafața mediului YPG agarizat repartizat în placi Petri ($\varnothing = 10$ cm) s-a însămânțat “în pânză” un inocul standardizat reprezentat de o suspensie sporală constituită din spori de *A. niger* în AFS suplimentat cu 1% Tween 80. În centrul fiecărei placute Petri inoculată în panza cu suspensia sporală s-a adăugat cate un fragment de material obținut (dimensiuni: 1cm/1cm, sterilizat în prealabil) și placutele s-au incubat la temperatura camerei timp de 4 săptămâni, cu inspectare săptămânală pentru observarea aspectului esanțioanelor testate în prezența culturilor fungice.



3. Rezultate si Discutii

3.1. Caracterizari fizico-chimice

3.1.1. Membrane pe baza de PET si nanoparticule de magnetita functionalizate cu acid usnic

Membranele nanostructurate obtinute prin electrospining, si ulterior impregnate cu nanoparticule de magnetita functionalizate cu acid usnic au fost caracterizate prin diverse tehnici fizico-chimice, cum ar fi XRD, SEM, TEM si FT-IR.

In figura 1, este prezentata difractograma de raze X inregistrata pentru PET@Fe₃O₄@AU. Se observa o singura faza cristalina cu interferente de difractie caracteristice magnetitei. Se observa o cristalinitate redusa a probei, datorita prezentei PET-ului.

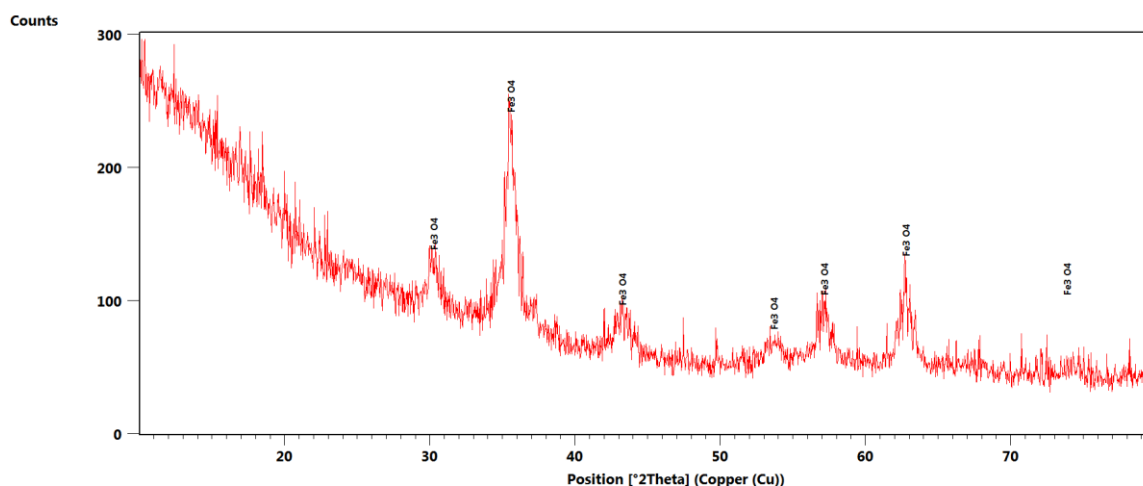


Figura 1. Difractograma de Raze X inregistrata pentru PET@Fe₃O₄@AU

Membranele nanostructurate obtinute prin electrospining utilizand diverse debite de lucru au fost caracterizate si prin Microscopie Electronica de Baleiaj. Principalele rezultate inregistrate sunt prezentate in figura 2. Analizand imaginile se observa pentru toate variantele experimentale o dimensiune nanostructurata a retelei firboase cu diametre ce variaza intre 50 si 150 nm, nanoparticulele de magnetita functionalizate cu acid usnic fiind distribuite aleator, de regula la jonctiunea fibrelor, care actioneaza ca niste centri de nucleatie favorizand cresterea nanocristalelor de magnetita. Dimensiuna particulelor prezente pe suprafata sau la jonctiunea dintre fibre variaza intre 5 si 10 nm.



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

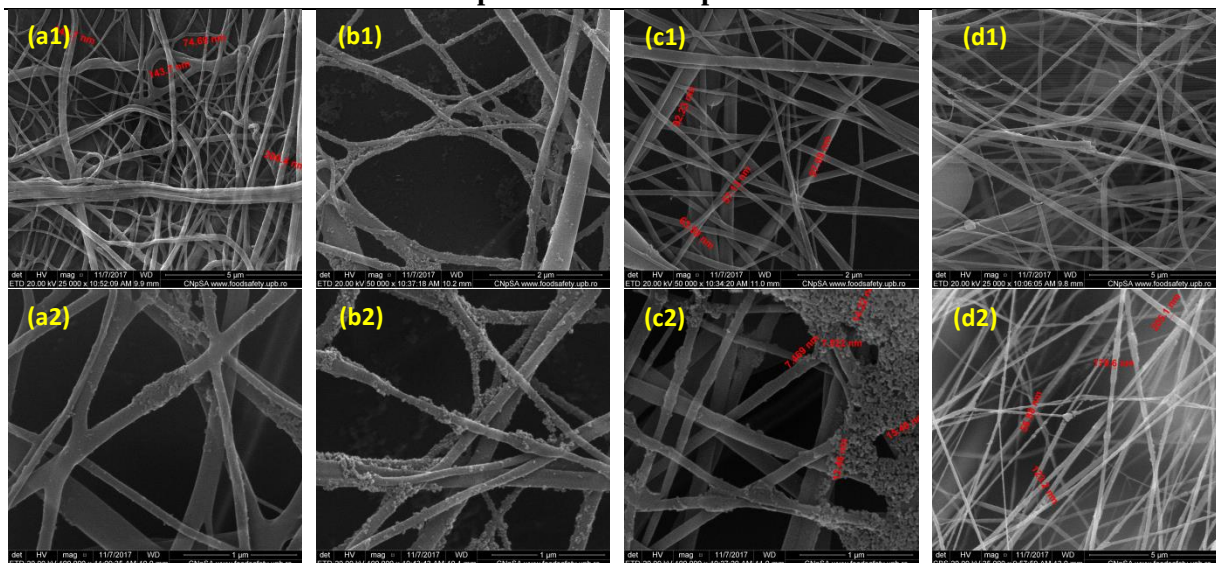


Figura 2. Imagini SEM inregistrate pentru PET@Fe₃O₄@AU la diverse debite, unde a1,2 – 2,5 mL/h ; b1,2 – 5 mL/h ; c1,2 – 7,5 mL/h ; d1,2 – 10 mL.

Ulterior, probele au fost caracterizate si prin Microscopie Electronica prin Transmisie, ca analiza suplimentara de confirmare a SEM-ului. Imaginile TEM sunt prezentate in figura 3. Se observa diametrul nanometric al fibrelor, iar pe suprafata acestora, distribuite neuniform, aglomerari de nanoparticule.

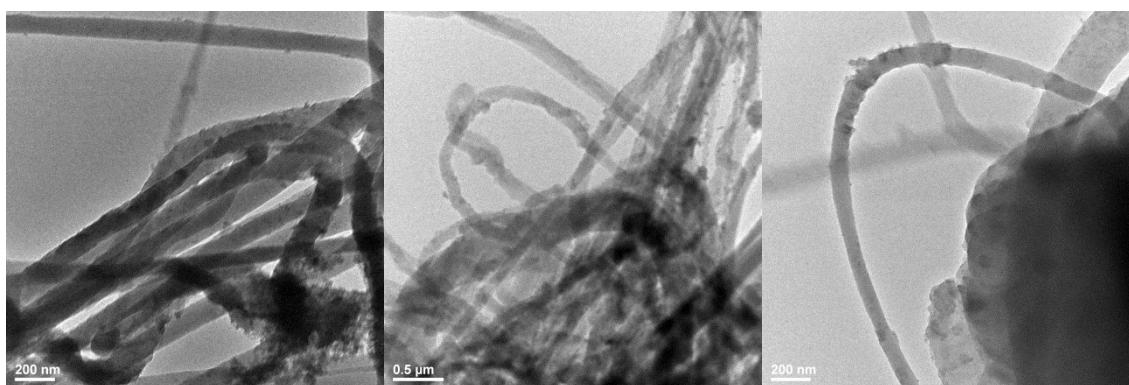


Figura 3. Imagini TEM inregistrate pentru membranele nanostructurate de tipul PET@Fe₃O₄@UA, debit 2,5 mL/h

Spectroscopia de Infrarosu a fost utilizata pentru a evalua integritatea grupelor functionale dupa procedeul de procesare al membranelor. Rezultatele obtinute sunt prezentate in figura 4 si evidentiaza prezenta benzilor de absorbtie caracteristice PET-ului. Nu se observa deplasari ale benzilor de absorbtie. De asemenea, se observa banda de absorbtie caracteritica legaturii Fe-O, ce apartine magnetitei.



