

# SABIOM

## Etapa I

### STUDII PRELIMINARE SI CERCETARI DE LABORATOR ASUPRA MATRICILOR BIOPOLIMERICE UTILIZATE IN REALIZAREA DE MATERIALE SUPERABSORBANTE

#### Activitati

**A.I.1** Obținerea de celuloză bacteriană din materii prime ieftine, în special provenite din deșeuri agricole și optimizarea procesului de fermentație;

**A.I.2** Selectarea de hidrogeluri polimerice pentru obținerea de matrici superabsorbante, compatibile cu matricea de bioceluloză și cu proprietăți de gonflare superioare;

**A.I.3** Identificarea diferitelor plante cu activitate antimicrobiană sau care conțin alte substanțe active și studierea profilului fitochimic.

Perioda de derulare a etapei: 2.07 – 14.12.2012

#### 1. STUDIU DE LITERATURĂ

##### 1.1. Bioceluloză: obținere, proprietăți și utilizari

Celuloza este un polimer omogen format din  $\beta$ -(1,4) glucoză, fiind cel mai întâlnit polimer din natură, producția de celuloză fiind estimată la o cantitate de  $10^{11}$  t/an. Celuloza care se produce în natură există în două forme de bază (se mai numește și celuloză nativă): prima este celuloza pură, iar cealaltă este celuloza complexă. Celuloza pură este cea produsă de plante cum ar fi bumbacul, de unele alge marine și de animale marine cum ar fi tunicatele. Cea de-a doua este numită celuloză complexă și include cea mai mare parte a celulozei din natură și anume cea produsă de peretele celular al plantelor superioare. Celuloza constă din unități de glucoză legate între ele prin legături 1,4 glicozidice formând unități de celobioză care se repetă. Celuloza bacteriană este produsă prin biosinteză cu ajutorul bacteriilor aparținând genurilor *Glucanacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* și altele (Jonas și Farah, 1998). Dintre acestea, genul care posedă cea mai mare eficiență de a produce bioceluloză este *Glucanacetobacter xylinum*, numit și *Acetobacter xylinum*, fiind din această cauză bacteria acetică cea mai studiată. Este o bacterie gram-negativă, strict aerobică și nu foto-sintetică, capabilă să convertească glucoza, fructoza, glicerolul și alte substanțe organice în celuloză în timp de câteva zile. Se găsește pe diferite fructe, legume, în oțet și în unele băuturi alcoolice. Celuloza biosintetizată de *Acetobacter xylinum* este identică cu cea produsă de plante, în ceea ce privește formula chimică și structura polimerică, dar prezintă o cristalinitate mai mare. O altă diferență fundamentală între celuloza bacterială și celuloza din plantele superioare, este că prima este liberă de hemiceluloză, lignină și alți componenți cu care cea de-a doua este asociată. În tabelul 1 este prezentată o comparație între cele două tipuri de celuloză (Iguchi și colab., 2000).

Mecanismul de formare a biocelulozei ca și structura microfibrilelor au fost intens studiate. Astăzi se acceptă că moleculele de celuloză sunt sintetizate în interiorul celulelor bacteriene, care dispun de componente de export a celulozei, adică de orificii sau pori care permit extrudarea de protofibrile de circa 2-4 nm în diametru și care sunt apoi unite în mănunchiuri de circa 80x4 nm.

*Tabelul 1. Comparație între proprietățile celulozei bacteriene și a celulozei din plante*

<b>Proprietate</b>	Celuloză din plante	Celuloză bacteriană
Grosimea fibrelor	1.4-4x10 <sup>-2</sup> mm	70-80 nm
Cristalinitate	56-65%	65-79%
Grad de polimerizare	13000-14000	2000-6000
Modulul Young	5.5-12.6 GPa	15-20 GPa
Conținut de apă	60%	98.5%

Principala sursă de carbon a bacteriilor acetice implicate în producerea celulozei bacteriene este reprezentată în primul rând de zaharuri. Dintre cele mai utilizate sunt glucoza și fructoza, la care se mai adaugă glicerolul și altele. Uneori mediile de cultură mai conțin cantități mici de vitamine. În general nu e nevoie de adăugarea de nutrienți anorganici mai ales, când se utilizează sucuri naturale cum este cazul obținerii a ceea ce se numește *nata-de-coco* și care nu este altceva decât gel de bioceluloză obținută din zahăr și lapte de cocos în prezență de *Acetobacter xylinum*, utilizată în alimentație în Asia. Pentru producția industrială a acestui aliment se adaugă sulfat de amoniu și fosfat de amoniu di-acid (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Pentru experimente de laborator s-a impus mediul de cultură Schramm-Hestrin (1954) și care are următoarea compoziție: glucoză (20 g), extract de drojdie (5 g), peptonă (5 g), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,7 g), acid citric (1,15 g) și apă distilată (1 L). Există numeroase studii în care s-a variat sursa de carbon folosindu-se pe lângă glucoză, fructoză, galactoză, sucroză, glicerol și manitol. Dintre acizii care se pot adăuga în mediul de reacție pentru menținerea pH-ului cel mai eficient este acidul acetic (Noro și colab. 2004).

Bioceluloza poate fi obținută atât în culturi statice, cât și sub agitare, în funcție de proprietățile dorite. De asemenea, proprietățile fizico – chimice ale acestor membrane pot fi controlate și prin modificarea compoziției mediului de cultură sau prin tratament chimic ulterior.

Cultura statică prezintă dezavantajul major de a avea nevoie de o suprafață foarte mare de depozitare a vaselor cu culturi, nefiind practică la scară industrială. Totodată productivitatea este destul de scăzută față de cantitatea utilizată de mediu. Pentru a înlătura principalele dezavantaje ale culturilor statice, s-au testat diverse tipuri de reactoare în ceea ce se numește cultura dinamică a biocelulozei. În cadrul culturilor cu agitare se pot folosi de la reactoare clasice cu agitare, până la reactoare rotative și reactoare gaz-lift (Bungay și Serafica, 1999; Bielecki 2005; Chao și colab., 2000; Sani și Dahman, 2010). În toate aceste procedee se poate obține o aerare mai bună a mediului de cultură și o creștere a randamentului de producere a biocelulozei. S-au obținut inclusiv varietăți de bacterii care produc mai bine în culturi agitate. Datorită insolubilității în mediu, bioceluloza formată se agregă rapid în microfibrile de diferite forme în funcție de gradul de aerare și de agitare, obținându-se în acest caz bioceluloză sub formă dispersată în mediu de cultură și care are alte proprietăți fizice decât peliculele de bioceluloză formate în cultură statică.

Pentru purificarea membranelor de bioceluloză, acestea sunt spălate cu apă distilată pentru înlăturarea componentelor mediului, apoi menținute timp de 30 minute până la 1 h la 90 °C în soluție de NaOH 0.5 N, pentru a inactiva microorganismele prinse în membrană. După aceea se spală cu apă distilată până ce pH-ul apei de spălare devine neutru.

Proprietățile specifice ale celulozei bacteriene o fac deosebit de interesantă pentru o gamă largă de aplicații cum ar fi: component nutrițional (aditiv cu un conținut mic de calorii, stabilizator, modificator de textură), agent farmacologic (bandaje temporare, mai ales, pentru arsuri și regenerarea pielii, excipient, eliberare controlată a medicamentelor), ca și în telecomunicații și fabricarea hârtiei, inclusiv a celei electronice (Brown, 2007). S-a menționat și utilizarea biocelulozei în măștile faciale și produsele cosmetice, datorită capacității ridicate de reținere a apei care asigură o hidratare a tenului. Având în vedere capacitatea sa de hidratare foarte mare, bioceluloza poate fi o alternativă și pentru obținerea unor materiale superabsorbante, fie cu utilizări medicale, fie cu utilizări în agricultură, așa după cum a fost făcută propunerea prezentului proiect de cercetare.

Bioceluloza poate fi folosită și la obținerea de materiale compozite cu scopul de a asigura hidrofilicitatea și biodegradabilitatea materialului. Materialele compozite obținute pot fi folosite în industria alimentară ca materiale de ambalare, cu condiția ca polimerul folosit să fie compatibil cu produsele alimentare, dar și în alte domenii de activitate în funcție de proprietățile materialelor obținute.

### *1.2. Hidrogeluri polimerice: clasificare, metode de obținere, proprietăți*

Hidrogelurile sunt compuși macromoleculari care pot reține volume de apă de sute sau chiar mii de ori mai mari decât masa lor uscată (Kopeček, 2007). Hidrogelurile prezintă o structură tridimensională distinctă (Pooley et al. 2010). Deși prezintă un conținut ridicat de apă, hidrogelurile sunt insolubile în apă din cauza structurii reticulate (fizic sau chimic), a împiedicărilor sterice sau a zonelor cristaline. Când un hidrogel vine în contact cu soluții apoase, are loc o gonflare a acestuia. Gelurile polimerice au un rol important în domeniul tehnologic diverse cum ar fi: sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, senzori, materiale superabsorbante, purificarea apei.

În funcție de modul de realizare a reticulării, hidrogelurile pot fi (Hennink și van Nostrum, 2002):

a) hidrogeluri permanente sau chimice, când reticularea este chimică, prin legături covalente;  
b) hidrogeluri reversibile, când reticularea este fizică, în cele mai multe cazuri reversibilă, prin intermediul a diverse tipuri de interacțiuni fizice (ionice, legături de hidrogen, forțe hidrofobe, interpenetrarea macromoleculilor).

