



**UMFT**  
Universitatea de  
Medicină și Farmacie  
„Victor Babeș”  
din Timișoara

PN-III-P2-2.1-BG-2016-0455

---

# **RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC**

**PROIECT BRIDGE PN-III-P2-2.1-BG-2016-0455**

**Formulări de avangardă pe bază de eugenol nanocapsulat  
cu adresabilitate în medicina dentară**

**Denumirea etapei: Formularea, analiza, testarea și validarea gelului finit pe baza de eugenol nanocapsulat**

**Partener coordonator:** Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara

**Reprezentant legal: Rector:** Prof. Dr. Raica Marius

**Director de proiect:** Prof. Dr. Rusu Laura Cristina

**Partener economic:** SC TITUS&SONS SRL

**Autoritatea contractantă:** UEFISCDI

**Durata proiectului:** 24 luni

**Activitatea 2.1:** Folosirea eficientă, cu ajutorul expertizei echipei de proiect, a tehnologiilor moderne existente la agentul economic SC TITUS&SONS SRL și a inovării tehnologice de produs și de process pentru dezvoltarea de produse noi și/sau semnificativ îmbunătățite cu aplicabilitate în cavitatea orală

**Obiective:**

2.1 Formularea gelului finit cu principiul activ pe bază de eugenol nanocapsulat

2.2 Teste *in vitro* de profil bio-energetic al celulelor din liniile celulare NHOK și SCC-4

2.3 Teste *in vitro* pe linii celulare normale specifice NHOK și pe linii celulare tumorale SCC-4

2.5 Teste *in vivo* pe animale de laborator fără păr SKH-1

2.6 Analiza histopatologică pe mucoasă (jugală și gingivală) implantată pe membrana de ou embrionat

**Activitatea 2.2:** Analiza, testarea și validarea rezultatelor fizico-chimice de către SC TITUS&SONS SRL

**Obiective:**

2.7 Validarea cunoștințelor transferate către SC TITUS&SONS SRL, cu privire la testele fizico-chimice ale noilor formulări

## 2.1 Formularea gelului finit cu principiul activ pe bază de eugenol nanocapsulat

Primele sinteze ale sistemelor de eliberare a medicamentelor poliuretanică au fost realizate la sfârșitul secolului trecut de către echipa Hong și Park (cu o dimensiune medie de aproximativ 10.000 nm) și echipa lui Frere (între 50.000 și 200.000 nm). K. Bouchemal poate fi considerat părintele nanoparticulelor poliuretanică utilizate ca purtători de medicamente. Ea a obținut suspensii coloidale de nanocapsule poliuretanică folosind o tehnică nouă (o poliadiție interfacială combinată cu o emulsifiere spontană) în 2004.

Polieter-uretanii se obțin prin reacția dintre diizocianați cu polioli eterici, cum ar fi polietilen-glicoli (PEG), în timp ce poliester-uretanii sunt produșii de reacție dintre diferiți di-sau poli-izocianați cu polioli esterici, cum ar fi poli-epsilon-caprolactona. Există o diferență importantă între aceste două materiale poliuretanică: s-a observat că polieter-uretanii sunt foarte rezistenți la biodegradare și prezintă o eliberare foarte lentă a medicamentelor încapsulate (aproximativ 2-3 săptămâni), în timp ce poliester-uretanii sunt sensibili la hidroliză și sunt degradați în maxim 2-3 zile. Un amestec de nanoparticule poliuretanică cu conținut diferit de eter / ester reprezintă o soluție pentru a menține un anumit nivel / concentrație a substanței active în organism.

O altă posibilitate de a modifica profilul de eliberare este utilizarea nanoparticulelor cu forme diferite. Chiar dacă particulele cele mai interesante implicate în administrarea medicamentului sunt capsulele, dendrimerii polimerici reprezintă o altă cale eficientă utilizată în acest domeniu.

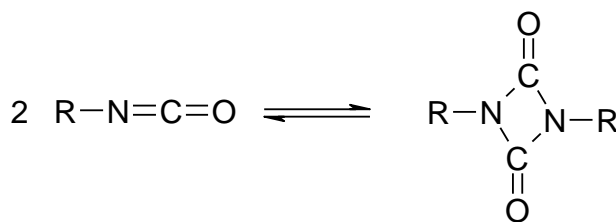
### Protocol

În gelul furnizat de către partenerul economic SC TITUS&SONS SRL s-a încorporat eugenol, particule poliuretanică goale, respectiv particule cu eugenol obținându-se trei probe distincte, notate: Eug, Part și Part+Eug.

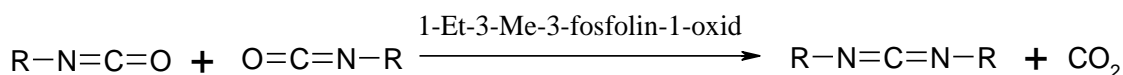
Sinteza particulelor poliuretanică se bazează pe reacția dintre diizocianați și dioli. În acest domeniu, principalele materii prime prezintă o reactivitate crescută, în special izocianații, datorită grupării lor specifice  $-N=C=O$ .

Diizocianații prezintă multe reacții secundare, din care amintim:

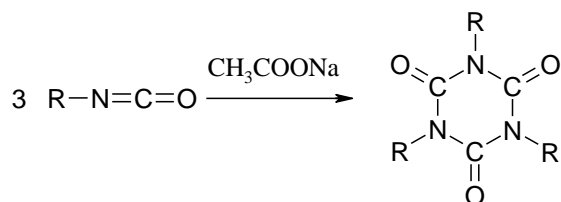
a) dimerizarea



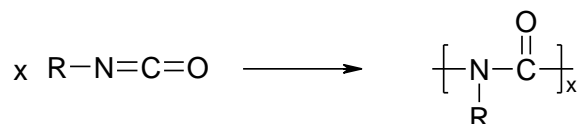
sau



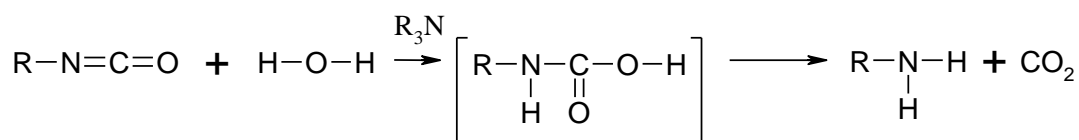
b) trimerizarea



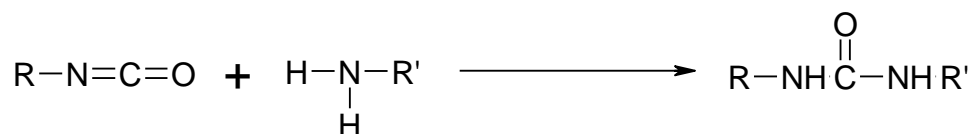
c) polimerizarea



d) hidroliza la amine



e) reacția cu aminele



Astfel, condițiile de depozitare a materiilor prime au necesitat o atenție sporită: polioliile se păstrează într-un mediu anhidru și se distilă înainte de fiecare utilizare.