Alexandru Mihai GRUMEZESCU

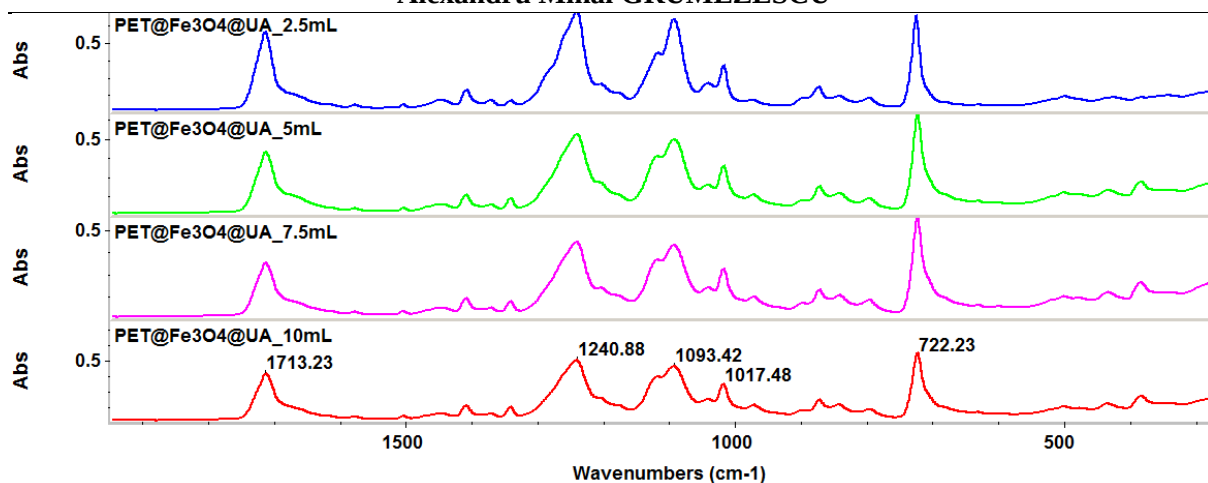


Figura 4. Spectrele FT-IR inregistrate pentru membranele de tipul PET@Fe₃O₄@AU

3.1.2. Membrane pe baza de PET si nanoparticule de argint

Nanoparticulele de argint obtinute printr-o reactie de reducere a azotatului de argint au fost caracterizate prin Microscopie Electronica prin Transmisie. Analizand figura 5 se observa dimensiunea nanometrica a particulelor obtinute, dimensiunea variind intre 40 si 60 de nm. Pattern-ul SAED a permis identificarea fazelor cristaline prezente in proba, NanoAg fiind singura faza cristalina.

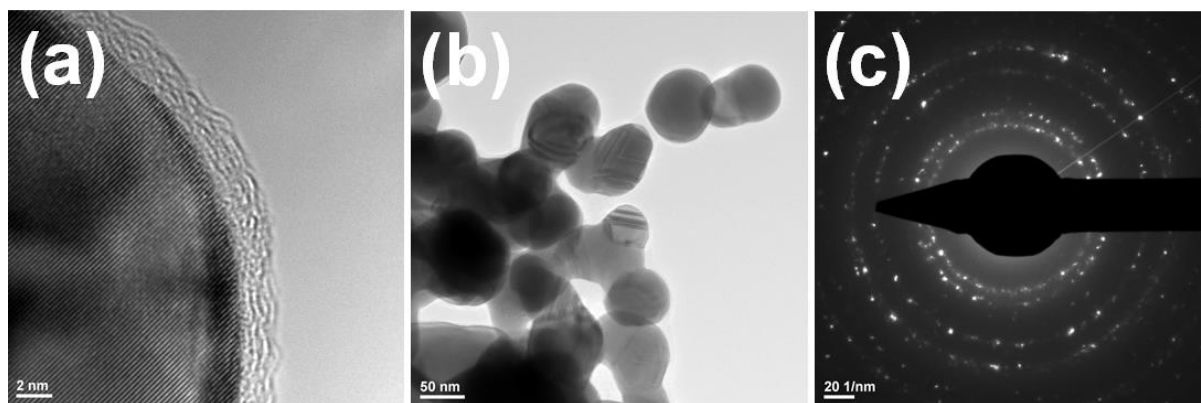


Figura 5. Imagini TEM inregistrate pentru (a,b) NanoAg si pattern-ul SAED (c)

Ulterior, NanoAg au fost caracterizate prin Difractie de Raze X. Analiza XRD prezentata in figura 6, evidentiaza cristalinitatea probei obtinute, singura faza cristalina identificata fiind NanoAg prin cele 4 interferente de difractie caracteristice nanoparticulelor de argint.

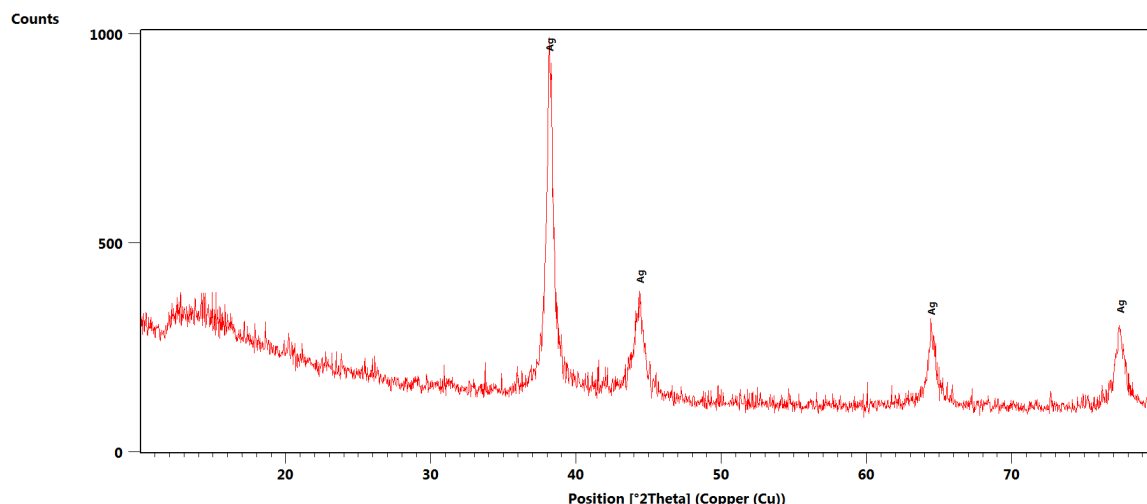


Figura 6. Difractograma de Raze X inregistrata pentru NanoAg

Spectroscopia de Infrarosu s-a utilizat pentru a evalua integritatea grupelor functionale post procesare prin electrospining. Analizand figura 7, se observa o ca cele 4 variante experimentale nu prezinta degradari ale grupelor functionale, deplasari ale benzilor de absorbtie sau modificari de intensitate semnificative. Se pot identifica benzile de absorbtie caracteristice PET-ului, dupa cum urmeaza : 2961 cm^{-1} caracteristica legaturii C-H, si 1714 cm^{-1} caracteristica grupei C=O. De asemenea se observa si benzi de absorbtie legaturilor C-C si C-O in zona de amprenta moleculara.