În funcție de compoziție, hidrogelurile se clasifică în (Peppas, 2004): a) hidrogeluri homopolimerice - sunt rețele reticulate aparținând unui singur tip de monomer hidrofîl; b) hidrogeluri copolimerice - rezultă prin copolimerizarea reticulată a doi sau mai mulți monomeri diferiți; c) hidrogeluri polimerice interpenetrante - se obțin atât prin prepararea unei rețele polimerice inițiale, care este apoi gonflată cu un al doilea monomer, polimerizat ulterior, cât și prin polimerizarea simultană a doi monomeri care nu copolimerizează, de exemplu polimerizare vinilică și respectiv policondensare sau poliadiție.

În funcție de încărcarea ionică, hidrogelurile se clasifică după cum urmează (Peppas, 2004): a) hidrogeluri neutre - sunt rețele homopolimerice sau copolimerice care nu conțin grupări funcționale cu sarcină (de exemplu polietilenoxidul, poli(acrilamida), poli(2-hidroxietil metacrilatul)); b) hidrogeluri ionice sau polielectroliți și sunt preparate din monomeri ce poartă sarcini electrice.

O altă clasificare o constituie hidrogelurile care pot fi proiectate astfel încât să-și modifice proprietățile sub acțiunea unui stimul din mediul înconjurător. Acest tip de hidrogeluri, cunoscute sub denumirea de hidrogeluri sensibile/cu răspuns la stimuli, se definesc ca hidrogeluri care suferă o modificare drastică a volumului în stare gonflată, sub acțiunea unor stimuli din mediul înconjurător (Peppas, 2004 ; Gherke, 1993; de las Heras Alarcon și colab., 2005). În această categorie intră atât hidrogeluri permanente cât și

reversibile. Ele se utilizează mai ales la obținerea biosenzorilor și a sistemelor cu eliberare controlată.

Sinteza propriu-zisă a hidrogelurilor poate avea loc în mediu omogen (soluție) sau în mediu heterogen (suspensie sau emulsie).

*Sinteza hidrogelurilor în soluții.* În soluție se pot sintetiza hidrogeluri atât prin polimerizarea/reticularea unor monomeri, cât și prin reacții de reticulare ale unor polimeri preformați.

*Sinteza hidrogelurilor în mediu dispers.* Reacția de polimerizare/reticulare în suspensie sau emulsie este procedeu preferat de obținere a hidrogelurilor, deoarece materialul se obține sub formă de microparticule de hidrogel sferice, cu diametrul între 1 micron și 1 mm, ușor de separat din mediul de dispersie (Peppas, 1993). De asemenea, în acest caz nu apar probleme cu transferul termic.

#### *Proprietăți ale hidrogelurilor*

În afara capacității mari de gonflare hidrogelurile prezintă și alte proprietăți interesante care le fac utilizabile în multe domenii, și mai ales, în cel medical. Multe geluri prezintă tixotropie, adică devin fluide dacă sunt agitate, iar când agitarea încetează, se resolidifică. Înlocuind lichidul din geluri cu aer, se obțin aerogeluri. Aerogelurile prezintă proprietăți excepționale: densitate scăzută, suprafață specifică mare, calități de izolatori electrici. Hidrogelurile sunt flexibile, durabile și permeabile pentru apă, metaboliți și molecule mici. Folosirea hidrogelurilor în calitate de materiale suport pentru imobilizarea enzimelor este justificată de conținutul ridicat de apă care asigură enzimelor condiții de biocataliză apropiate de cataliza omogenă, dar și de permeabilitatea selectivă a hidrogelurilor (El-Masry și colab. 2007).

Proprietățile hidrogelurilor depind foarte mult de gradul de reticulare, de compoziția lanțului polimeric și de interacțiile rețelei cu lichidele înconjurătoare.

Gelurile polimerice au un rol important în domeniul tehnologic cum ar fi: sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, senzori, materiale superabsorbante, purificarea apei.

#### *Utilizări ale hidrogelurilor*

Utilizările numeroase pe care hidrogelurile le au se datorează proprietăților lor remarcabile (Ulijin și colab. 2007), dintre care cele mai importante sunt:

- conținutul de apă și elasticitatea care le fac similare cu țesuturi naturale, din punct de vedere al interacțiunilor biologice la nivel molecular;
- proprietățile mecanice și gradul de gonflare în apă (cantitatea de apă reținută) ale hidrogelurilor pot fi reglate relativ ușor, de exemplu prin modificarea densității de reticulare;
- hidrogelurile pot fi proiectate să-și modifice proprietățile sub acțiunea unor stimuli externi, cum ar fi temperatura, pH-ul, etc.

În medicină și farmacie, principalele utilizări ale hidrogelurilor sunt în domeniul biosenzorilor, eliberării controlate a medicamentelor și regenerării țesuturilor. Alte potențiale aplicații medicale sunt: materiale pentru tendoane artificiale, membrane pentru rinichi artificiali, cartilaje articulare, piele artificială, materiale pentru înlocuirea corzilor vocale.

Utilizările hidrogelurilor în agricultură au ca rol principal păstrarea apei în sol sau eliberarea controlată a pesticidelor sau fertilizatorilor. În primul caz, aplicația se bazează pe capacitatea hidrogelurilor de a absorbi rapid o cantitate mare de apă și de a o elibera apoi treptat, asigurând alimentarea plantelor cu apă o perioadă mai îndelungată după ce udarea terenului (ploaie sau irigații) a încetat.

Hidrogelurile ca sisteme cu eliberare controlată a fertilizatorilor în agricultură prezintă avantajul major că îmbină în același dispozitiv proprietatea de absorbi apa și de a o elibera apoi lent în intervalul dintre ploii sau dintre irigații. Au deci capacitatea de stocare a apei în sol, având proprietatea de a elibera lent îngrășământul la rădăcina plantelor, cu avantajele incontestabile prezentate anterior. Din această cauză, încapsularea îngrășămintelor în

hidrogeluri cu capacitate mare de absorbție a apei a început să fie cercetată mai intens în ultima decadă, deși lucrările publicate sunt încă puțin numeroase, mai ales, în domeniul polimerilor biodegradabili.

Din studiul literaturii privind hidrogelurile cu aplicații la eliberarea controlată a fertilizanților (HECF) se pot desprinde câteva observații privind modul de sinteză, structura, modul de eliberare a fertilizantului, etc. Astfel, HECF sunt numai hidrogeluri cu reticulare covalentă, care au fost obținute prin: (co)polimerizarea radicalică convențională a unor monomeri vinilici în prezența unui agent de reticulare (Liu și colab., 2007), iradierea cu radiații de energie ridicată a unui amestec monomer vinilic - agent de reticulare (Helaly și colab., 2005) sau a amestecului a doi polimeri (Abd El-Rehim și colab., 2006), reticulare prin reacții polimer-analoage (Zhan și colab., 2004).

Din punct de vedere al procedurii de sinteză, HECF au fost obținute: în soluție, în suspensie inversă, prin dispersarea soluției apoase de monomeri într-un solvent organic nemiscibil cu apa. Metoda prezintă avantaje tehnologice evidente, deoarece HECF se obțin direct sub formă de particule.

În funcție de structura particulei de îngrășământ rezultate, hidrogelul poate forma: matricea în care este înglobat fertilizantul (Zhang și colab., 2005) sau stratul acoperitor în care este învelit fertilizantul solid (particule mono- sau multi strat) (Wu și Liu, 2007).

Ca exemple de sinteza a unor hidrogeluri cu utilizări în agricultură se pot menționa: un hidrogel pe bază de alcool polivinilic (APV), carboximetil celuloză (CMC) și poliacrilamidă reticulată, obținut prin polimerizarea radicalică în soluție apoasă a acrilamidei în prezența APV, CMC și N,N'-metilenbisacrilamidei (MBA), ca agent de reticulare (Bajpai și Giri, 2002).

Un alt hidrogel preparat în scopul utilizării la eliberarea controlată de fertilizanți a fost obținut prin copolimerizarea radicalică a acrilamidei cu acrilatul de sodiu, hidroxipropil acrilat și glicidil metacrilat, în prezență de persulfat de amoniu în calitate de inițiator. Reticularea hidrogelurilor s-a realizat în timpul polimerizării prin reacția dintre grupele epoxi din glicidil metacrilat și grupele carboxilat din unitățile de acrilat de sodiu (Wang și colab., 2007). Alte hidrogeluri au fost obținute prin iradiere (Abd El-Mohdi, 2007).

Hidrogeluri cu aplicații în agricultură au fost obținuți și prin reacții polimer analoage. De exemplu: Zhan și colaboratorii (2004), au utilizat reacția dintre alcoolul polivinilic și acidul fosforic în soluție apoasă, urmată de neutralizarea cu carbonat de sodiu. A rezultat un hidrogel reticulat prin punți fosfatice și având grupe laterale fosfat de sodiu. Acest hidrogel a avut capacitatea de a elibera lent grupe fosfat în mediu apos/umed. Mishra și colaboratorii (2004) au obținut hidrogeluri de tip amidon - alginat de sodiu prin amestecarea soluțiilor apoase ale acestor polimeri, urmată de precipitare într-o soluție de CaCl<sub>2</sub> pentru obținerea perlelor și întărirea acestora prin reticulare cu epiclorigidrină. S-au obținut și hidrogeluri cu aplicații în agricultură de tip compozit. Hidrogelurile compozite au fost utilizate atât în calitate de matrice, cât și ca strat acoperitor al particulei de îngrășământ.