Am decis utilizarea unui izocianat alifatic (izoforon-diizocianatul), iar în privința polioliilor, am folosit monoetilen-glicol (MEG), 1,4-butandiol (BD) și polietilen-glicol (PEG) cu mase moleculare diferite, cu catene de diferite lungimi pentru a sintetiza nanocapsule cu dimensiuni diferite pentru o eliberare constantă a substanței biologice active înglobată. Tween 20, respectiv Span 85 s-au utilizat ca surfactanți.

În Tabelul 1, este prezentată o caracterizare preliminară a materiilor prime.

**Tabelul 1.** Caracterizarea principalelor materii prime

Nr. crt.	Materia primă	Caracteristica	U.M.	Valoarea
1	Monoetilen-glicol (MEG)	Formula moleculară	-	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
		Masa moleculară	g/mol	62,07
		Densitatea (20 °C)	g/cm <sup>3</sup>	1,1132
		Punct de topire	°C	-12,9
		Punct de fierbere	°C	197,3

		Solubilitate în apă	mg/ cm <sup>3</sup>	miscibil în orice proporție
		Vâscozitate	N · s/m <sup>2</sup>	1,61 · 10 <sup>-2</sup>
	1,4-Butan- diol (BD)	Formula moleculară	-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
		Masa moleculară	g/mol	90,12
		Densitatea (20 °C)	g/cm <sup>3</sup>	1,0171
		Punct de topire	°C	20,1
		Punct de fierbere	°C	235
		Solubilitate în apă	mg/ cm <sup>3</sup>	miscibil în orice proporție
		Index refractivitate (20 °C)	N · s/m <sup>2</sup>	1,4460
	Poliетен- glicol (PEG)	Formula moleculară	-	(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> H <sub>2</sub> O
		Masa moleculară	g/mol	190-210
		Densitatea (20 °C)	g/cm <sup>3</sup>	1,1250
		Punct de inflamabilitate	°C	340-360
		Presiune de vapori	-	relativ scăzută
		Solubilitate în apă	mg/ cm <sup>3</sup>	≥ 10
	Izoforon- diizocianat (ID)	Aspect	-	lichid incolor
		Formula moleculară	-	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Masa moleculară	g/mol	222,30
		Densitatea (20 °C)	g/cm <sup>3</sup>	1,0620
		Punct de topire	°C	-60,0
		Punct de fierbere	°C	158,0
		Punct de inflamabilitate	°C	155
		Formula moleculară	-	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
		Masa moleculară	g/mol	198,18
		Densitatea (20 °C)	g/cm <sup>3</sup>	1,2300

În privința modului de lucru am respectat următoarele etape:

*1. Prepararea componentei izocianice (B)*

Într-un balon, cu fund plat, de 500 mL, se introduc conform Tabelului 2:

**Tabelul 2.** Componenta izocianică

	Valoarea
Acetona, mL	80
Izocianat, ml	16

Span <sup>®</sup> 85, mL	160
--------------------------	-----

Balonul s-a plasat pe agitatorul magnetic, am introdus un magnet de agitare, iar amestecul s-a omogenizat cu o viteză de 500 rpm, timp de 3 minute la temperatura camerei. Am extras magnetul de agitare, iar balonul a fost acoperit cu dop rodat după omogenizare.

### *2. Obținerea componentei hidroxilice (A)*

Într-un balon cu fund plat, de 500 mL am introdus: 3,5 mL MEG, 3,5 mL BD, 10 mL PEG și 200 mL apă distilată. Am introdus un magnet de agitare, am plasat balonul pe agitatorul magnetic și am omogenizat amestecul cu o viteză de 500 rpm, timp de 3 minute la temperatura camerei. Am adăugat 1,50 mL Tween<sup>®</sup> 20 și am continuat omogenizarea încă 2 minute fără a schimba viteza de amestecare. Amestecul astfel obținut se stochează în balonul respectiv.

### *3. Sinteza nanocapsulelor*

Am plasat pe agitatorul magnetic un balon cu fund plat, de 250 mL, în care am introdus 44 mL Componentă hidroxilică (A). Am introdus un magnet de agitare și am amestecat conținutul cu o viteză de 400 rpm. Am introdus 28 mL soluție Componentă B și am continuat agitarea timp de 3 ore la temperatura camerei, chiar dacă precipitarea nanocapsulelor a fost instantanee și membrana primară s-a format imediat.

### *4. Spălarea nanocapsulelor*

Conținutul fiecărui balon s-a antrenat cu apă distilată și s-a trecut, pe rând, într-un creuzet filtrant; am spălat de două ori cu câte 30 mL apă distilată pentru îndepărtarea urmelor de componentă hidroxilică (A) rămasă nereacționată. Am folosit un creuzet filtrant de porozitate 5.

### *5. Evaporarea solventului*

Fiecare probă rămasă în creuzet s-a transvazat în vase Petri acoperite cu hârtie de filtru și s-au lăsat sub nișă 24 ore la temperatura camerei.

### *6. Stocarea și conservarea probelor*

Probele s-au stocat în tuburi de polietilenă, de 2 mL, cu capac snap-on, etichetate, și s-au introdus ulterior în cutii de stocare.

**Obiectivul 2.1 a fost îndeplinit complet, în condiții optime, rezultatele obținute fiind conforme cu cele asumate în cererea de finanțare depusă.**

## 2.2 Teste *in vitro* de profil bio-energetic al celulelor din liniile celulare NHOK și SCC-4

Analizorul de flux extracelular (Seahorse XFe24) reprezintă la ora actuală cea mai avansată tehnologie pentru studiul metabolismului celular, fiind o platformă automată ce furnizează două tipuri majore de date funcționale prin măsurarea simultană în timp real a celor două căi principale producătoare de energie celulară, glicoliza și respectiv respirația mitocondrială. Toate experimentele se realizează la 37 °C. Se determină parametrii funcției respiratorii mitocondriale (frecvențele bazale ale consumului de oxigen, capacitatea respiratorie maximă, producția de ATP și rezerva energetică mitocondrială) împreună cu cele ale glicolizei (flux glicolitic, capacitate glicolitică și rezervă glicolitică).

Pe lângă această tehnică, deoarece mitocondriile sunt considerate astăzi drept principala țintă a așa-numitei „toxicități ascunse”, funcția mitocondrială la nivelul mitocondriilor izolate este determinată prin respirometrie de înaltă rezoluție cu ajutorul oxigrafului-2K (Oroboros Ltd.) pentru a caracteriza comprehensiv efectele produșilor de metabolizare ale carrier-ilor de sinteză la nivel subcelular.