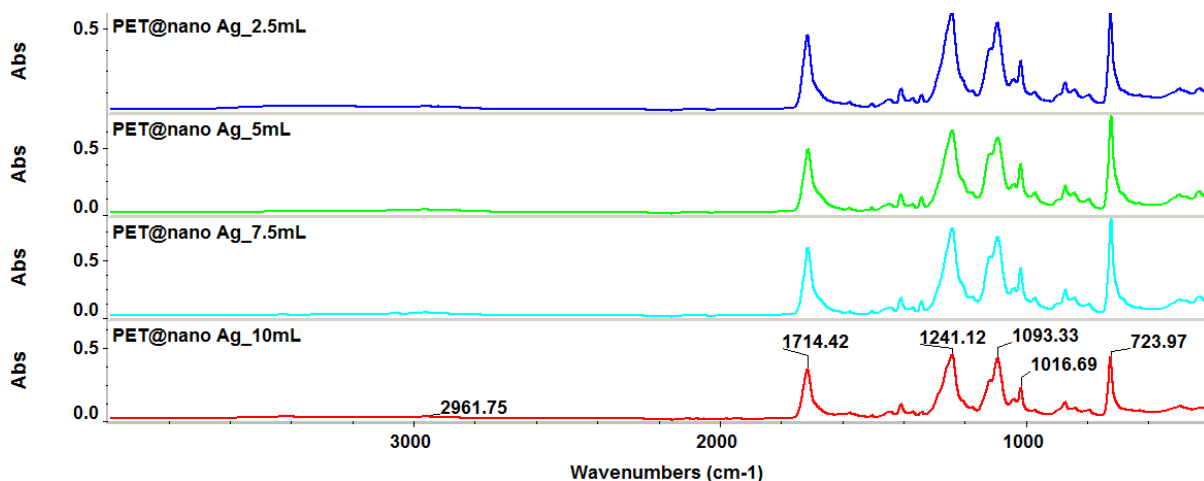


Figura 7. Spectrele FT-IR inregistrate pentru membranele de tipul PET@NanoAg

Microscopia Electronica de Baleiaj a permis identificarea morfologiei membranelor nanostructurate si prezenta nanoparticulelor de argint pe suprafata fibrelor. Analizand figura 8, in toate variantele experimentale se pot identifica nanoparticule de argint depuse neuniform pe suprafata fibroasa a membranei. Exista o tendinta generala de aglomerare la



nodurile rețelei fibroase (acestea acționând ca niște centri de nucleație pentru creșterea nanoparticulelor).

Analizând figurile, se observă că fibrele au dimensiuni ce variază între 30 și 100 nm, iar dimensiunea particulelor de argint de pe suprafața fibrelor variază între 8 și 20 nm.

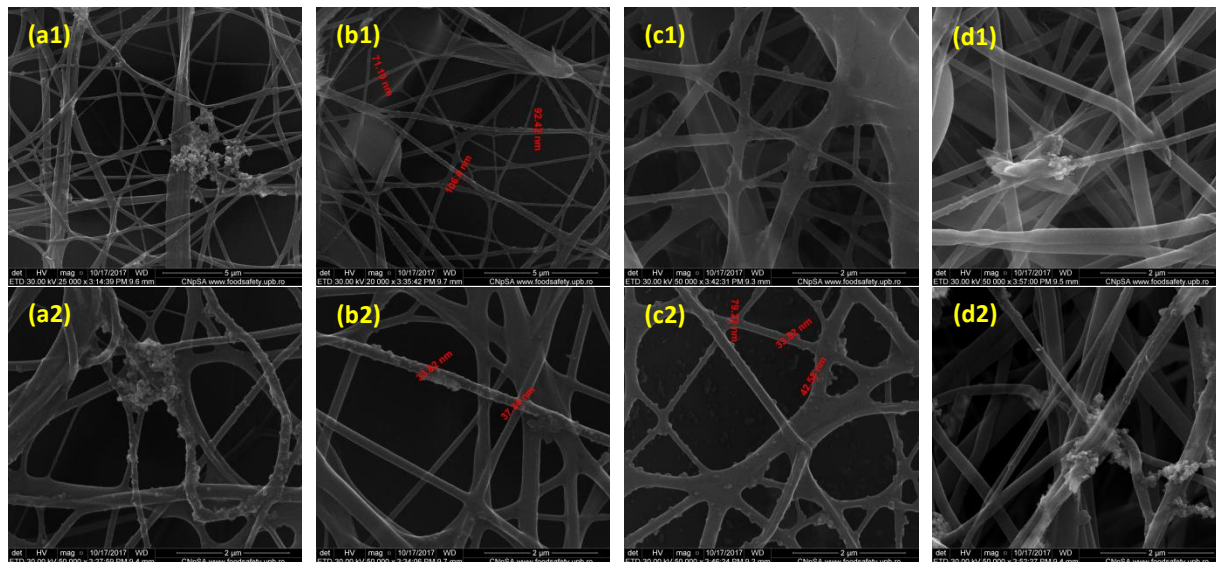


Figura 8. Imagini SEM înregistrate pentru PET@NanoAg la diverse debite, unde a1,2 – 2,5 mL/h ; b1,2 – 5 mL/h ; c1,2 – 7,5 mL/h ; d1,2 – 10 mL.

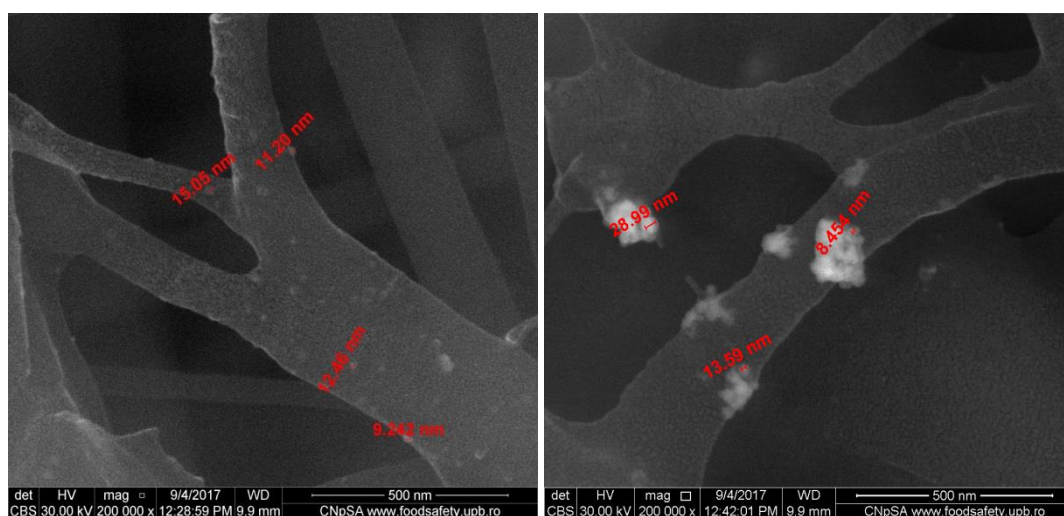


Figura 9. Imagini SEM înregistrate în backscattering pentru rPET@NanoAg, debit 5 mL/h

Membranele nanostructurate cu suprafața modificată au fost caracterizate și prin Microscopie Electronica prin Transmisie. Rezultatele pentru membrana obținută la un debit de 2,5 mL/h sunt prezentate în figura 10. Aceste evidențiază dimensiunea nanometrică a particulelor de argint și dispersabilitatea acestora pe suprafața fibrelor de PET.