În urma studiului de literatură, referitor la obținerea, caracterizarea și utilizările hidrogelurilor în agricultură, se pot trage următoarele concluzii:

- Pentru sinteza hidrogelurilor prin procedeul în soluție, solventul a fost apa, iar la sinteza prin procedeul în suspensie inversă, mediul de dispersie utilizat în toate cazurile a fost ciclohexanul, în care a fost dispersat monomerul/polimerul sub formă de soluție apoasă. Stabilizatorii folosiți au fost Span 80 sau amestec Span 80/octil fenol polietoxilat.
- Monomerii principali utilizați în practic toate cazurile sunt acrilamida (AAM) și acidul acrilic (AAC), ca atare sau neutralizat parțial sau total (amoniac sau hidroxid de potasiu), deși există și alți monomeri vinilici solubili în apă care dau polimeri hidrosolubili, cum ar fi, 2-hidroxietil acrilatul și 2-hidroxietil metacrilatul, acidul metacrilic, vinil pirolidona, vinil piridina, etc. AAM și AAC au fost homopolimerizați sau copolimerizați, în prezența unor

monomeri divinilici, ca agenți de grefare, cel mai frecvent folosit fiind N,N'-metilenbisacrilamida. Mult mai rar folosiți și doar în calitate de comonomeri ai unuia din cei doi monomeri principali, au fost acidul maleic, acidul itaconic, acidul crotonic, anhidrida maleică, hidroxipropil acrilatul.

□ De asemenea, au fost sintetizate și hidrogeluri pe bază de polimeri biodegradabili, atât naturali, cum ar fi carboximetilceluloza, carboximetilamidonul, amidonul, alginatul de sodiu, cât și sintetici, ca alcoolul polivinilic, în general alături de poli(acril)amidă sau acid poli(acril)ic. Aceștia au fost utilizați din cauza necesității gradului de biodegradabilitate și, în consecință, a reducerii poluării globale. Totuși, se pare că utilizarea lor la ora actuală pe scară mai largă este împiedicată de prețul de cost mai ridicat, comparativ cu poli(acril)amida sau acidul poli(acril)ic.

□ Inițiatorii folosiți au fost persulfatați solubili în apă, de amoniu sau potasiu, singuri sau sub formă de sistem redox cu sulfitul de sodiu.

### *1.3 Natura chimică a fitosubstanțelor cu potențial antifungic și antibacterian*

Studiile asupra naturii chimice a substanțelor naturale au aratat că acestea aparțin, ca structură chimică, diferitelor grupe majore de principii active dintre care se menționează: flavonoidele, fenolii și acizii fenolici, chinonele, tioglicozidele (tioheterozide), saponozidele, alcaloizii, terpenoidele și uleiurile esențiale, cumarinele și compușii sulfurați.

Utilizarea plantelor medicinale și aromatice precum și a altor materii vegetale în terapia afecțiunilor infecțioase, atât pentru organismele umane cât și vegetale reprezintă o componentă tradițională a modului de viață. Există mai mult de 600 de plante pentru care au fost evidențiate proprietăți antifungice și a căror compoziție chimică este intens studiată. Multe din produsele antibacteriene și antifungice utilizate în prezent au la bază compuși naturali. Studiul bibliografic, numai între anii 2000-2008, pune în evidență existența a peste 300 de metaboliți secundari cu puternice proprietăți antimicrobiene; sunt menționați în mod deosebit compușii polifenolici, care datorită potențialului antioxidant au și potențial antiinfecțios, și chinonele, care datorită complexului ireversibil pe care îl fac cu aminoacizii nucleofili din proteine, inactivează proteina și prezintă proprietăți antifungice deosebite. Astfel, o multitudine de plante și extracte vegetale sunt investigate în scopul valorificării lor în dezvoltarea unor noi agenți chimioterapeutici cu aplicabilitate în managementul sau terapia bolilor infecțioase atât la oameni cât și la plante (PLANTAVOREL-2012).

## **2. CERCETARE EXPERIMENTALĂ : Studii pentru selectarea unor surse de carbon ieftine pentru obținerea biocelulozei**

### **2.1. Cultură statică-mediul Schramm-Hestrin**

Prima serie de experiențe a fost efectuată în cultură statică, pentru a putea urmări mai ușor eventualele variații ale productivității în funcție de modificarea mediului de cultură. S-a folosit mediul Schramm-Hestrin (1954) modificat în care s-a înlocuit glucoza prin fructoză. În figura 1 este prezentată o fotografie a unei membrane de BC obținută în cultură statică, după purificare.



*Fig. 1. Membrana de BC obținută în cultură statică, după purificare.*

Membranele au fost observate folosind spectroscopia electronică de baleiaj (SEM) și, de asemenea, li s-au făcut spectre IR cu transformată Fourier, pentru a se putea face o comparație cu datele de literatură existente.

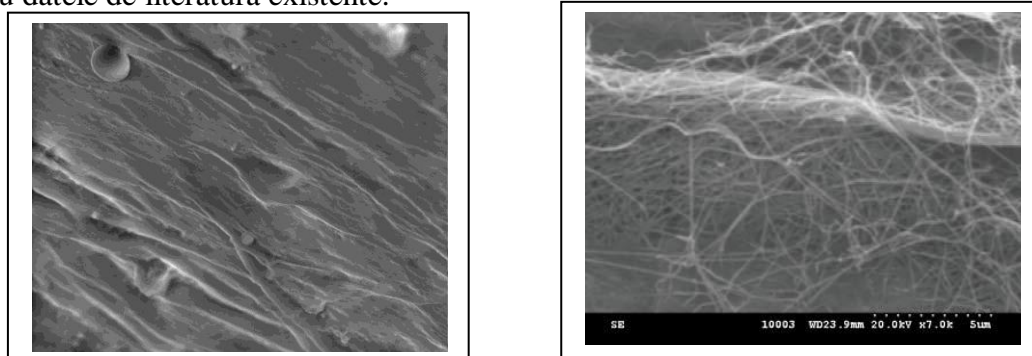


Fig. 2. Membrana de BC: imagini SEM ale suprafeței și ale fibrilelor de bioceluloză.

Structura membranelor obținute a fost studiată prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) utilizând un spectrofotometru Jasco FT/IR6200 cu microscop în infraroșu Irtron  $\mu$  și obiectiv ATR-1000-VZ. Spectrele obținute au fost media a 50 de scanări înregistrate la o rezoluție de  $4 \text{ cm}^{-1}$  pe domeniul de lungimi de undă de la  $4000$  la  $500 \text{ cm}^{-1}$ , cu un detector TGS.

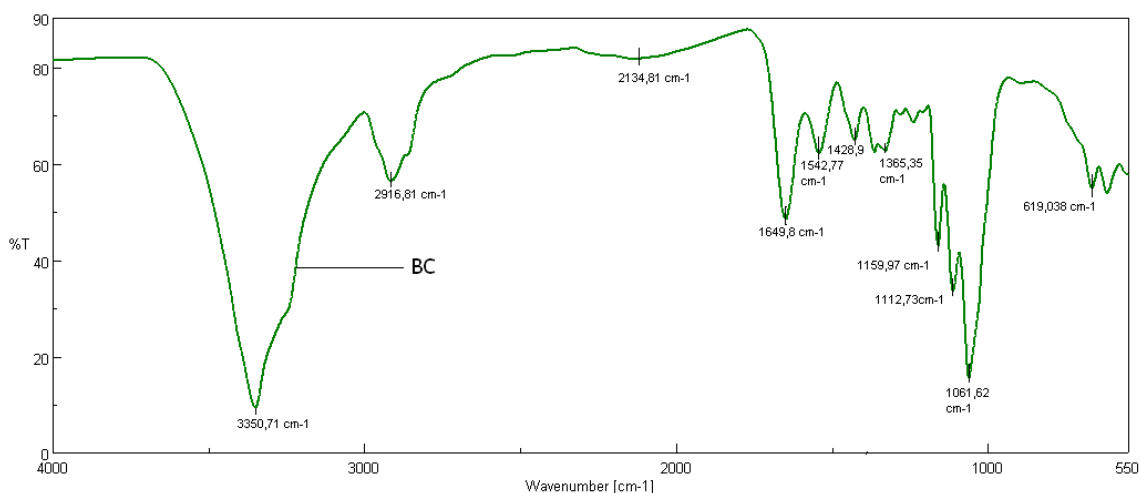


Fig. 3. Spectrul FTIR al unei membrane de BC după uscare.

În figura 3 este prezentat spectrul unei membrane BC uscate. Benzile caracteristice ale BC apar la  $3350 \text{ cm}^{-1}$  pentru vibrația grupei OH și la  $2896 \text{ cm}^{-1}$  a grupei  $\text{CH}_2$ . Picul de la  $1649,8 \text{ cm}^{-1}$  este datorat vibrațiilor simetrice de deformație ale moleculelor de apă în regiunea amorfă (umiditatea celulozei). Amprenta moleculei de celuloză este dată de picurile de la următoarele lungimi de undă:  $1313,29$  (grupa  $\text{CH}_2$ ),  $1159,97 \text{ cm}^{-1}$  vibrația asimetrică a inelului glicozidic și  $1029,8 \text{ cm}^{-1}$  vibrația grupei C-O pentru alcoolii primari și secundari.

Datele obținute arată că s-a obținut într-adevăr celuloză în urma procesului de fermentație microbiană.

În continuare sunt prezentate cercetări experimentale pentru înlocuirea surselor de azot și de carbon, cu surse alternative mai ieftine și care se găsesc în România

## 2.2. Înlocuirea sursei de azot cu polen

Primele studii au avut în vedere înlocuirea sursei de azot cu polen chiar dacă și acesta are un cost destul de mare, dar totuși inferior costului peptonei.

*Condiții de lucru:* probele notate cu B1, B2, B3 și B4 au conținut soluții de fructoză de diverse concentrații și polen hidrolizat, volumul total fiind de 200 mL. Toate probele au fost sterilizate la începutul ciclului de fermentație. Ca inocul s-a folosit bioceluloză obținută pe mediu Schramm-Hestrin. Experimentele s-au desfășurat într-un mediu având temperatura medie cuprinsă între 24-26 °C. În tabelul 2 se prezintă rezultatele experimentale obținute.