### Protocol

#### Izolarea mitocondriilor din ficatul de șobolan

Toate investigațiile au fost conforme cu Ghidul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator (Institutul Național de Sănătate al SUA, revizuit 1996) și au fost aprobate de Comitetul de etică și deontologie al universității noastre.

Toți reactivii au fost de calitate analitică sau de cea mai înaltă puritate disponibile în comerț.

Șase femele adult de șobolani Sprague-Dawley (2 la care s-au folosit celule NHOK și SCC-4 fără alte tratamente, 2 la care s-au folosit celule NHOK și SCC-4 și s-a aplicat eugenol, respectiv 2 la care s-au folosit celule NHOK și SCC-4 și s-au aplicat particule cu eugenol), cântărind 250-300 g alimentate *ad libitum* și menținute sub cicluri de lumină / întuneric de 12 ore, au fost anesteziate cu xilazină (5 mg / kg) și ketamină (20 mg / kg) intraperitoneal. Ficatul a fost îndepărtat rapid, s-a curățat de țesutul conjunctiv, grăsime și sânge și a fost clătit în soluție rece de KCl 0,9%. Țesutul a fost tocat cu foarfece la fragmente mai mici de 0,5 cm într-un vas Petri și apoi omogenizat manual într-un omogenizator de 25 ml. Soluția tampon 1 care conține 210 mM manitol, 70 mM sucroză, 10 mM HEPES (pH = 7,4), a fost îmbunătățită cu 125 mg albumină serică bovină (BSA) 5 mg / ml și 0,25 ml EGTA 1 mM.

Mitocondriile au fost izolate printr-o centrifugare diferențială utilizând o centrifugă Hettich Rotina 38R conform următorului protocol: prima centrifugare a fost efectuată la 750x g pentru 5 minute la 4 °C. Supernatantul, obținut prin filtrare, conținând fracția mitocondrială, a fost centrifugat la 7000x g timp de 10 minute la 4 °C pentru a obține fracțiunea sedimentului mitocondrial; a fost spălat într-o soluție tampon 2 conținând 210 mM manitol, 70 mM sucroză, 10 mM HEPES (pH 7,4). Centrifugarea finală a fost efectuată la 7000x g pentru 10 minute la

4 °C și s-a resuspendat în 0,25 ml soluție tampon 2 menținându-se în gheață pe tot parcursul experimentului.

Concentrația proteinelor a fost determinată prin metoda biuret după ce mitocondriile au fost solubilizate cu 1% deoxicolat, utilizând BSA ca standard. O valoare medie de  $99,9 \pm 10,7$  mg proteine mitocondriale / ml suspensie a fost obținută dintr-un singur ficat.

#### Măsurători de respirație

Consumul mitocondrial de oxigen a fost măsurat la 37 °C utilizând un electrod de tip Clark (Hansatech Instruments Ltd.) în 1 ml soluție tampon 3 conținând 100 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM HEPES și 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,4). Frecvența respirației a fost exprimată ca nmol  $\text{O}_2$  / min / mg proteină mitocondrială. Indicele de control respirator (RCI) a fost calculat ca raportul frecvențele de consum de oxigen dintre starea 3 și 2. Datele au fost înregistrate cu software-ul Oxygraph Plus. Rezultatele sunt exprimate ca medie  $\pm$  S.D.

#### Rezultate

O secvență identică de suplimente a fost aplicată măsurării stării respiratorii 2 și 3 respectiv RCI cu succinat (15 mM - concentrație finală) ca substrat respirator în prezența amitalului (1 mM - concentrație finală) care a fost adăugat pentru inhibare. O valoare medie de  $16,21 \pm 3,79$  nmol  $\text{O}_2$  / min a fost obținută pentru starea 2 indiferent de șobolanul studiat.

Valorile RCI au fost cuprinse între  $3,52 \pm 0,39$  la șoboloanii la care s-u folosit NHOK, respectiv  $3,97 \pm 0,52$  la cei cu SCC-4 indiferent de aplicarea vreunui tratament.

În concluzie, nu s-au constatat diferențe semnificative între valorile frecvențelor respiratorii și RCI, indiferent de utilizarea eugenolului simplu sau încapsulat ( $p > 0,05$ , test ANOVA).

**Obiectivul 2.2 a fost îndeplinit complet, în condiții optime, rezultatele obținute fiind conforme cu cele asumate în cererea de finanțare depusă.**



## 2.3 Teste *in vitro* pe linii celulare normale specifice NHOK și pe linii celulare tumorale SCC-4

O linie celulară imortalizată este o populație de celule dintr-un organism multicelular care, în mod normal, nu va prolifera pe termen nedefinit, dar, din cauza mutației, a evitat senescența celulară normală și, în schimb, poate continua divizarea. De aceea, celulele pot fi cultivate pentru perioade prelungite *in vitro*. Mutațiile necesare pot apărea în mod natural sau pot fi induse intenționat în scopuri experimentale. Liniile celulare reprezintă un instrument foarte important pentru cercetarea biochimiei și a biologiei celulare a organismelor multicelulare. Liniile celulare imortalizate au găsit, de asemenea, utilizări în biotehnologie.

O linie celulară imortalizată nu trebuie confundată cu celulele stem, care se pot diviza, de asemenea, pe o perioadă nedeterminată, dar formează o parte normală a dezvoltării unui organism multicelular.

Există mai multe linii de celule imortalizate. Unele dintre acestea sunt linii celulare normale (de exemplu: derivate din celule stem). Alte linii de celule imortalizate sunt echivalentul *in vitro* al celulelor canceroase. Cancerul apare atunci când o celulă somatică care în mod normal nu poate fi divizată suferă mutații care determină dereglarea controalelor normale ale ciclului celular care conduc la proliferarea necontrolată. Liniile de celule imortalizate au suferit mutații similare, permițând unui tip de celule care, în mod normal, să nu poată fi divizat pentru a fi proliferat *in vitro*. Originile unor linii de celule imortalizate, de exemplu celulele umane HeLa, provin din cancerele care apar în mod natural.

Liniile celulare imortalizate sunt utilizate pe scară largă ca un model simplu pentru sisteme biologice mai complexe, de exemplu pentru analiza biochimiei și a biologiei celulare a celulelor mamiferelor (inclusiv a celor umane). Principalul avantaj al utilizării unei linii celulare pentru cercetare este nemurirea sa; celulele pot fi cultivate pe o perioadă nedeterminată în cultură. Acest lucru simplifică analiza biologiei celulelor, care ar putea avea altfel o durată de viață limitată.