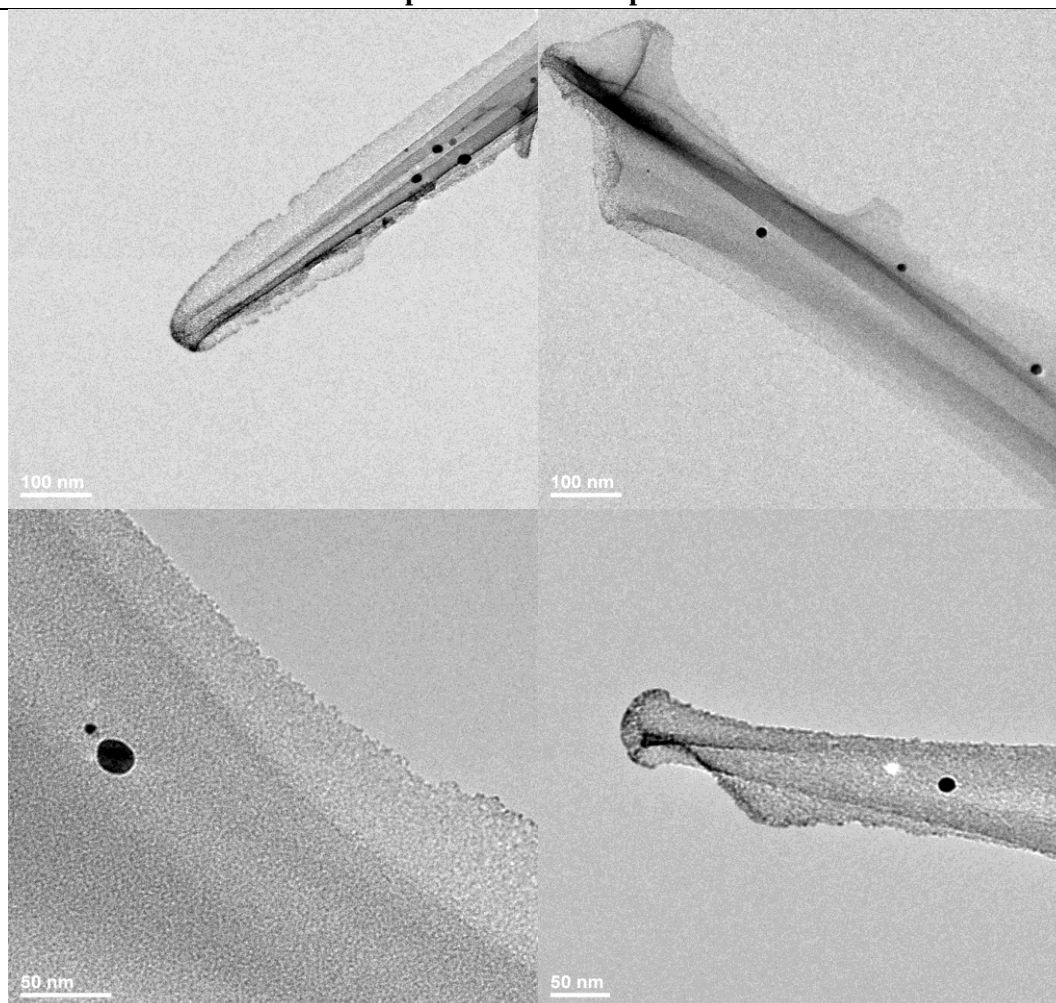


Figura 10. Imagini TEM inregistrate pentru rPET@NanoAg, debit 2,5 mL

3.1.3. Membrane pe baza de PET si nanoparticule de oxid de zinc

Membranele nanostructurate pe baza de PET pe suprafata carora s-a depus oxid de zinc au fost caracterizate prin Microscopie Electronica de Baleiaj. Rezultatele obtinute in cazul celor 4 debite utilizate pentru obtinerea membranelor nanostructurate sunt prezentate in figura 11. Se observa o retea de fibre neordonate, pe suprafata carora se observa distribuite neomogen nanostructuri sub forma granulara cu dimensiuni ce variaza intre 10 si 20 nm. De asemenea se observa ca fibrele au un diametru ce variaza intre 40 si 100 nm.

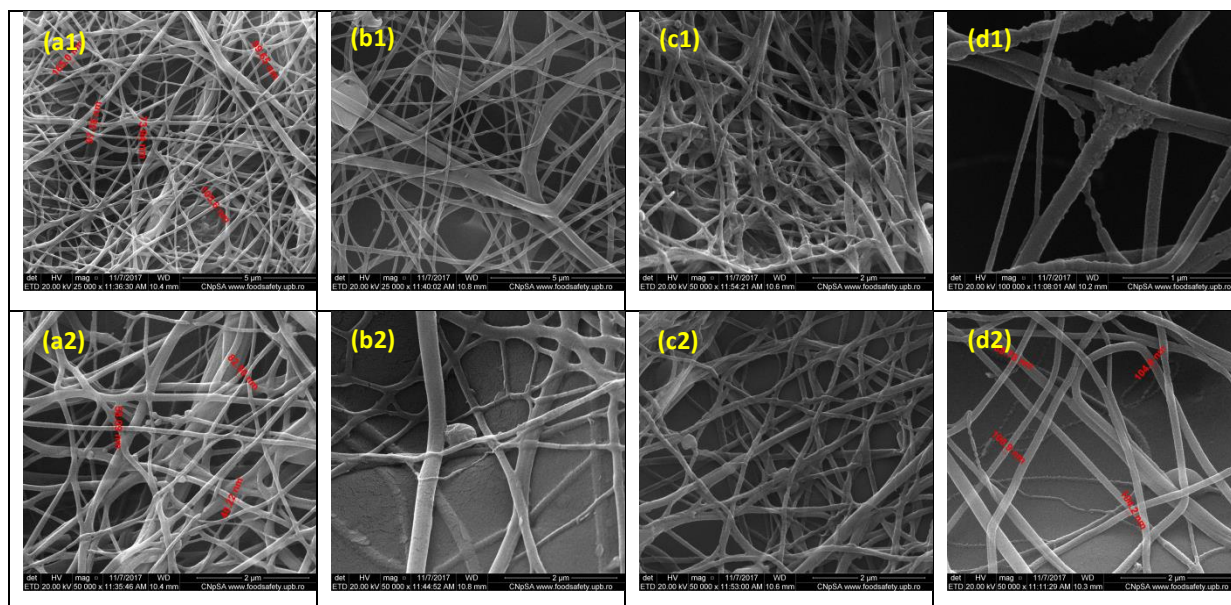


Figura 11. Imagini SEM inregistrate pentru PET@ZnO la diverse debite, unde a1,2 – 2,5 mL/h ; b1,2 – 5 mL/h ; c1,2 – 7,5 mL/h ; d1,2 – 10 mL.

Variantele experimentale obtinute au fost caracterizate si prin Microscopie Electronica prin Transmisie. Rezultatele obtinute in cazul debitului de 2,5 mL/h sunt prezentate in figura 2. Analizand imaginile inregistrate se observa structura fibroasa a membranei, iar pe suprafata fibrelor depuse granule cu dimensiuni confirmate si prin SEM.

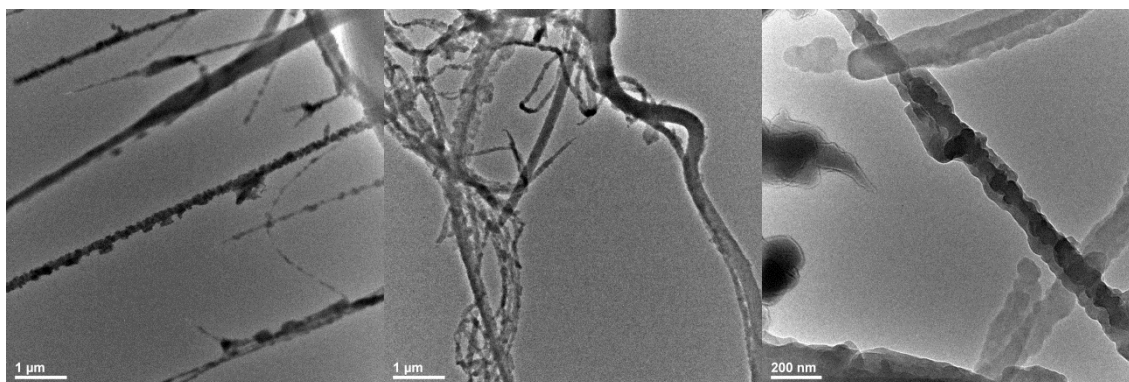


Figura 12. Imagini TEM inregistrate pentru membranele nanostructurate de tipul PET@ZnO, debit 2,5 mL

Membranele nanostructurate pe baza de PET si nanoparticule de ZnO au fost caracterizate si prin Spectroscopie de Infrarosu. Rezultatele obtinute sunt prezentate in figura 13. Se observa benzi de absorbtie caracteristice PET-ului, dar si banda de absorbtie caracteristica legaturi Zn-O de la 436 cm^{-1} . De asemenea, se observa ca valorificarea a PET-ului nu degradeaza grupele functionale ale acestuia si nici nu produce deplasari a benzilor de absorbtie caracteristice polimerului.