*Tabelul 2. Producția de bioceluloză obținută în cultură statică utilizând fructoză ca sursă de carbon și polen ca sursă de azot.*

Ciclul de fermentație	Durata de fermentație zile/total zile de menținere a culturii	Producția de bioceluloză uscată (g/L)			
		<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>
1	7	1.345	1.055	0.945	1.335
2	7/14	1.440	1.455	1.565	1.040
3	7/21	-	0.690	0.300	-
4	7/28	-	0.635	0.440	-
5	7/35	0.940	1.525	1.400	-
6	7/42	1.575	1.540	1.410	-
7	7/48	-	1.160	1.160	-
8	7/56	0.680	0.200	1.090	-
	Total BC	5.980	8.260	10.31	2.375

Din datele prezentate în tabelul 2 se observă că cele mai longevive culturi au fost B2 și B3, care au produs și cantități aproape egale de bioceluloză. S-a constatat că temperatura are o influență majoră asupra productivității culturilor. Culturile cu cea mai mare cantitate de fructoză și polen și cea mai mică cantitate a celor doi componenți au produs cel mai neuniform în termeni de productivitate, evident cu o producție mai mare pentru proba cu un conținut mai mare de fructoză și polen. Proba cu cele mai mici cantități a produs și cea mai mică cantitate de bioceluloză și s-a desființat cel mai devreme, deoarece a prezentat urme de infecție.

### **2.3. Înlocuirea sursei de carbon prin utilizarea sucurilor de fructe**

Din cauza costului mare al surselor de carbon tradiționale (glucoză, fructoză) celuloza bacteriană obținută este încă destul de scumpă, pentru a se putea trece la producția la scară industrială. Din acest motiv există multe cercetări în care s-au testat și alte surse mai ieftine de carbon, cum ar fi sucuri de fructe sau de legume și reziduuri industriale obținute de la prelucrarea unor produse agricole (Jagannath și colab. 2011). Se pot aminti în acest context: deșeuri de la prelucrarea ananasului, a perelor japoneze, grape-fruits și a sfelei (reziduuri de melasă), de la fabricarea berii, de la prelucrarea porumbului, a laptelui (zer), sau a reziduurilor de glicerină de la fabricarea biodieselului. Au fost testate și reziduuri lemnoase zaharificate, așa numitele deșeuri lignocelulozice. Toate aceste surse conțin amestecuri de zaharuri de la glucoză și până la maltoză, arabinoză, xiloză și galactoză.

Pornind de la datele din literatură, s-au testat diverse sucuri de fructe autohtone ca sursă de carbon pentru creșterea biocelulozei. Pentru comparație s-a utilizat și suc de ananas, pentru că acesta fiind mai intens studiat, mai ales, în țările în care se produce la scară mare, există multe referințe de literatură pentru acest tip de sursă de carbon.



### 2.3.1. Influența adaosului de pulpă de ananas asupra producției de bioceluloză

Compoziția mediului utilizat este prezentată în Tabelul 3. Se precizează că pulpa de ananas a fost alimentată doar la începutul experimentului, ulterior volumul menținându-se constant doar prin adaos de oțet de mere. Culturile au fost inoculate cu pelicule obținute pe mediul Schramm-Hestrin.

Tabelul 3. Compoziția inițială a mediului de fermentație

Numărul probei	Volum inițial (mL) Oțet de mere	Volum de pulpă de ananas (mL)	Observații
A0	200	-	Proba martor
A1	200	50	Rap 1/4
A2	200	100	Rap 1/2

Rezultatele obținute după mai mult de o lună de menținere a culturilor sunt prezentate în Tabel 4.

Tabelul 4. Masa biocelulozei obținute în cultură statică utilizând pulpă de ananas

Ciclul de fermentație	Durata de fermentație zile/total zile de menținere a culturii	Masa biocelulozei uscate (g)			Observații
		AO	A1	A2	
0					
1	8	0.230	0.225	-	pH=2-3 t=22 <sup>0</sup> C
2	10/18	0.151	0.333	0.318	
3	8/26	0.100	0.165	0.230	pH=2-3
4	8/34	0.170	0.190	0.235	
5	8/42	0.045	0.065	0.060	Temp. mari ale aerului 35 <sup>0</sup> C
6	7/49	0.239	0.277	0.302	
7	7/56	0.208	0.245	0.264	
	Total BC	1.142	1.500	1.409	

Din datele de mai sus se observă că cele mai mari fluctuații ale productivității au fost pentru proba martor, în care s-a utilizat doar oțet de mere. Cea mai bună productivitate a avut-o cultura care a conținut ananas în raport de 1/4 față de oțetul de mere. S-au efectuat experiențe și cu alte sucuri de fructe cum ar fi mere, pere, prune, portocale, dar care nu au dat încă rezultatele așteptate. Experiențele vor fi continuate pentru depășirea dificultăților întâmpinate până acum și pentru găsirea soluțiilor optime de producere a BC.

### 2.3.2. Influența altor sucuri de fructe asupra producției de bioceluloză

Alte experimente s-au efectuat cu sucuri de vișine și zmeură, sucul de ananas fiind folosit numai pentru comparație. Detaliile experimentale sunt prezentate în raportul științific al UPB (2012). Rezultatele obținute sunt prezentate sub formă grafică, în figura 4. Se observă că atât sucul de vișine cât și cel de zmeură conduc la productivități ale BC, comparabile cu cele ale ananasului. Într-o altă serie de experimente s-au utilizat sucuri și pulpă de afine și mure (UPB, 2012). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 5. Din tabelul 5 se observă că afinele au

dus la cea mai mare producție de BC, până la ciclul al 3-lea, după care cultura a intrat în declin. În schimb, deși murele au dus la o producție mai mică, cultura a fost mai longevivă.

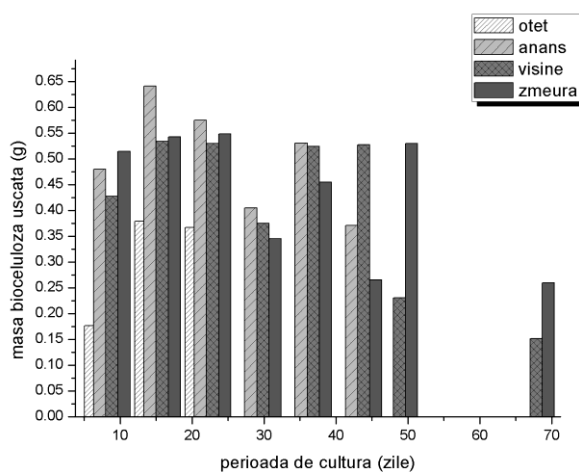


Fig. 4. Cantitatea de bioceluloză uscată obținută în diverse medii de cultură conținând pulpă de ananas, vișine sau zmeură.

Tabelul 5. Producția de bioceluloză utilizând ananas, afine și mure ca surse de carbon

Ciclul de fermentație	Durata de fermentație zile/total zile de menținere a culturii	Oțet	Masa biocelulozei uscate (g/L)		
			Ananas 1:1	Afine 1:2	Mure 1:2
1	11	-	1.212	1.57	3.39
2	16/27	-	0.420	2.80	-
3	13/40	2.105	1.451	6.32	5.55
4	7/47	-	0.473	0.72	-
5	8/54	-	0.593	1.50	1.79

#### 2.4. Modelarea statistică a producției de bioceluloză din medii cu fructoză și polen hidrolizat

Productivitatea reactorului de bioceluloză în cultură statică, în care mediul de cultură este format din fructoză și polen hidrolizat, depinde de următorii parametri: concentrația fructozei în mediul de cultură, concentrația polenului hidrolizat în mediul de cultură și numărul de cicluri de utilizare a mediului de cultură. Matricea experimentală, cu valorile factorilor care influențează producția de bioceluloză și cu variabila de raspuns (productia de bioceluloza), este prezentată în tabelul 6.

Tabelul 6. Matricea experimentului 2<sup>3</sup> pentru exprimarea dependenței productivității reactorului în cultură statică (y) de c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>, și n

N.ex	c <sub>1</sub> (g/l)	c <sub>2</sub> (g/l)	n (-)	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	y (g <sub>bc us</sub> /1 zi)
1	22.5	12.5	1	+1	+1	-1	1.345/7
2	22.5	12.5	5	+1	+1	+1	0.94/7
3	22.5	6.25	1	+1	-1	-1	1.055/7
4	22.5	6.25	5	+1	-1	+1	1.525/7
5	10	12.5	1	-1	+1	-1	0.945/7
6	10	12.5	5	-1	+1	+1	1.403/7
7	10	6.25	1	-1	-1	-1	1.335/7
8	10	6.25	5	-1	-1	+1	0.925/7

În acord cu cerințele de validare a modelului statistic, rezultat în baza programului factorial complet (program 2<sup>3</sup> în cazul de față), trebuie stabilită dispersia cauzată modelului de fiecare termen al acestuia. Pentru a calcula dispersia de reproductibilitate, în tabelul 7 se prezintă rezultatul a 3 măsurători de creștere a biocelulozei obținute cu reactorul în cultură statică, în condițiile în care valorile factorilor corespund centrului planului experimental (c<sub>1c</sub> =16,25 g<sub>fr</sub>/l, c<sub>2c</sub> = 9,375 g<sub>po</sub>/l, respectiv n<sub>c</sub> = 3)

Tabelul 7. Rezultate privind reproductibilitatea productivității în bioceluloză a reactorului în cultură statică

N.ex	c <sub>1</sub> (g <sub>fr</sub> /l)	c <sub>2</sub> (g <sub>po</sub> /l)	c <sub>3</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	y(g <sub>bc us</sub> /1 zi)
1	16,25	9,375	3	0	0	0	1,1965
2	16,25	9,375	3	0	0	0	1,1848
3	16,25	9,375	3	0	0	0	1,2671

Coefficienții modelului statistic aferent cazului experimentului factorial complet de tip 2<sup>3</sup> se vor calcula din relația de mai jos:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (1)$$

Coefficienții au fost determinați, testați ca semnificație utilizând un model adecvat (UPB, 2012). Productivitatea reactorului în cultură statică depinde de concentrația de fructoză, de concentrația de polen hidrolizat și de numărul de cicluri de folosire a mediului de cultură după relația (2):  $y_m(x_1, x_2, x_3) = 0.169 - 0.031x_1 x_2 x_3$  (2)

Rezultatele obținute după modelarea statistică sunt prezentate și în formă grafică, ca suprafețe de răspuns, care prezintă variația a doi dintre parametri, în condițiile în care cel de-al treilea parametru are o valoare constantă. În figura 5 este prezentată dependența productivității specifice a bioreactorului în cultură statică de concentrația fructozei (x<sub>1</sub>) și a polenului hidrolizat (x<sub>2</sub>), după un ciclu de utilizare a mediului de lucru (x<sub>3</sub>=-1).