De asemenea, liniile celulare imortalizate pot fi clonate, dând naștere unei populații clonale care, la rândul său, poate fi propagată pe o perioadă nedeterminată. Acest lucru permite ca o analiză să fie repetată de mai multe ori pe celule identice genetic, ceea ce este de dorit pentru experimente științifice repetabile. Alternativa, efectuarea unei analize asupra celulelor primare de la mai mulți donatori de țesuturi, nu are acest avantaj.

Liniile celulare imortalizate își găsesc utilitatea în biotehnologia în care acestea reprezintă o modalitate rentabilă de creștere a celulelor similare cu cele găsite într-un organism multicelular *in vitro*. Celulele sunt utilizate pentru o mare varietate de scopuri, de la testarea toxicității compușilor sau medicamentelor până la producerea proteinelor eucariote.

## Protocol

Au fost utilizate următoarele tipuri de celule: keratinocite orale normale umane (NHOK) izolate de la suprafața bazală a foi epiteliale orale și cultivate ca celule dispersate în mediu scăzut (0,15 mM)  $\text{Ca}^{2+}$  fără ser, respectiv linia celulară carcinom scuamos SCC-4 au fost achiziționate de la ATCC (American Type Cell Collection), ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) și Sigma Aldrich sub forma de flacon înghețat. Mediile de cultură specifice - Dermal Cell Basal Medium (ATCC<sup>®</sup> PCS-200-030<sup>™</sup>) și kitul de creștere – Keratinocyte Growth Kit (ATCC<sup>®</sup> PCS-200-040<sup>™</sup>) pentru PGK, EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) – 1BR3 și DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) au fost achiziționate de la ATCC și Sigma Aldrich, iar ceilalți reactivi folosiți la cultivarea celulelor – tampon fosfat salin (PBS – phosphate saline buffer), soluția de tripsină, EDTA și Trypan blue, Alamar blue și kitul MTT de verificare a viabilității celulare au fost cumpărați de la Sigma Aldrich, Germania.

Celulele au fost păstrate în azot lichid până la începerea experimentului când au fost dezghețate și puse în cultură. Keratinocitele au fost cultivate în mediu de cultură specific – Dermal Cell Basal Medium în care s-a adăugat un kit specific de creștere – Keratinocyte Growth Kit, iar linia celulară SCC-4 a fost crescută în DMEM cu conținut crescut de glucoză – 4.5 g/L suplimentat cu 10% FCS și 1% soluție de penicilină/streptomycină. Toate celulele au fost păstrate într-o atmosferă umedă în incubator la 37 °C și 5%  $\text{CO}_2$ . La fiecare 2-3 zile celulele au fost splituite, iar pentru experimente celulele au fost numărate în prezența Trypan blue cu ajutorul aparatului Countess II FL Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific, USA.

Pentru verificarea efectelor eugenolului ca atare, dar și a noilor formulări – particule goale și particule cu eugenol asupra viabilității liniilor celulare menționate anterior, celulele au fost cultivate în plăci de 96 godeuri într-un număr de  $10^4$  celule/godeu și lăsate să adere la placă până au ajuns la o confluență potrivită (24 – 48 ore). Au fost preparate soluții stoc în dimetil-sulfoxid (DMSO) pentru eugenol și particule cu eugenol și au fost testate 2 concentrații diferite: 10 și 50  $\mu\text{M}$  pentru 24 și respectiv 72 ore. Pentru capsulele cu eugenol concentrația stoc a fost exprimată în procente – 1% și au fost testate următoarele diluții: 333x, 1000x, 3330x și 10000x pentru 24 ore. După cele 24, respectiv 72 ore, s-au adăugat 20  $\mu\text{l}$  Alamar blue, placa a fost incubată pentru 3 ore la 37 °C și apoi s-au citit absorbanțele la lungimile de undă 570 și 600 nm (ca referință) cu ajutorul spectrofotometrului xMark Microplate Spectrophotometer, Biorad. Pentru calculul viabilității celulelor s-a folosit următoarea formulă de calcul:

$$\frac{\{[(\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} \text{ of test agent dilution}]\}}{[(\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} A^{\circ}_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1} A^{\circ}_{\lambda_2} \text{ of untreated positive growth control}]} \times 100$$

unde  $\epsilon_{OX}$  = coeficient molar de extincție al Alamar Blue oxidat (BLUE); A = absorbanța godeurilor de testare;  $A^\circ$  = absorbanța godeurilor de control pozitiv (fără compuși de testat);  $\lambda_1 = 570$  nm and  $\lambda_2 = 600$  nm.

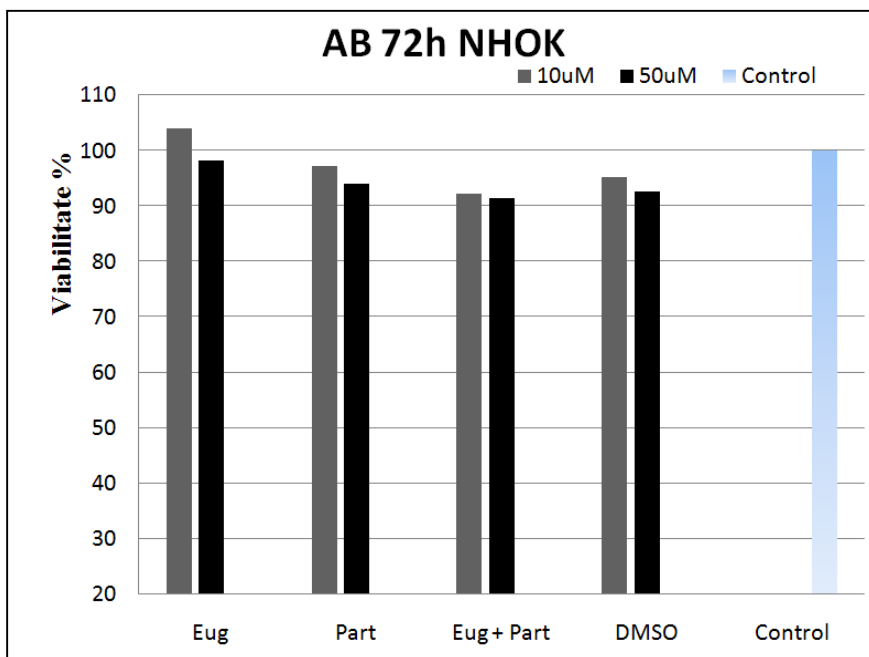
### Tehnica MTT

Un alt test de verificare al potențialului efect citotoxic indus de compușii test asupra liniilor celulare incluse în studiu, a fost testul de verificare a viabilității celulare MTT. S-a procedat similar ca în cazul, testului Alamar blue, cu diferența că după timpul stabilit de stimulare, în fiecare godeu s-au adăugat 10  $\mu$ L MTT. A urmat o perioadă de incubare de 3 ore, iar apoi s-au adăugat 100  $\mu$ L agent solubilizant / godeu (conținut în kitul achiziționat) și s-au menținut plăcile pentru 30-45 minute la temperatura camerei, ferite de lumină. Citirea absorbanței s-a făcut la 570 nm cu ajutorul spectrofotometrului xMark Microplate Spectrophotometer, Biorad.