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

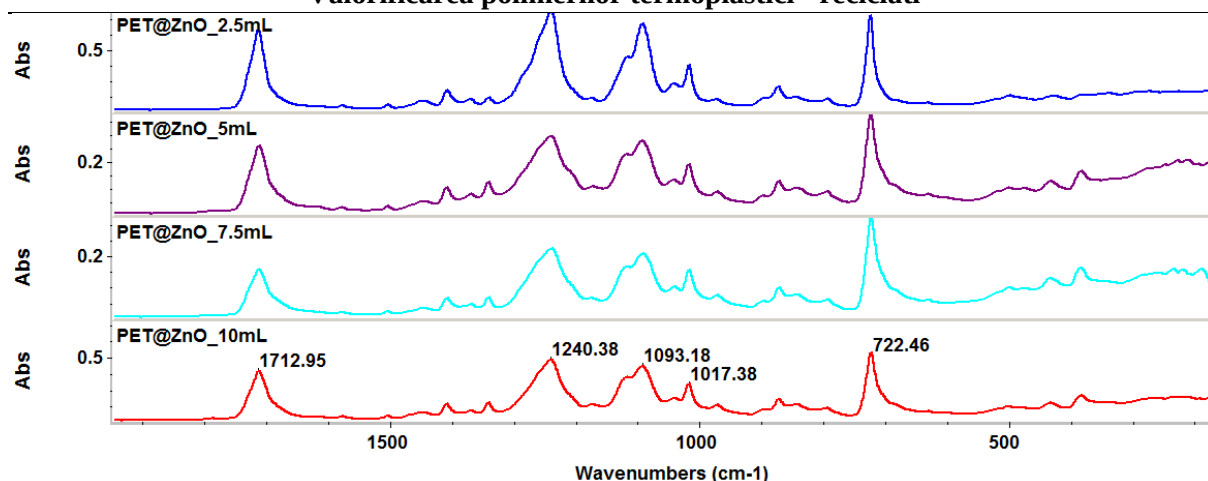


Figura 13. Spectrele FT-IR inregistrate pentru membranele de tipul PET@ZnO

3.2. Caracterizari biologice

3.2.1. Profilul microbiologic si fungic

Contaminarea mediului inconjurator cu microorganisme cu potential patogen reprezinta principalul factor de risc asupra sanatatii consumatorilor. Microorganismele pot creste atat in stare planctonica (plutitoare), cat si in stare aderata.

Microorganismele dezvoltate in stare aderata reprezinta un factor suplimentar de risc, fiind mai greu de indepartat comparativ cu microorganismele care se dezvoltă in stare planctonica. Microorganismele aderata pot forma comunitati multicelulare specializate, numite biofilme, care pot avea un comportament diferit comparative cu cele planctonice, din punct de vedere biochimic si genetic, fiind mai rezistente in stare aderata.

In prezent se studiaza metode alternative de limitare a colonizarii microbiene a materiilor prime si a instalatiilor din industrie.

Una dintre abordarile actuale se refera la dezvoltarea de membrane nanostructurate realizate din materiale bioactive care sa contina un element antimicrobian sau inhibitor al colonizarii microorganismelor. In ultimele decenii un impact semnificativ in terapia antimicrobiana si in alte aplicatii ce vizeaza limitarea dezvoltarii microorganismelor, a fost observat prin dezvoltarea aplicatiilor nanotehnologiei. Numeroase tipuri de nanoparticule cu activitate antimicrobiana au fost dezvoltate recent si rolul lor in industrie. Scopul acestui studiu a fost obtinerea si caracterizarea unor membrane nanostructurate cu consistenta



fibrilara prin tehnica electrospinning, pe baza de PET reciclat si nanoparticule anorganice cu efect antimicrobian si de limitare a dezvoltarii biofilmelor.

Rezultatele obtinute au aratat ca materialele sintetizate prezinta efect antimicrobian distinct, in functie de debitul de depunere prin electrospinning, tipul de nanosistem inglobat si starea planctonica sau aderata a microorganismelor contaminante.

Studiile s-au realizat pe microorganisme model (bacterii Gram pozitive – *S. aureus*, Gram negative – *P. aeruginosa*; cat si levuri – *C. albicans*), care prezinta importanta clinica si industriala deosebita.

Rezultatele au aratat ca toate tipurile de membrane investigate au prezentat efecte de inhibitie asupra cresterii si dezvoltarii microorganismelor in cultura planctonica, cele mai semnificative diferente de crestere fiind observate in cazul PET@ZnO.

Pentru culturile planctonice de *S. aureus* s-a observat ca PET reciclat ce contine nanoparticule de ZnO prezinta cel mai semnificativ efect inhibitor asupra cresterii, fiind urmate de PET@NanoAg si apoi PET@Fe₃O₄@AU (fig 14).

In toate variantele experimentale, se poate constata ca cele mai mari activitati inhibitorii au fost obtinute la probele de PET la care depunerea fibrelor prin electrospinning sa realizat la un debit crescut, respective 10 sau 7,5 mL/h.

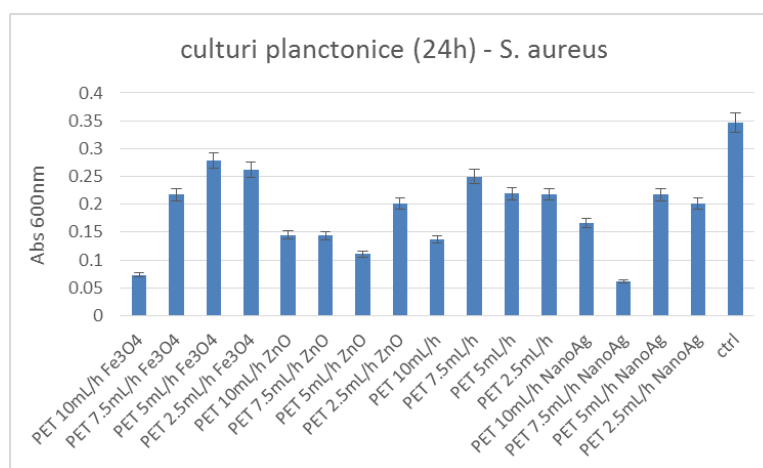


Figura 14. Reprezentare grafica a valorilor absorbantei inregistrate pentru culturile de *S. aureus*, ce exprima capacitatea de multiplicare a acestor celule in urma cultivarii, timp de 24h in prezenta materialelor polimerice pe baza de PET reciclat obtinute.



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

In cazul culturilor de *P. aeruginosa* dezvoltate in stare planctonica, s-a observat de asemenea ca materialele din PET@ZnO prezinta cel mai evident fenotip de inhibitie al dezvoltarii crestei microbiene. Comparativ cu rezultatele observate in cazul culturilor de *S. aureus*, inhibitia cresterii culturilor de *P. aeruginosa* este semnificativ mai redusa in toate variantele experimentale realizate (figura 15).