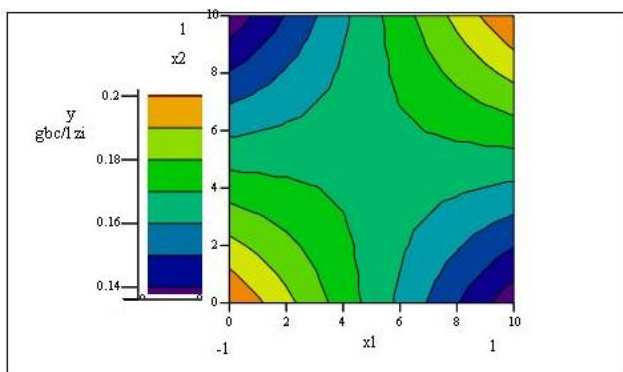


Figura 5. Dependența productivității specifice a bioreactorului în cultură statică de concentrația fructozei ( $x_1$ ) și a polenului hidrolizat ( $x_2$ ), după un ciclu de utilizare a mediului de lucru ( $x_3 = -1$ )

O altă interpretare a relației obținute poate fi dată considerând productivitatea specifică a biocelulozei ca o viteză medie de producere a biocelulozei în reactor. Dacă se consideră pentru viteza de producere a biocelulozei o exprimare tip Monod, atunci se poate scrie relația de mai jos ce permite exprimarea, în medie, a vitezei maxime de creștere ( $v_{max}$ ) și a constantei Monod ( $k$ ).

$$y = 0.169 - 0.031x_1x_2x_3 = \frac{v_{max}}{1 + k/c_{st}} \quad (3)$$

Pentru determinarea parametrilor cinetici ( $v_{max}$  și  $k$ ) concentrația totală de substrat se va considera ca fiind suma concentrației fructozei și a polenului hidrolizat, întrucât ambele sunt surse de carbon la creșterea biocelulozei. După prelucrarea datelor, rezultatele obținute la creșterea biocelulozei în cultură statică sunt:  $v_{max} = 0,31 \text{ g}_{bc}/(1 \text{ zi})$  și  $k = 24,568 \text{ g/l}$ , în condițiile în care concentrația totală de substrat (fructoză și polen hidrolizat) este cuprinsă între 16,5 g/l și 34 g/l, temperatura culturii este de 25 °C, iar raportul A/V al reactorului în cultură statică este 1/2. Din păcate, această valorificare a măsurătorilor nu evidențiază efectul numărului de cicluri de folosire a mediului de cultură asupra vitezei medii de creștere a biocelulozei.

## 2.5. Concluzii-obținere bioceluloză

Datele experimentale obținute la cultivarea în regim static a biocelulozei au aratat că se poate obține celuloză de bună calitate și în concentrație comparabilă cu cea obținută pe medii tradiționale (și mai scumpe) folosind sucuri de fructe dintre cele autohtone. Cultivarea pe mediu de ananas s-a făcut numai pentru referință, sucul de ananas fiind folosit de mai mulți cercetători din țări producătoare a acestui fruct. Rezultatele modelării statistice au arătat că toate variabilele implicate în proces sunt importante: concentrația de substrat, concentrația sursei de azot și numărul de cicluri de folosire a unei culturi.

## 3. CERCETARE EXPERIMENTALĂ : Studii privind selectarea de hidrogeluri polimerice în vederea obținerii de matrici superabsorbante

### 3.1. Materiale și metode

Acidul acrilic (AA, Sigma-Aldrich, 99%) a fost distilat în vid pentru îndepărtarea inhibitorului de polimerizare. Persulfatul de potasiu (KPS, Acros Organics, 99%) și metabisulfatul de sodiu (MS, Acros Organics, 97%) au fost folosiți ca inițiatori ai procesului de polimerizare. N,N'-metilenbisacrilamida (MBA, Sigma-Aldrich, 99%) a fost folosită ca agent de reticulare. Toate aceste substanțe au fost folosite fără o purificare prealabilă.

### 3.2. Sinteza hidrogelurilor superabsorbante cu aplicații în agricultură și caracterizarea acestora

A fost preparată o soluție mămă din cantitățile corespunzătoare de apă distilată, acid acrilic (neutralizat 30% cu NH<sub>3</sub>), N,N'-metilenbisacrilamidă și soluțiile sistemului redox de inițiere. Pentru omogenizare, amestecul de reacție a fost menținut sub agitare mecanică timp de 2 minute, soluția astfel obținută fiind apoi turnată în fiole de sticlă cu un diametru de 10 mm. În amestecul de reacție a fost purjat azot timp de 2-3 min pentru îndepărtarea oxigenului dizolvat, după care fiolele au fost sigilate cu dopuri din plastic și ținute la temperatura camerei. La finalul timpului de reacție (24 ore), fiolele au fost sparte și hidrogelurile obținute au fost tăiate în bucăți mici sub formă de cilindru cu o grosime de aproximativ 1 cm. O bucată de hidrogel astfel obținută, a fost introdusă într-un pahar cu apă distilată și ținută timp de 5 zile la temperatura camerei. Apa a fost schimbată zilnic pentru îndepărtarea monomerului nereacționat. După această etapă de purificare/gonflare, hidrogelurile obținute au fost introduse într-o etuvă la 40°C, până la o greutate constantă, în vederea determinării gradului de gonflare. Restul bucăților de hidrogeluri purificate au fost de asemenea uscate la 40°C în etuvă, până la greutate constantă.

#### 3.2.1. Determinarea gradului de gonflare

Gradul de gonflare a fost determinat ca fiind raportul dintre cantitatea de apă adsorbită de hidrogel în timpul perioadei de purificare-gonflare și masa de polimer uscat (xerogel) conform următoarelor formule:

$$GG = \left[ \frac{(m_{\text{gonflat}} - m_{\text{uscat}})}{m_{\text{uscat}}} \right] \cdot [g_{\text{apa}} / g_{\text{xerogel}}]; \quad (4)$$

#### 3.2.2. Caracterizarea probelor

Analizele FTIR au fost realizate pe un echipament Nicolet Model 500, folosind media a 32 de scanări cu rezoluția de 4 cm<sup>-1</sup>, din pastile de KBr. Analizele termogravimetrice simultane DSC-TGA(SDT) au fost făcute cu ajutorul unui instrument TA Instruments SDT600. Termogramele au fost înregistrate cu o viteză de încălzire de 10°C/min, folosind 5-10 mg de material. Experimentele au fost realizate sub atmosferă de azot, cu un debit de 100 mL/min.

### 3.2. Rezultate și discuții

S-a avut în vedere obținerea unor hidrogeluri superabsorbante cu diverse concentrații de monomer [AA]. Hidrogelurile superabsorbante obținute au fost denumite XPAA, unde X reprezintă concentrația molară de AA raportată la cantitatea totală de apă utilizată. Rețetele de sinteză ale hidrogelurilor pe bază de acid poli-acrilic cu diferite cantități de monomer sunt prezentate în tabelul 8.

**Tabelul 8.** Rețetele de sinteză ale hidrogelurilor cu concentrații de monomer diferite.

Proba	[AA·NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mol/l) față de H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O (ml)	[MBA](%) față de [AA]	[KPS/MS] (%) față de AA
1,5 PAA	1,5	5	1	1
2 PAA	2	5	1	1
2,5 PAA	2,5	5	1	1
3 PAA	3	5	1	1

A fost studiată și obținerea de hidrogeluri cu diverse concentrații de agent de reticulare [MBA]. Hidrogelurile obținute, au fost denumite ca PAA(YMBA), unde Y reprezintă procente molare de [MBA] față de [AA]. Rețetele de sinteză ale hidrogelurilor obținute pe

bază de acid poliacrilic cu diferite procente molare de agent de reticulare sunt prezentate în tabelul 9.

A fost studiată și influența concentrației sistemului redox de inițiere asupra proprietăților finale ale hidrogelurilor. Materialele compozite obținute au fost denumite PAA(ZKPS/MS), unde Z reprezintă procentele molare de sistem redox de inițiere (KPS=MS=1) raportat la [AA]. Rețetele de sinteză ale hidrogelurilor pe bază de acid poliacrilic cu diferite concentrații de inițiator sunt prezentate în tabelul 10.