### Rezultate

S-a testat efectul eugenolului și al noilor formulări asupra keratinocitelor NHOK, deoarece eugenolul se regăsește în componența unor produse stomatologice.

Rezultatele obținute indică că după o stimulare de 72 ore cu soluțiile de eugenol și particulele de eugenol, nu s-au observat efecte citotoxice induse de acestea asupra keratinocitelor, procentul de celule viabile calculate raportat la control (celule nestimulate) fiind de peste 90% (Figura 1).



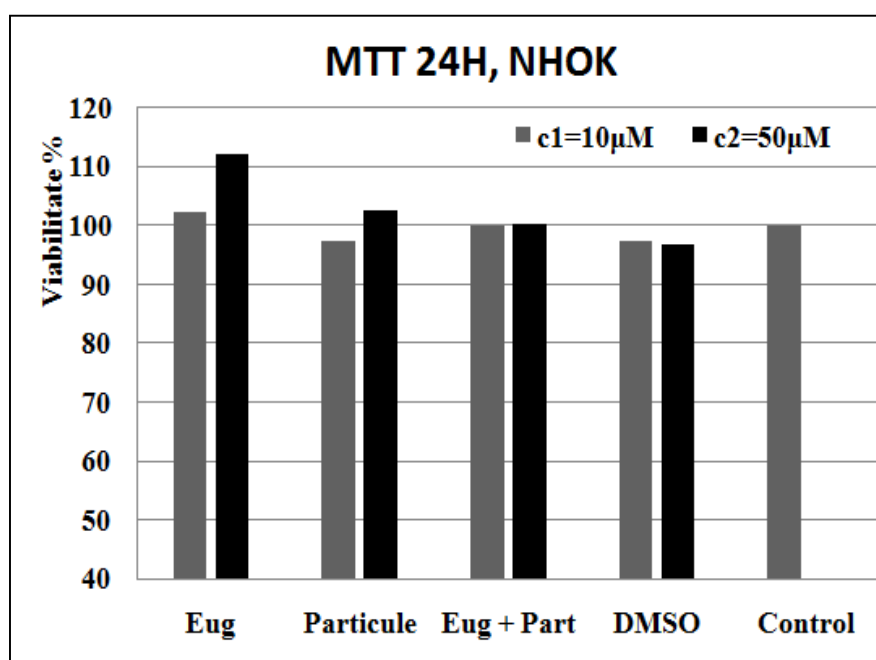
**Fig. 1.** Efectul indus de probe asupra NHOK după 72 ore raportat la control (testul Alamar blue)

Valorile procentelor de keratinocite viabile după stimulare sunt redată în Tabelul 3.

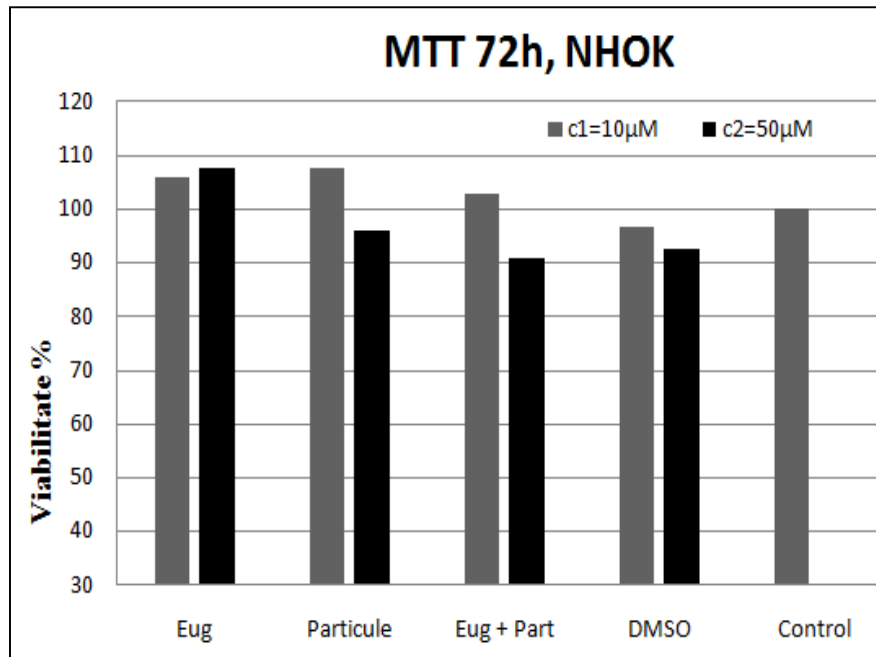
**Tabelul 3.** Procentele de keratinocite viabile după 72 ore (test Alamar blue)

Concentrații testate, $\mu\text{M}$	Eug	Part	Part + Eug	DMSO	Control
10	104.041	97.139	92.114	95.253	
50	98.275	94.048	91.321	92.600	
					100

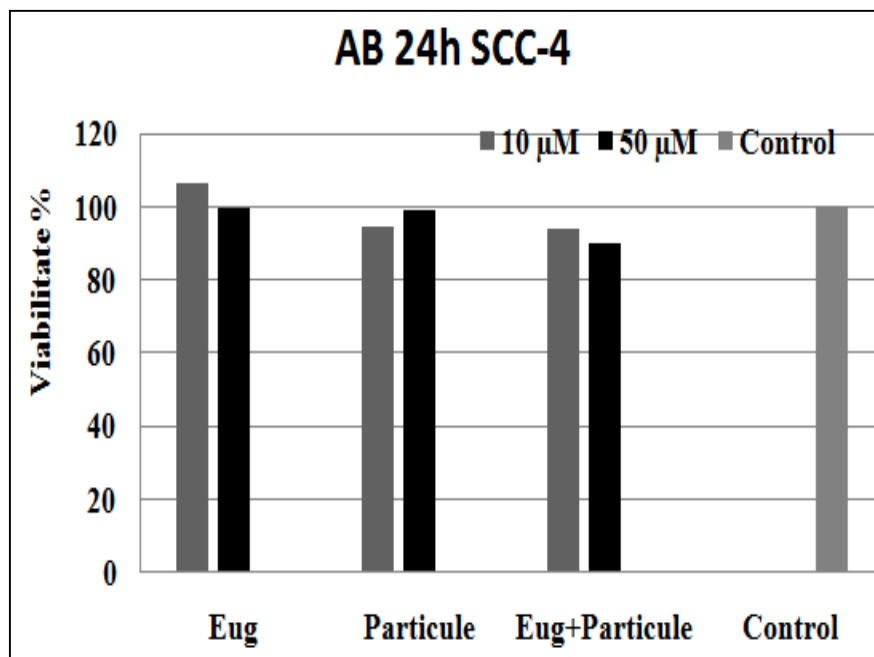
A fost testat și efectul compușilor după o stimulare de 24 și 72 ore cu ajutorul testului MTT (Figurile 2 și 3). Rezultatele obținute au arătat că soluțiile de eugenol și particule cu eugenol nu induc toxicitate, nici chiar la cea mai mare concentrație testată –  $50\mu\text{M}$ , procentul de celule viabile calculat raportat la control (celule nestimulate) fiind de peste 95%.