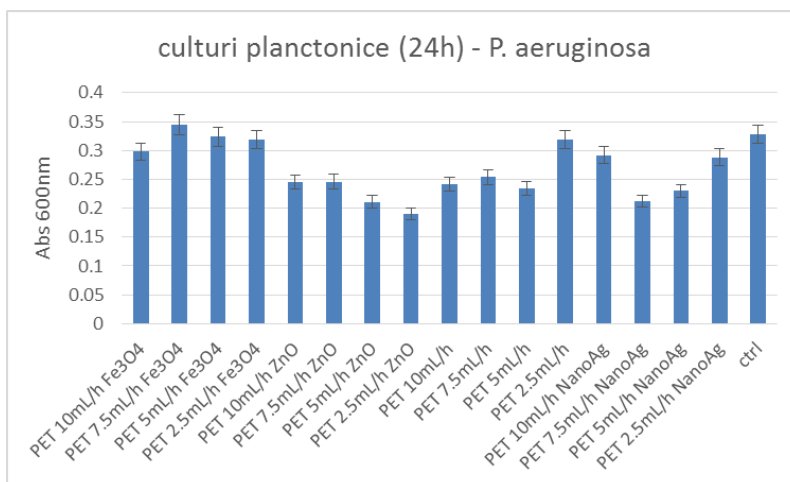


Figura 15. Reprezentare grafica a valorilor absorbantei inregistrate pentru culturile de *P.aeruginosa*, ce exprima capacitatea de multiplicare a acestor celule in urma cultivarii, timp de 24h in prezenta materialelor polimerice pe baza de PET reciclat obtinute.

In cazul tulpinii levurice testate, se poate constata ca efectul materialelor asupra cresterii *C. albicans* in cultura este relative uniform, inhibarea culturilor planctonice fiind relative redusa. Cel mai evident efect inhibitor a fost observant in cazul probelor PET@Fe₃O₄@AU 10mL/h si PET 5mL/h (figura 16).

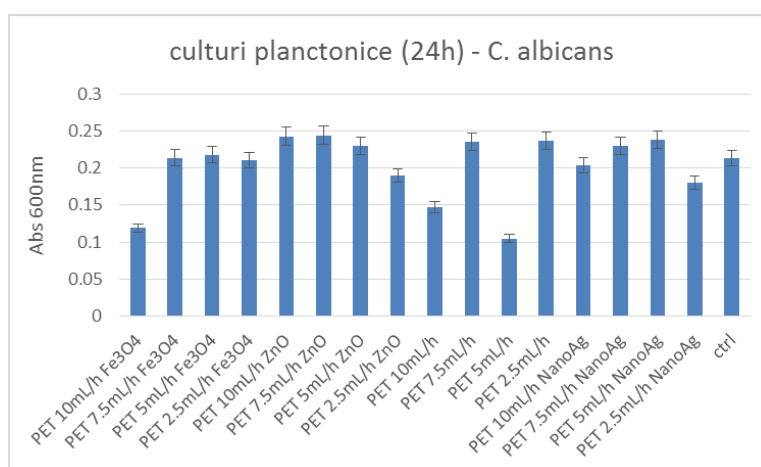




Figura 16. Reprezentare grafica a valorilor absorbantei inregistrate pentru culturile de *C.albicans*, ce exprima capacitatea de multiplicare a acestor celule in urma cultivarii, timp de 24h in prezenta materialelor polimerice pe baza de PET reciclat obtinute.

In cazul evaluarii capacitatii de formare a biofilmelor rezultatele s-au dovedit a fi diferite, comparativ cu testele desfasurate pe culturi planctonice.

Astfel, capacitatea *S. aureus* de a dezvolta biofilme pe suprafetele materialelor polimerice pe baza de PET reciclat este semnificativ limitata in prezenta membranelor nanostructurate de PET ce contin nanoparticule de ZnO, indiferent de debitul de obtinere al fibrelor prin electrospinning. Efectul de inhibitie al dezvoltarii acestor biofilme monospecifice s-a observat in toate etapele de dezvoltare a biofilmelor, incepand cu aderenta celulelor (pana la 24h), continuand cu maturarea acestora (pana la 48h) si pana in momentul dispersiei (cand celule sau agregate celulare se desprind de la nivelul biofilmelor pentru a coloniza noi suprafete), cand se constata o scadere a numarului de celule aderente (figura 17).

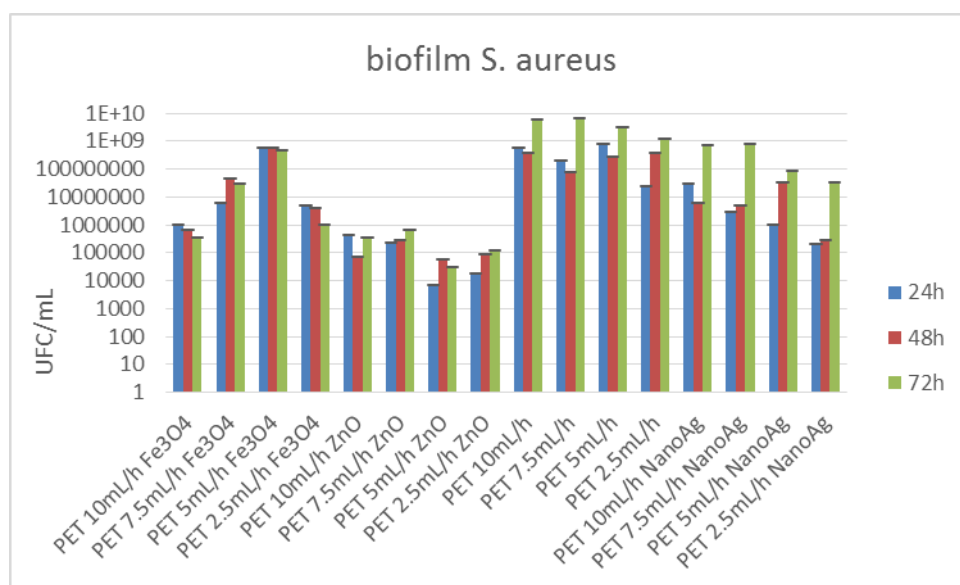


Figura 17. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitatea de celule de *S. aureus* incluse in biofilmele monospecifice dezvoltate pe suprafata materialelor obtinute timp de 24h, 48h si 72h, la 37°C.

Membranele nanostructurate pe baza de PET si nanoparticule de magnetita au demonstrat, de asemenea, un efect de inhibare a dezvoltarii biofilmelor produse de *S. aureus*, la toate intervalele de timp analizate. Materialele din PET si nanoparticule de argint au



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

prezentat cel mai redus efect de inhibare al biofilmelor, cu toate ca acesta a fost semnificativ in cazul biofilmelor de 24h si 48h.

P. aeruginosa este un microorganism cu mecanisme de rezistenta naturala multiple, fapt ce il face un patogen oportunist bine adaptat pentru a coloniza cu eficienta maxima o serie de medii. Biofilmele produse de acest microorganism oportunist sunt foarte dificil de eradicat cu substantele antimicrobiene actuale. Rezultatele obtinute in acest studiu au demonstrat ca *P. aeruginosa* are o capacitate limitata de a forma biofilme pe membranele nanostructurate obtinute, cele mai semnificative efecte inhibitorii fiind observate in cazul PET@ZnO. In acest caz, dezvoltarea biofilmelor este semnificativ limitata la toate cele trei intervale de timp analizate (24, 48 si 72h) si pentru toate debitele de obtinere prin electrospinning a PET@ZnO (figura 18).

Ca si in cazul inhibarii biofilmelor de *S. aureus*, membranele PET@Fe₃O₄@AU au determinat inhibitia semnificativa (dar nu atat de intensa precum PET@ZnO) a biofilmelor formate de *P. aeruginosa* la toate intervalele de timp testate, indiferent de debitul de depunere al fibrelor prin electrospinning. In cazul materialelor din PET@NanoAg se poate observa o usoara activitate de inhibitie a biofilmelor de *P. aeruginosa*, doar la 24 si 48 h de la incubare, dupa 72h efectele de inhibitie a dezvoltarii biofilmului devenind nesemnificative (figura 18).