**Tabelul 9.** Rețetele de sinteză ale hidrogelurilor cu diferite procente molare de agent de reticulare.

Proba	[AA·NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mol/l) față de H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O (ml)	[MBA] (%) față de [AA]	[KPS/MS] (%) față de AA
PAA(0.5MBA)	2	5	0,5	1
PAA(1MBA)	2	5	1	1
PAA(1.5MBA)	2	5	1,5	1
PAA(2MBA)	2	5	2	1

**Tabelul 10.** Rețetele de sinteză ale hidrogelurilor cu diferite concentrații de sistem redox de inițiere.

Proba	[AA·NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mol/l) față de H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O (ml)	[MBA](%) față de [AA]	[KPS/MS] (%) față de AA
PAA(0.5KPS/MS)	2	5	1	0,5
PAA(1KPS/MS)	2	5	1	1
PAA(1.5KPS/MS)	2	5	1	1,5
PAA(2KPS/MS)	2	5	1	2

### 3.2.1. Analize spectroscopice FTIR

Spectrele FTIR ale noilor hidrogeluri superabsorbante pe bază de poli (AA-co-MBA) cu conținut diferit de monomer [AA] au prezentat toate benzile caracteristice polimerului acrilic, după cum se poate observa și din figura 6. Spectrul xerogelului pe bază de poli(AA-co-MBA), prezintă picuri la lungimea de undă 2924 cm<sup>-1</sup> și la 2851 cm<sup>-1</sup>, caracteristice grupării -CH<sub>2</sub>, picul de la 1710 cm<sup>-1</sup> a fost atribuit lungimilor de undă caracteristice grupărilor carboxilat protonate care formează un dimer ciclic, în timp ce cele două benzi, aproape de 1560 cm<sup>-1</sup> și 1410 cm<sup>-1</sup>, sunt caracteristice vibrațiilor de întindere asimetrice și simetrice C-O, corespunzătoare grupărilor carboxilat. Banda largă de absorbție între 2500-3300 cm<sup>-1</sup> poate fi atribuită prezenței grupării OH corespunzătoare grupării carboxilice din AA.

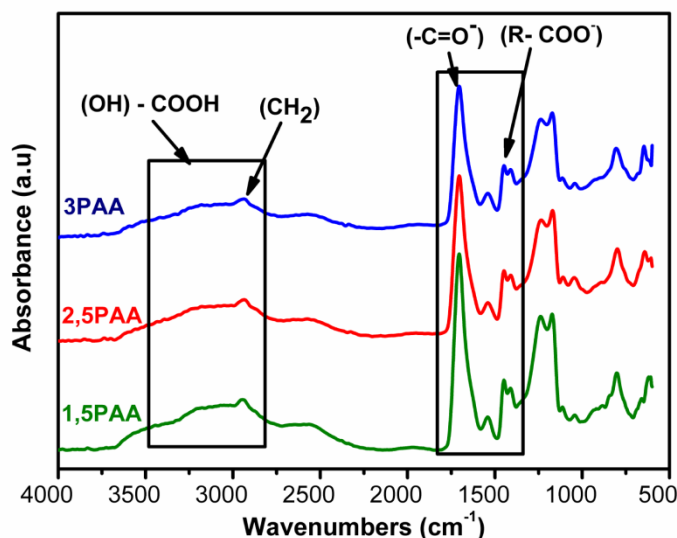


Fig.6. Spectrele FTIR ale hirogelurilor pe bază de poli(AA-co-MBA), cu un conținut diferit de monomer [AA].

### 3.2.2. Studiul comportamentului termic (TGA/DTG)

În figura 7 sunt prezentate curbele TGA și DTG caracteristice hirogelurilor superabsorbante ce au în compoziție o concentrație de acid acrilic [AA] egală cu 3 mol/L. În cazul noilor hirogeluri superabsorbante comportamentul termic de degradare a fost complex, putându-se observa trei mari etape de degradare. Astfel, din curbele TGA se poate observa o pierdere de masă de 82,11%. De asemenea, din curbele DTG se poate observa faptul că prima etapă, ce a avut loc la un maxim de 189°C, prezintă o pierdere de masă de 8,07% asociată cu procesul de eliberare al apei. A doua etapă, ce a avut loc la un maxim de 261°C, prezintă o pierdere de masa de 23,54% asociată procesului de dehidroxilare a acidului carboxilic, urmat de procesul de decarboxilare, iar a treia etapă a fost observată la un maxim de 397°C, cu o pierdere de masă de 50,50% asociată cu procesul de degradare al lanțurilor polimerice mai mici, rămase în urma scindării lanțului polimeric inițial.

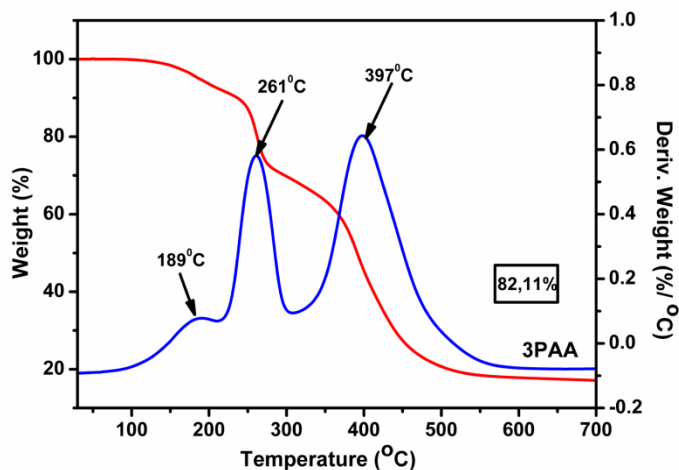


Fig.7. Curbele TGA si DTG ale hirogelurilor pe bază de poli(AA-co-MBA) cu o concentrație de acid acrilic egală cu 3 mol/L.

### 3.2.3. Influența concentrației totale a reactanților asupra gradului de gonflare (absorbției de apă)

Hirogelurile astfel obținute au fost caracterizate în scopul determinării influenței concentrației de reactanți (concentrația de monomer, concentrația de agent de reticulare și concentrația sistemului redox de inițiere) asupra gradului de gonflare/absorbției de apă.

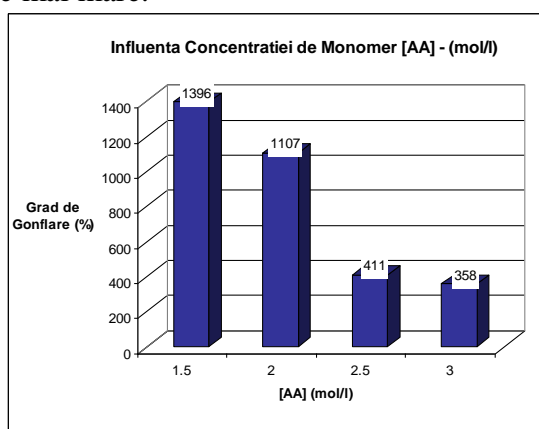
a) Influența concentrației de monomer asupra gradului de gonflare

Așa cum a fost menționat anterior, s-au folosit 4 concentrații molare de [AA] (tabelul 11) în vederea obținerii unor hidrogeluri superabsorbante cu diferite rapoarte  $[H_2O]/[PAA]$ . Pentru a se verifica influența concentrației de monomer asupra gradului de gonflare (GG) a noilor hidrogeluri obținute, concentrația de [AA] a fost modificată, în timp ce celelalte rapoarte de reacție au fost menținute constante,  $[MBA]/[AA]$  și  $[KPS/MS]/[AA]$ .

**Tabel. 11. Influența concentrației de monomer asupra gradului de gonflare**

Variația concentrației de monomer [AA]				
Proba	[AA] (mol/l)	mg(g)	mu(g)	GG(%)
<b>1.5 PAA</b>	<b>1.5</b>	14.4782	0.9677	<b>1396</b>
<b>2 PAA</b>	<b>2</b>	12.7401	1.0556	<b>1107</b>
<b>2.5 PAA</b>	<b>2.5</b>	5.9626	1.1677	<b>411</b>
<b>3 PAA</b>	<b>3</b>	4.8842	1.066	<b>358</b>

În figura 8 se poate observa influența concentrației de monomer asupra gradului de gonflare a hidrogelurilor sintetizate. Se poate observa faptul că utilizarea unei concentrații mici de monomer a condus la creșterea gradului de gonflare. O posibilă explicație a acestui fenomen constă în faptul că la utilizarea unei concentrații scăzute de monomer [AA] se obțin hidrogeluri cu grad de reticulare mai mic, diluția favorizând formarea unor bucle în locul punctelor de reticulare, micșorând astfel numărul de lanțuri din rețea ce prezintă eficacitate din punct de vedere elastic. Astfel, în același timp cu scăderea concentrației de monomer utilizat, se obțin hidrogeluri cu un grad de reticulare mai mic și în consecință cu un grad de gonflare mai mare.



**Fig.8. Influența concentrației de monomer [AA] asupra gradului de gonflare (GG).**

De menționat este faptul că în cazul utilizării unei concentrații molare de acid acrilic de 1,5 și 2 mol/l, au fost obținute hidrogeluri cu grad de gonflare mare ( $>1000$  g de apă/g de xerogel), hidrogeluri care pot fi folosite ca materiale superabsorbante ce pot îmbunătăți reținerea apei în sol.

*b) Influența concentrației agentului de reticulare asupra gradului de gonflare*

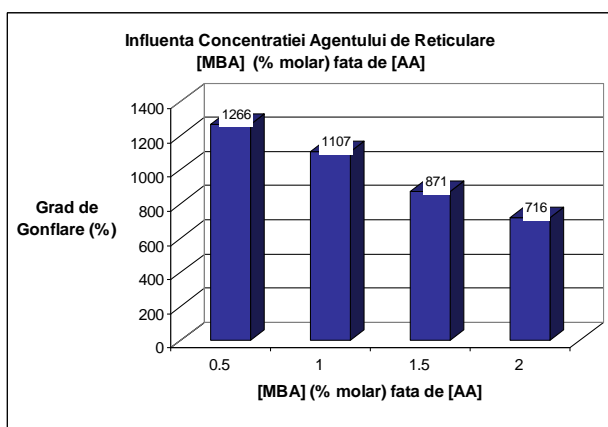
De asemenea, a fost investigată și variația concentrației agentului de reticulare [MBA] asupra gradului de gonflare. Așa cum s-a observat și în studiul de literatură, creșterea concentrației de agent de reticulare utilizat duce la obținerea unor hidrogeluri cu un grad de gonflare mic. Astfel experimentele noastre au arătat (figura 9) faptul că, prin creșterea concentrației [MBA] a rezultat o scădere constantă a absorbției de apă, din cauza obținerii unor hidrogeluri cu grade de reticulare crescute. Rezultatele obținute (tabelul 12) sunt într-o bună concordanță cu cele raportate în literatura de specialitate (Teodorescu și colab. 2009).