**Fig. 2.** Efectul indus de probe asupra NHOK după 24 ore raportat la control (testul MTT)



**Fig. 3.** Efectul indus de probe asupra NHOK după 72 ore raportat la control (testul MTT)

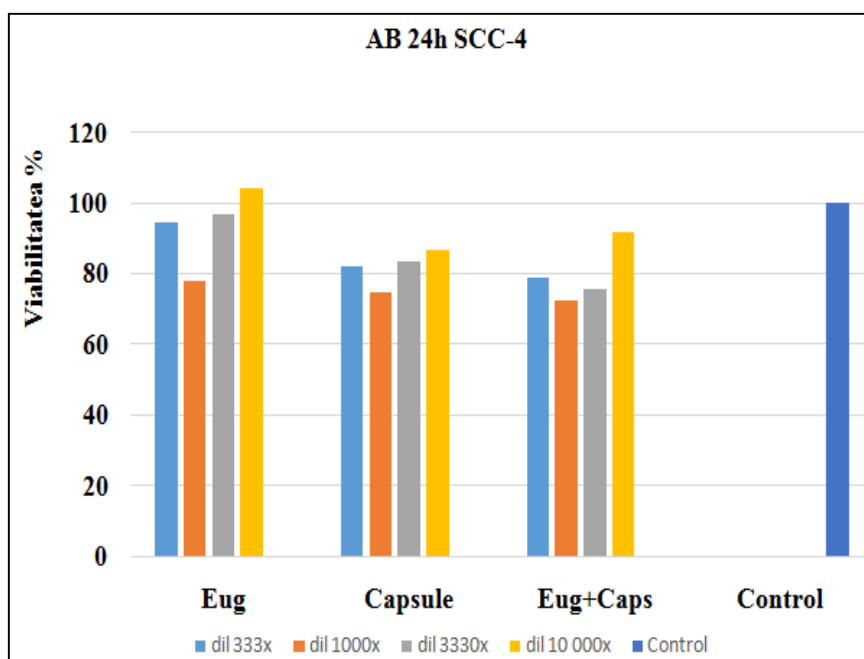


**Fig. 4.** Efectul indus de probe asupra celulelor SCC-4 după o stimulare de 24 ore raportat la control (testul Alamar blue)

Efectul citotoxic al eugenolului ca atare, dar și al noilor formulări obținute și testate în cadrul acestui studiu a fost evaluat și asupra liniei celulare tumorale SCC-4.

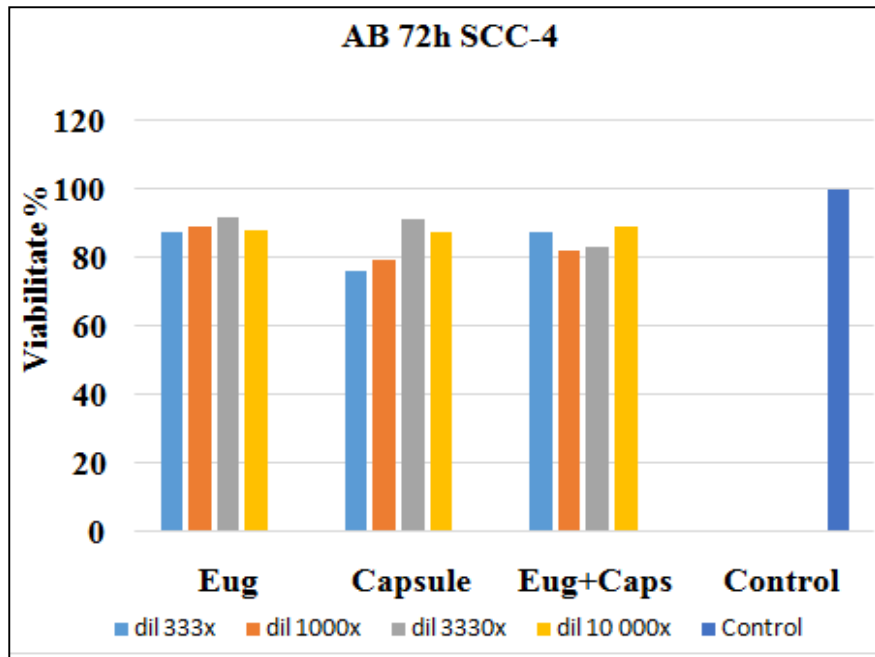
În cazul celulelor SCC-4, s-a dovedit că stimularea cu soluții în DMSO de eugenol și particule cu eugenol (10 și 50  $\mu$ M) pentru 24 ore nu determină un efect citotoxic semnificativ (Figura 4).

Stimularea cu soluții de capsule cu eugenol a celulelor SCC-4 pentru 24 ore a determinat un ușor efect citotoxic la cele mai mici diluții testate (333x și 1000x), procentul cel mai mic de celule viabile fiind înregistrat la capsulele cu eugenol (chiar și capsulele blank, fără eugenol produc citotoxicitate, dar efectul este mai pregnant la cele încărcate cu substanță activă) – Figura 5.