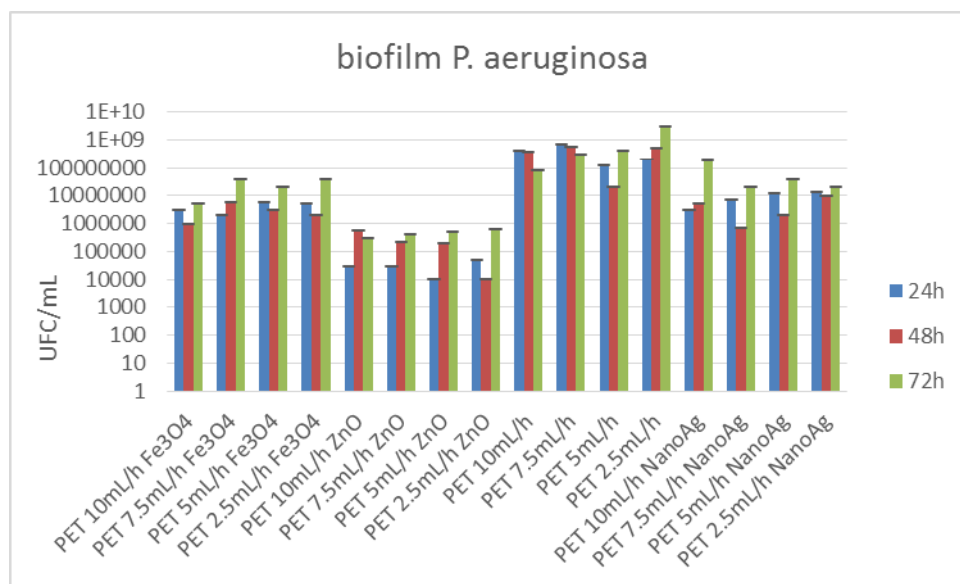


Figura 18. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitatea de celule de *P. aeruginosa* incluse in biofilmele monospecifice dezvoltate pe suprafata materialelor obtinute timp de 24h, 48h si 72h, la 37°C.



Nu doar tulpinile bacteriene au prezentat o capacitate defectuoasa de a forma biofilme in prezenta membranelor nanostructurate dezvoltate, dar si tulpina levurica testata. In cazul tulpinii de *C. albicans* se poate observa cea mai semnificativa capacitate de inhibitie a dezvoltarii biofilmelor in toate variantele experimentale testate. Toate membranele pe baza de PET si nanoparticule anorganice au demonstrat un efect inhibitor asupra dezvoltarii biofilmelor de *C. albicans*, indiferent de debitul de depunere a fibrelor prin electrospinning, sau de tipul de nanosistem continut, nefiind influentat de timpul de actiune. Astfel, cele mai evidente efecte inhibitorii s-au evidentiat in cazul PET@ZnO, urmate de PET@Fe₃O₄@AU si PET@NanoAg (figura 19).

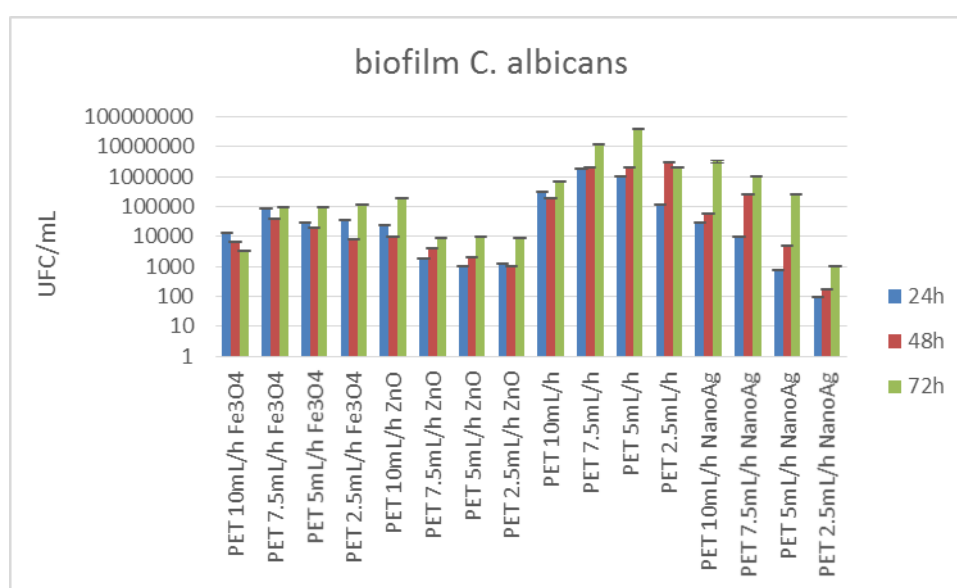


Figura 19. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitatea de celule de *C. albicans* incluse in biofilmele monospecifice dezvoltate pe suprafata materialelor obtinute timp de 24h, 48h si 72h, la 37°C.

In figura 20 se poate observa aspectul coloniilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans* cultivate pe mediu de cultura solid, in urma recuperarii celulelor viabile din biofilmele dezvoltate pe materialele pe baza de PET reciclat si nanoparticule anorganice.



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

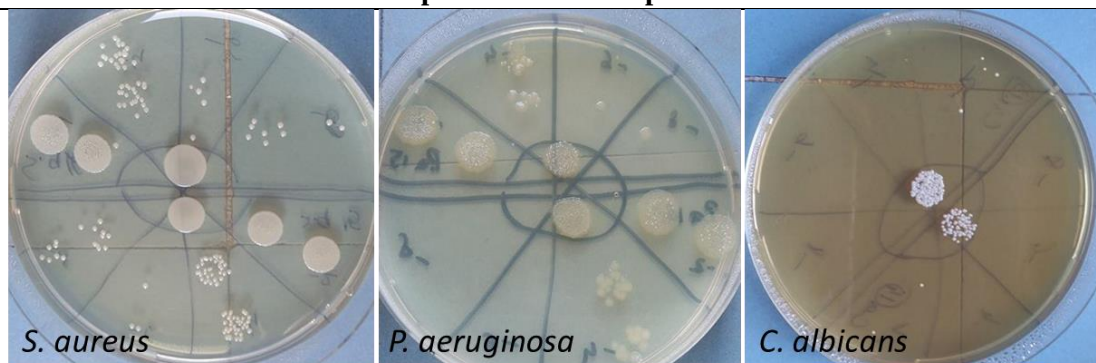


Figura 20. Aspectului coloniilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans*, obtinute in cazul cultivarii dilutiilor suspensiilor microbiene obtinute din celule desprinse din biofilmele cultivate in prezenta materialelor pe baza de PET reciclat si nanoparticule anorganice.

Evidentierea efectului antifungic s-a realizat cu ajutorul unei tulpini de *A. niger*, cultivate timp de 3 saptamani in prezenta materialelor analizate. Rezultatele au aratat ca dezvoltarea microfungilor atat in vecinatatea cat si sub sau peste materialele pe baza de PET cu nanoparticule este inhibata timp de cel putin 3 saptamani (fig 21).



Figura 21. Aspectului culturilor de *A.niger* dezvoltate in prezenta membranelor nanostructurate de PET@ZnO, debit 5mL/h, timp de 1, 2 sau 3 saptamani.

3.2.2.Profilul citotoxic

Citotoxicitatea membranelor nanostructurate pe baza de PET reciclat a fost analizata utilizand celule diploide umane in cultura.

Rezultatele obtinute prin aplicarea metodei MTT au aratat ca proliferarea si activitatea celulelor diploide in cultura poate suferi modificari minore in prezenta materialelor analizate, in functie de debitul de depunere a fibrelor prin electrospinning. In figura 22 se poate observa ca activitatea metabolica si proliferarea celulelor este relativ constanta in prezenta



membranelor nanostructurate pe baza de PET, perturbări în sensul stimulării proliferării fiind observate în cazul probelor PET@NanoAg, debit 7,5 mL/h și PET@ZnO, debit 10 mL/h (figura 22).