**Tabelul 12.** Influența concentrația de agent de reticulare asupra gradului de gonflare

<b>Variația concentrației agentului de reticulare [MBA]</b>				
<b>Proba</b>	<b>[MBA](%)molar fata de [AA]</b>	<b>mh(g)</b>	<b>mx(g)</b>	<b>GG(%)</b>
<b>PAA(0.5MBA)</b>	<b>0.5</b>	14.199	1.0392	<b>1266</b>
<b>PAA(1MBA)</b>	<b>1</b>	12.7401	1.0556	<b>1107</b>
<b>PAA(1.5MBA)</b>	<b>1.5</b>	9.9626	1.0257	<b>871</b>
<b>PAA(2MBA)</b>	<b>2</b>	8.9986	1.1026	<b>716</b>

De menționat este faptul că în cazul utilizării unor procente molare de MBA de 0,5 și 1 mol/L, au fost obținute hidrogeluri cu grad de gonflare mare (>1000 g de apa/g de xerogel), hidrogeluri care ar putea fi folosite ca materiale superabsorbante ce pot îmbunătăți reținerea apei în sol.



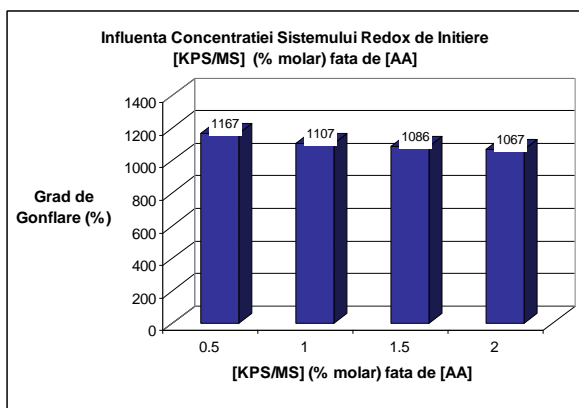
**Fig.9.** Influența concentrației agentului de reticulare [MBA] asupra gradului de gonflare (GG).

*c) Influența concentrației sistemului redox de inițiere asupra gradului de gonflare*

A fost determinat și efectul concentrației sistemului redox de inițiere asupra gradului de gonflare a noilor hidrogeluri sintetizate (tabelul 12). Din rezultatele obținute se poate observa faptul că, odată cu creșterea concentrație sistemului redox de inițiere, rezultă și o ușoară scădere a gradului de gonflare (GG) (figura10). Astfel, cu cât concentrația de inițiator a fost mai mare, cu atât gradul de reticulare a fost mai mare și gradul de gonflare (GG) cu atât mai mic.

**Tabelul 12.** Influența concentrației sistemului redox de inițiere asupra gradului de gonflare.

<b>Variația concentrației sistemului redox de inițiere [KPS/MS]</b>				
<b>Proba</b>	<b>[KPS/MS] (% molar) fata de [AA]</b>	<b>mh(g)</b>	<b>mx(g)</b>	<b>GG(%)</b>
<b>PAA(0,5KPS/MS)</b>	<b>0.5</b>	12.9895	1.0256	<b>1167</b>
<b>PAA(1KPS/MS)</b>	<b>1</b>	12.7401	1.0556	<b>1107</b>
<b>PAA(1.5KPS/MS)</b>	<b>1.5</b>	13.5626	1.1432	<b>1086</b>
<b>PAA(2KPS/MS)</b>	<b>2</b>	11.6986	1.0026	<b>1067</b>



*Fig.10. Influența concentrației sistemului redox de inițiere [KPS/MS] asupra gradului de gonflare (GG).*

O posibilă explicație poate consta în numărul mare de radicali primari formați, datorită sistemului redox de inițiere [KPS]/[MS] utilizat. Numărul mare de radicali primari formați participă la reacția de polimerizare, favorizând astfel obținerea unor noi hidrogeluri cu un grad de reticulare mare și, în consecință, cu un grad de gonflare mai mic (Teodorescu și colab. 2009).

### 3.3. Concluzii-Hidrogeluri superabsorbante

Au fost sintetizate prin copolimerizare radicalică noi structuri de hidrogeluri pe bază de acid poliacrilic [PAA] reticulat cu [MBA], având ca sistem de inițiere, sistemul [KPS]/[MS], în apă distilată la temperatura camerei. Hidrogelurile obținute au fost caracterizate în funcție de gradul de gonflare al apei.

Rezultatele au arătat faptul că gradul de gonflare a hidrogelurilor sintetizate a fost puternic influențat de :

- concentrația de monomer utilizată [AA], care a dus la obținerea unor hidrogeluri cu un grad de reticulare mai mic și, în consecință, cu un grad de gonflare mai mare;
- concentrația de agent de reticulare, o concentrație mai mică de [MBA] a condus la un grad de gonflare mai ridicat;
- concentrația sistemului redox de inițiere a afectat gradul de gonflare a hidrogelurilor favorizând formarea unor rețele polimerice mai reticulate, ce au condus la obținerea unor hidrogeluri cu un grad de gonflare mai mic.

Hidrogelurile astfel sintetizate prezintă un avantaj tehnologic în comparație cu hidrogelurile descrise în literatura de specialitate. Astfel, hidrogelurile pot fi sintetizate la temperatura camerei fără a mai fi necesară utilizarea unei alte surse de încălzire. Considerăm că aceste simplificări tehnologice aduc un avantaj semnificativ, din punct de vedere economic, asupra metodei noastre. Noile structuri de hidrogeluri descrise în această lucrare vor fi testate în etapa următoare în vederea creșterii biocelulozei pe suprafața lor, în scopul realizării de superabsorbantși cu un grad ridicat de biodegradabilitate.

În cadrul lucrărilor de cercetare derulate în cadrul proiectului de față ne-am propus și obținerea de copoliesteri biodegradabili, formatori de pelicule din dispersii apoase, utilizând ca materie primă în sinteza acestora deșeuri de polietilentereftalat (PET), întrucât aceste materialele de acoperire obținute prin evapoarea apei pot fi utilizate în unele aplicații la încapsularea fertilizatorilor, în scopul obținerii eliberării controlate a substanțelor active, sau care pot servi drept medii de creștere a hidrogelului de bioceluloză, potențial utilizabilă pentru încorporarea îngrășămintelor granulare în scopul eliberării controlate a nutrienților. Rezultatele obținute sunt încurajatoare și sunt prezentate pe larg în raportul științific al ICECHIM (2012).

#### 4. CERCETARE EXPERIMENTALĂ -

În tabelul 13 sunt prezentate plantele medicinale și aromatice investigate în studiul experimental de către Plantavorel (2012)

<b>Specia (Familia)</b>	<b>Denumire populară</b>	<b>Partea botanică utilizată</b>	<b>Provenienta/anul de recoltare</b>
<i>Medicago sativa</i> L. (fam. <i>Fabaceae</i> )	lucernă	Parte aeriană fără parți lemnoase	SOLARIS Serv SRL Piatra Neamț/ 2012
<i>Trigonella foenum- graecum</i> L. (fam. <i>Fabaceae</i> )	schinduf	Semițe	SCDA SECUIENI, jud. Neamț/ 2011
<i>Thymus vulgaris</i> L. (fam. <i>Lamiaceae</i> )	cimbru de gradină	Partea aeriană inflorită	SOLARIS Serv SRL Piatra Neamț/ 2012
<i>Urtica dioica</i> L. (fam. <i>Urticaceae</i> )	urzică vie	Partea aeriană	SC RAZADA SRL Brasov/ 2012
<i>Artemisia absinthium</i> L. (fam. <i>Asteraceae</i> )	pelin	Partea aeriană	NETWORK SRL Braila / 2012
<i>Equisetum arvense</i> L. (fam. <i>Equisetaceae</i> )	coada calului	tulpinile sterile	SC RAZADA SRL Brasov/ 2012
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam. (fam. <i>Fabaceae</i> )	sulfină	Parte aeriana inflorită	LARIX COMIMPEX SRL Sovata / 2012
<i>Armoracia rusticana</i> L. (fam. <i>Brassicaceae</i> )	hrean	Radacină	SOLARIS Serv SRL Piatra Neamț/ 2012
<i>Humulus lupulus</i> L. (fam. <i>Cannabinaceae</i> )	hamei	inflorescente femele	SC RAZADA SRL Brasov/ 2012
<i>Frangula alnus</i> Mill. ( <i>Rhamnus frangula</i> L.) (fam. <i>Rhamnaceae</i> )	crușin	scoarta de tulpini si ramurilor	SC RAZADA SRL Brasov/ 2011
<i>Origanum vulgare</i> L. (fam. <i>Lamiaceae</i> )	sovârf	Partea aeriană inflorită	SCDA Secuieni, jud. Neamț/ 2012
<i>Ocimum basilicum</i> L. (fam. <i>Lamiaceae</i> )	busuioc	Partea aeriană	SN PLAFAR Cluj Napoca / 2012
<i>Lavandula Angustifolia</i> L. (fam. <i>Lamiaceae</i> )	lavandă	Flori	SCDA Secuieni, jud. Neamț/ 2012
<i>Melissa officinalis</i> L. (fam. <i>Lamiaceae</i> )	melisa/roinita	Partea aeriană	SCDA Secuieni, jud. Neamț/ 2012

<b><i>Hypericum perforatum L.</i></b> (fam. <b>sunătoare</b>	partea terminală	SC RAZADA
<i>Hypericaceae</i> ( <i>Guttiferae</i> ,	inflorită a plantei	SRL Brasov/
<i>Clusiaceae</i> )		2012

Materiile vegetale recoltate au fost uscate după recoltare, natural (la umbră, în strat subțire) și/sau artificial, la 50- 60<sup>0</sup>C; excepție fac câteva produse vegetale, care s-au utilizat în stare proaspătă și pentru care există precizări în acest sens în cadrul experimentărilor. Produsele vegetale investigate îndeplinesc cerințele de admisibilitate conform unor referențiale, după cum urmează:

- Proprietăți organoleptice (aspect, culoare, miros, gust) conform FR X, Cap. IX. D.1 (Farmacopeea Europeană).
- Condiții de puritate conform (plante brunificate, părți din alte plante) FR X, Cap. IX.D.4 (Farmacopeea Europeană)
- Proprietăți fizico-chimice conform (pierdere prin uscare, cenușă, conținut în substanțe solubile) FR X, Cap. IX. C.15, Cap. IX. C.17, Cap. IX. D.8 [35 ]
- Proprietăți microbiologice (număr totali de germeni mezofili aerobi, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* conform procedurii de lucru (Ph.Eur) (Farmacopeea Romană).