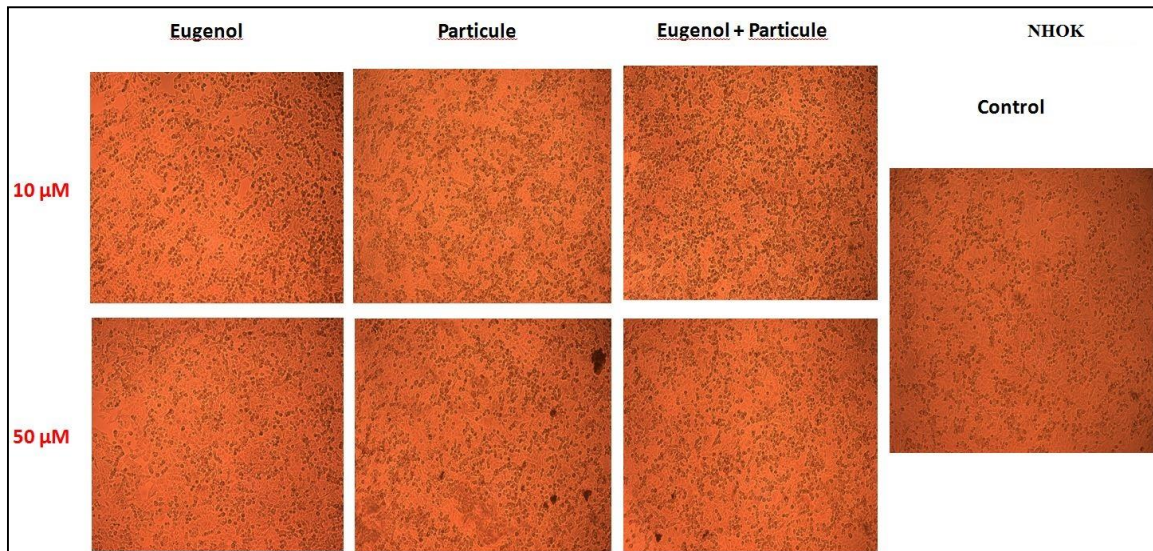
**Fig. 5.** Efectul indus de probe asupra celulelor SCC-4 după o stimulare de 24 ore raportat la control (testul Alamar blue)

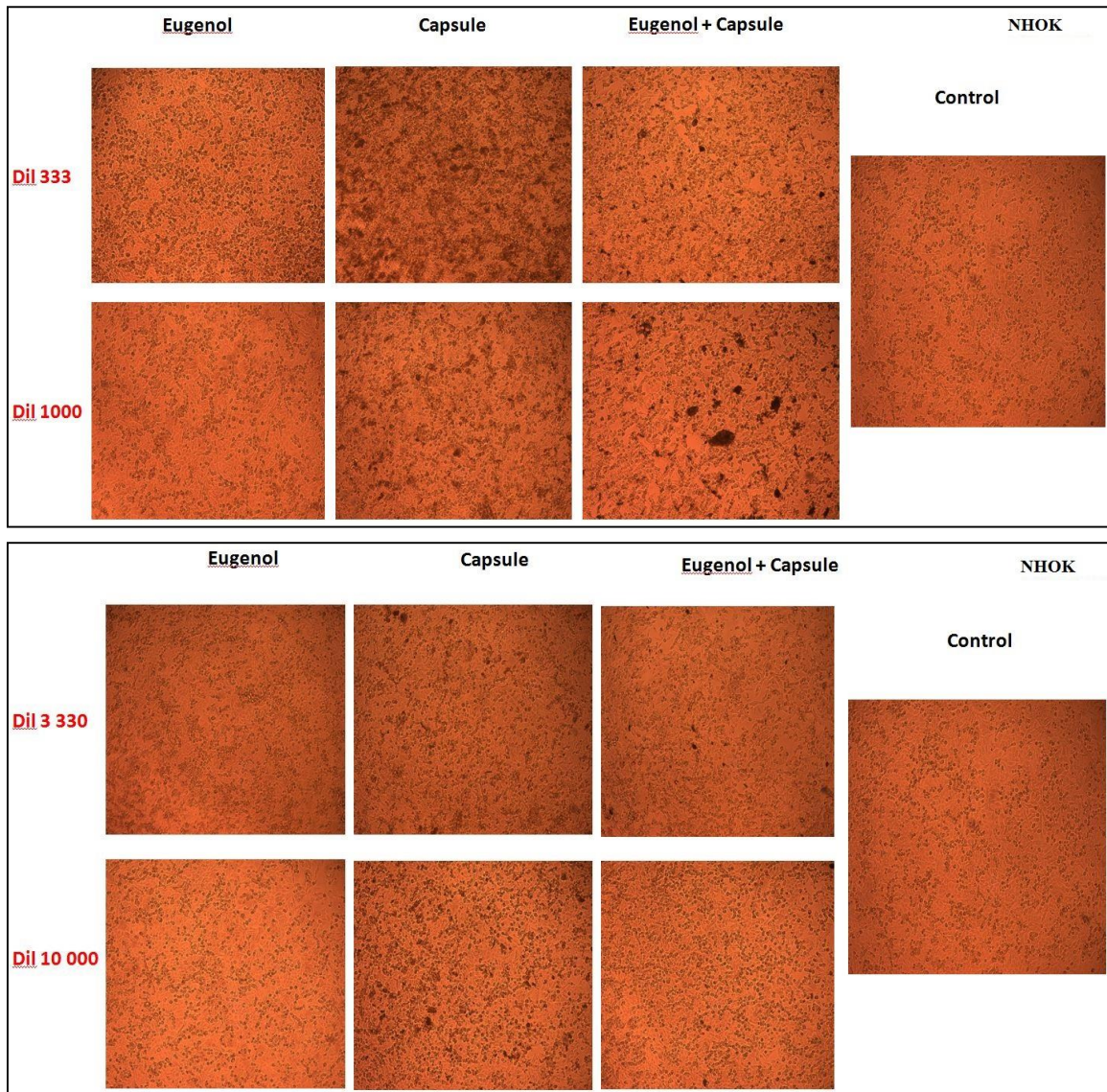
Rezultatele obținute în urma stimulării celulelor SCC-4 cu capsulele cu eugenol au fost similare la 72 ore cu cele descrise pentru stimularea de 24 ore (Figura 5), un procent mai scăzut al viabilității celulare fiind observat în cazul stimulării cu cele mai mici diluții testate (33x și 1000x) (Figura 6).