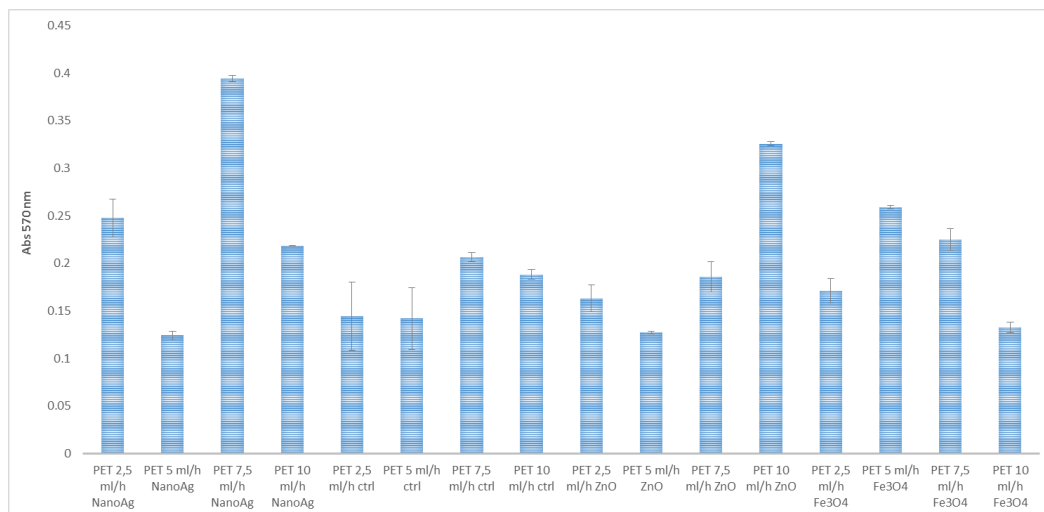


Figura 22. Reprezentare grafică a rezultatelor tehnicii MTT, reprezentate prin valorile absorbantei la 570 nm ce sugerează densitatea optică a formazanului eliberat în urma reacției de reducere a reactivului MTT de către oxidoreductazele mitocondriale ale celulelor active metabolic în prezența materialelor testate.

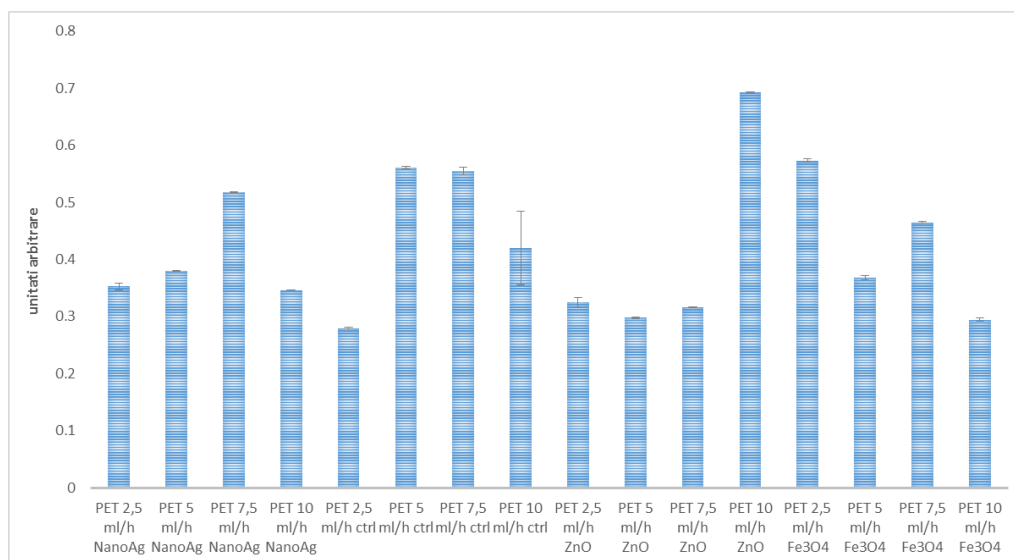


Figura 23. Reprezentare grafică a valorii luminiscentei, exprimată în unități arbitrare, ce sugerează activitatea glutathion S-transferazei (care transformă glutathionul legat cu un precursor de luciferina în glutathion oxidat legat cu luciferina care emite lumină), activitate corelată cu inducerea stresului oxidativ în celulele diploide cultivate în prezența materialelor obținute.



Valorificarea polimerilor termoplastici - reciclati

O alta metoda de analiza a citotoxicitatii este cea care urmareste inducerea unui stress oxidativ intracelular. Metoda GSH dozeaza cantitatea de glutatation, un agent antioxidant produs de celule. Glutatationul produs de celule este transformat de glutatation S-transferaza in glutatation oxidat, cantitatea de glutatation transformat fiind direct proportionala cu cantitatea de enzima glutatation S-transferaza care transforma glutatationul legat cu un precursor de luciferina in glutatation oxidat legat cu luciferina care emite lumina. Cu cat lumina este mai intensa cu atat s-a transformat mai mult glutatation, deci s-a sintetizat mai mult glutatation, deci celula a fost mai stresata.

Rezultatele obtinute in urma aplicarii tehnicii GSH au aratat ca activitatea glutatation S-transferazei este alterata in celulele cultivate prezenta urmatoarelor probe: PET@NanoAg - debit 7.5 mL/h, PET-control -debit 5 mL/h, PET-control -debit 7.5 mL/h, dar si PET@ZnO - debit 10 mL/h si PET@Fe₃O₄@AU – debit 2.5 mL/h (fig 23).

4. Concluzii

Membranele nanostructurate prezinta o buna activitate antimicrobiana si antibiofilm impotriva diferitelor tulpini microbiene Gram-pozitive si Gram-negative, dar si asupra fungilor. De asemenea nu prezinta toxicitate si nu interfereaza cu progresia normala a ciclului celular. Rezultatele obtinute deschid noi perspective pentru recilarea PET-ului, cum ar fi utilizarea acestuia in combinatie cu diverse nanostructuri anorganice cu proprietati antimicrobiene si antibiofilm pentru sisteme de decontaminare, filtrare sau purificare a aerului din diverse zone sau incinte de interes.

5. Diseminare stiintifica

5.1. Articole

1. Grigore M.E., **Grumezescu A.M.**, Holban A.M., Mogosanu G.D., Andronescu E., Collagen-Nanoparticles Composites for Wound Healing and Infection Control, Metals, in press, 2017, **Zona Q1**.

5.2. Carti

1. Ficai A., **Grumezescu A.M.**, Nanostructures for Antimicrobial Therapy, 1st Edition, ISBN : 9780323461511, 722 pagini, Elsevier, USA.



5.3. Participari la conferinte interantionale

1. **Grumezescu A.M.**, Grumezescu V., Fikai A., Holban A.M., Andronescu E. MAPLE Fabricated Hydroxyapatite-Magnetite Nanoparticles Coatings Used for the Stimulation of Fixation at the Bone-Implant Interface–APM-42. 9thInternational conference on Advanced NanoMaterials – ANM, Aveiro, Portugalia, 16-21 July 2017.
2. **Grumezescu A.M.**, Oprea E.A., Fikai A., Vasile B.S., Trusca R., Holban A.M., Andronescu E. Electrospun recycled PET: improving biological properties by addition of silver nanoparticles, S6 – 271, 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Poiana Brasov, Romania, 6-9 September, 2017.

6. Bibliografie

1. Mohamed Sultan AA, Lou E, Mativenga PT. What should be recycled: An integrated model for product recycling desirability. Journal of Cleaner Production. 2017 2017/06/15/;154(Supplement C):51-60.
2. Welle F. Twenty years of PET bottle to bottle recycling—An overview. Resources, Conservation and Recycling. 2011 2011/09/01/;55(11):865-75.
3. Ragaert K, Delva L, Van Geem K. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. Waste Management. 2017 2017/11/01/;69(Supplement C):24-58.