Plantele medicinale și aromatice selectate în vederea investigării acoperă cele mai importante clase de substanțe cu proprietăți antibacteriene și antifungice: flavonoide, fenoli și acizi fenolici, chinone, compuși sulfurați, saponozide, triterpene și uleiuri volatile.

**Protocolul de cercetare** a fost îndreptat spre evaluarea fitochimică a speciilor selectate și punerea în evidență a substanțelor cu acțiune antibacteriană, fungică și cu conținut mineral cu potențial fertilizator, respectiv analiza fito-chimică globală (*indicarea raportului dintre cele trei grupe mari de constituenți: apă, substanțe volatile prin calcinare*) și analiza fito-chimică sistemică (*determinarea calitativă și cantitativă a claselor de principii active și minerale*). Evaluarea fitochimică complexă a speciilor vegetale selectate s-a realizat în mai multe etape, cu utilizarea de metode chimice și instrumentale în scopul caracterizării cât mai complete a materialului vegetal: *analiza chimică globală* (chimică și instrumentală); analiza fito-chimică sistemică, cu direcțiile de cercetare: *analiza calitativă* (fito-chimică generală, cromatografică), *analiza cantitativă* (chimică) și *analiza conținutului mineral* (instrumentală). Toate rezultatele obținute sunt prezentate pe larg în raportul științific de la Plantavorel (2012).

## CONCLUZII GENERALE

Obiectivele propuse în această etapă au fost atinse de toți partenerii. Astfel:

- S-a realizat un studiu de cultivare a biocelulozei în cultură statică prin modificarea surselor de azot și de carbon. S-au utilizat cu rezultate promițătoare polenul și sucurile de fructe autohtone. De asemenea, prin efectuarea unor experimente statistice s-au identificat parametrii și interacțiunile dintre aceștia, care influențează producția de bioceluloză.

- S-au sintetizat hidrogeluri de tipul poliacrilaților cu o capacitate de gonflare foarte mare și dispersii de copoliesteri biodegradabili pornind de la deșeurile de PET-uri.

- S-a studiat potențialul antibacterian, antifungic și mineralizant al mai multor plante autohtone ale căror extracte ar putea fi utilizate în compoziția materialelor superabsorbante compozite, care urmează a fi sintetizate în cadrul acestui proiect.

În cadrul diseminării rezultatelor, a fost acceptat pentru publicare un articol în *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* (Factor de impact 1,04).

## Bibliografie

- Abd El-Mohdy H. L., Water sorption behavior of CMC/PAM hydrogels prepared by  $\gamma$ -irradiation and release of potassium nitrate as agrochemical, *Reactive and Functional Polymers*, 67, 1094-1102, (2007).
- Abd El-Rehim H. A., Hegazy E-S. A., Abd El-Mohdy H. L., Effect of various environmental conditions on the swelling property of PAAm/PAAcK superabsorbent hydrogel prepared by ionizing radiation, *Journal of Applied Polymer Science*, 101, 3955-3962, (2006).
- Bajpai A. K., Giri A., Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals, *Reactive and Functional Polymers*, 53, 125-141, (2002).
- Bungay, R., & Serafica, G. (1999). Patent No. 5,955,326. USA.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2005). Bacterial Cellulose. In A. Steinbüchel, *Biopolymers* (p. 37-59). Toronto: Wiley-VCH Verlag.
- Brown, E. E., Bacterial cellulose/thermoplastic polymer nanocomposites, A thesis for Master of Science in Chem. Eng., Dept. of Chem. Eng., Washington State University, (2007).
- Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., Shoda, M. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 345-352 (2000).
- El-Masry M. M., Elnashar M. M. M., El-Sherif H. M., Amphoteric Hydrogels for Immobilization of Enzymes Using Template Polymerization Technique, *J. Appl. Polym. Sci.*, 106, 3571-3580, (2007).
- \*\*\* Farmacopeea Europeana, ed. a-V-a.
- \*\*\* Farmacopeea Romana, ed. a-X-a.
- Gehrke S. H., Synthesis, equilibrium, swelling, kinetics, permeability and applications of environmentally responsive gels, *Advances in Polymer Science*, 110, 81–144, (1993).
- Helaly F. M., Essawy H. A., El-Nashar D. E., Maziad N. A., Slow Release of Urea as a Source of Nitrogen from Some Acrylamide and Acrylic Acid Hydrogels, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 44, 253 – 263, (2005).
- Hennink W. E., van Nostrum C. F., Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 13–36, (2002).
- de las Heras Alarcon C., Pennadam S., Alexander C., Stimuli responsive polymers for biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 34, 276–285, (2005).
- ICECHIM-Raport științific: Materiale biopolimerice superabsorbante pentru utilizări agricole – Sabiom, Contract în cadrul Programului Parteneriate în Domenii Prioritare nr. 114/2012 – etapa 1 (2012).
- Iguchi M., Yamanaka S., Budhinovo A., Bacterial cellulose-a masterpiece of nature'arts, *J. Mat. Sci.*, 35, 261–270 (2000).
- Jonas R., Farah L.F., Production and application of microbial cellulose, *Polym. Degrad. Stabil.* 59, 101–106 (1998).
- Jagannath A., Manjunatha S. S., Ravi N., Rajin P. S., The effect of different substrates and processing conditions on the textural characteristics of bacterial cellulose (Nata) produced by *Acetobacter xylinum*, *J. Food Process Eng.*, 34, 593-608, (2011).
- Kopeček J., Hydrogel biomaterials: A smart future?, *Biomaterials* 28, 5185–5192, (2007).
- Liu M., Liang R., Zhan F., Liu Z., Niu A., Preparation of superabsorbent slow release nitrogen fertilizer by inverse suspension polymerization, *Polymer International*, 56, 729-737, (2007).

- Mishra S., Bajpai J., Bajpai A. K., Evaluation of the water sorption and controlled-release potential of binary polymeric beads of starch and alginate loaded with potassium nitrate as an agrochemical, *Journal of Applied Polymer Science*, 94, 1815-1826, (2004).
- Noro N., Sugano Y., Shoda M., Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 199–205, (2004).
- Peppas N. A., Khare A. R., Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11, 1-35, (1993).
- Peppas N. A., Hydrogels, in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2-nd ed., New York, pp. 100, (2004).
- PLANTAVOREL- Raport științific: Materiale biopolimerice superabsorbante pentru utilizări agricole – Sabiom, Contract în cadrul Programului Parteneriate în Domenii Prioritare nr. 114/2012 – etapa 1 (2012).
- Sani A., Dahman Y., Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85, 151-164, (2010).
- Pooley S. A., Rivas B. L., Lillo F. E., Pizarro G. Del C., Hydrogels from acrylic acid with N,N-dimethylacrylamide: synthesis, characterization, and water absorption properties, *J. Chil. Chem. Soc.*, 55, 19–24, (2010).
- Teodorescu M., Lungu A., Stanescu P. O., Neamțu C., Preparation and Properties of Novel Slow-Release NPK Agrochemical Formulations based on Poly(acrylic acid)Hydrogels and „Liquid Fertilizers”, *ACS-Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 6527-6534, (2009).
- Ulijin R. V., Bibi N., Jayawarna V., Thornton P. D., Todd S. J., Mart R. J., Smith A. M., Gough J. E., Bioresponsive hydrogels, *Materials Today*, 10, 40-48, (2007).
- UPB- Raport științific: Materiale biopolimerice superabsorbante pentru utilizări agricole – Sabiom, Contract în cadrul Programului Parteneriate în Domenii Prioritare nr. 114/2012 – etapa 1 (2012).
- Wang H., Wang Z., Zhu B., Preparation and properties of new non-loading and superhigh ammonium nitrate loading hydrogels, *Reactive and Functional Polymers*, 67, 225-232, (2007).
- Wu L., Liu M., Slow-Release Potassium Silicate Fertilizer with the Function of Superabsorbent and Water Retention, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46, 6494-6500, (2007).
- Zhan F., Liu M., Guo M., Wu L., Preparation of superabsorbent polymer with slow-release phosphate fertilizer, *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 3417-3421, (2004).
- Zhang J. P., Li A., Wang A. Q., Study on superabsorbent composite. V. Synthesis, swelling behaviors and application of poly(acrylic acid-co-acrylamide)/sodium humate/attapulgit superabsorbent composite, *Polymers for Advanced Technologies*, 16, 813-820, (2005).