**Fig. 6.** Efectul indus de probe asupra celulelor SCC-4 după o stimulare de 72 ore raportat la control (testul Alamar blue)

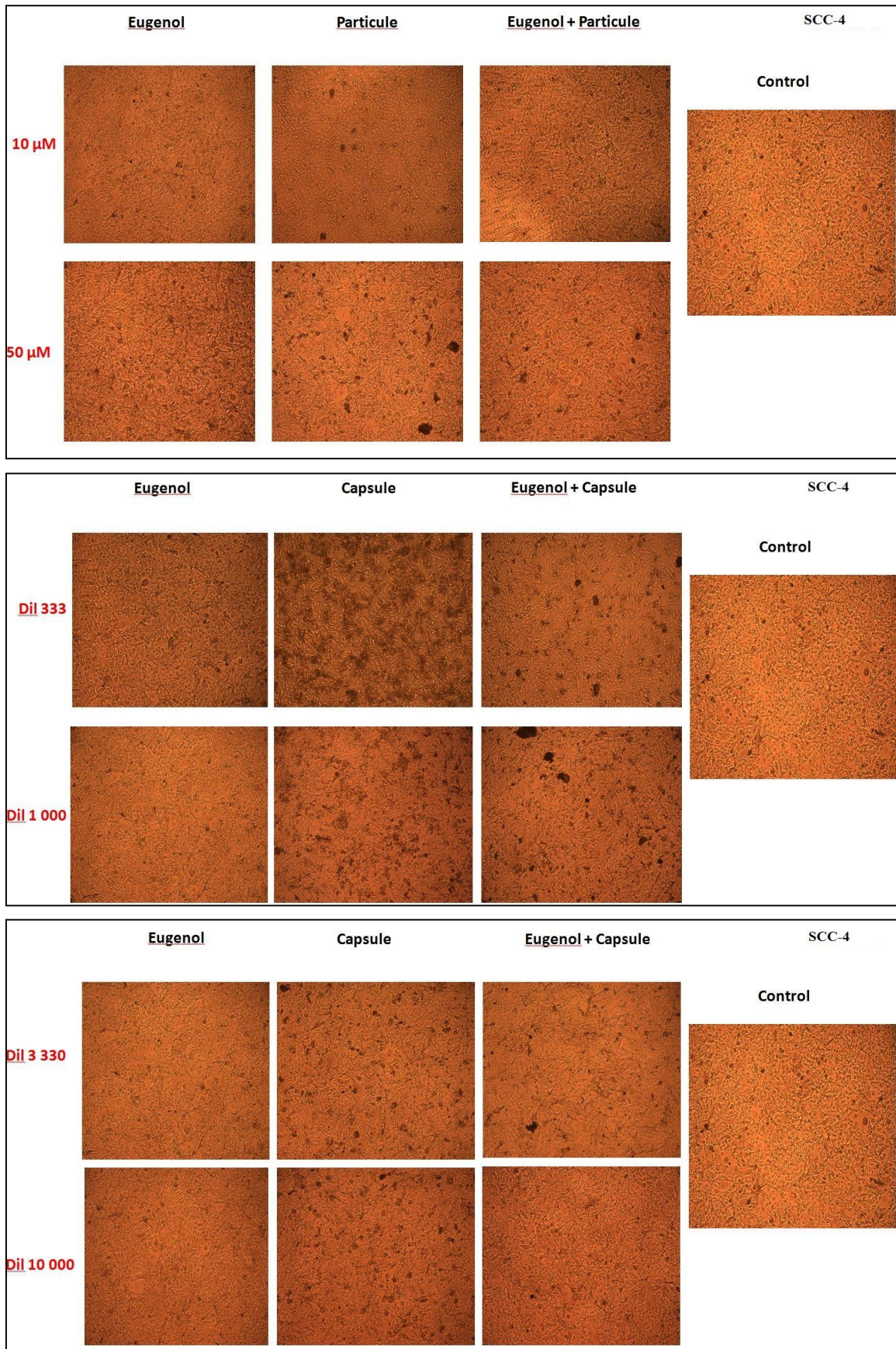
Efectele probelor testate asupra migrării celulelor au fost testate folosind diluțiile prezentate anterior și s-au făcut poze după 24 ore post-stimulare.





**Fig. 7.** Test asupra migrării la 24 ore la diferite diluții pe linia celulară NHOK





**Fig. 8.** Test asupra migrării la 24 ore la diferite diluții pe linia celulară SCC-4

Rezultatele nu indică efecte inhibitoare asupra migrației celulare la 24 ore după stimulare.

**Obiectivul 2.3 a fost îndeplinit complet, în condiții optime, rezultatele obținute fiind conforme cu cele asumate în cererea de finanțare depusă.**

## 2.5 Teste *in vivo* pe animale de laborator fără păr SKH-1

Cu excepția studiilor clinice controlate și reglementate, geneticienii și oamenii de știință nu folosesc omul pentru investigațiile experimentale din cauza riscului evident pentru viață. În schimb, se folosesc diferite specii de animale, fungi, bacterii, respectiv plante ca organisme model pentru studiile științifice.

Când modelele animale sunt folosite în studiul bolilor umane, ele sunt frecvent selectate din cauza asemănării lor cu omul în ceea ce privește genetica, anatomia și fiziologia. De asemenea, modelele animale sunt adesea preferabile pentru cercetarea experimentală a bolilor, datorită aprovizionării lor nelimitate și ușurinței manipulării. De exemplu, pentru a obține o cercetare valabilă științific, condițiile asociate unui experiment trebuie să fie strict controlate. Aceasta înseamnă adesea manipularea unei singure variabile, menținând constanta altora, și apoi observarea consecințelor acestei schimbări. În plus, pentru a testa ipotezele privind modul în care se dezvoltă o boală, trebuie utilizat un număr adecvat de subiecți pentru a testa rezultatele experimentului. Prin urmare, oamenii de știință nu pot efectua cercetări pe un singur animal sau pe un om și este mai ușor să se folosească un număr suficient de mare de animale (mai degrabă decât de oameni) pentru a obține rezultate semnificative.

Rozătoarele sunt cel mai frecvent tip de mamifer angajat în studii experimentale și s-au efectuat cercetări ample folosind șobolani, șoareci, gerbili, cobai și hamsteri. Dintre aceste rozătoare, în majoritatea studiilor genetice, în special cele care implică o boală, au fost folosiți șoareci, nu numai pentru că genomul lor este atât de similar cu cel al oamenilor, dar și datorită disponibilității, ușurinței manipulării, frecvenței ridicate de reproducere și costului de utilizare relativ scăzut.

În anul 1924, o pereche de șoareci sălbatici fără păr a fost capturată într-un volăriu din Londra, iar Dr. E.L. Green a dus acești șoareci la Laboratorul Jackson, unde s-au obținut primele exemplare de șoareci fără păr. Șoarecele SKH-1, comercializat de Charles River Laboratories, a fost obținut de la un furnizor comercial din New York City, prin intermediul Temple University. Alela mutantă *hr* (*hairless*) a șoarecilor SKH-1 este o mutație autosomală recesivă, care conține un retrovirus politropic modificat, stabil, integrat în intronul 6 al genei.

Pierderea de apă trans-epidermică (*transepidermal water loss* sau TEWL) este apa care trece prin piele și se evaporă de la suprafață pentru ca straturile celulare exterioare să rămână suficient de hidratate. Este măsurat în  $g / m^2 / h$  și poate fi utilizat pentru a măsura funcționalitatea pielii, în special funcția de barieră. Tewameter<sup>®</sup> este un dispozitiv TEWL de renume mondial, dezvoltat în anii '90, care a fost folosit în nenumărate studii științifice de atunci.

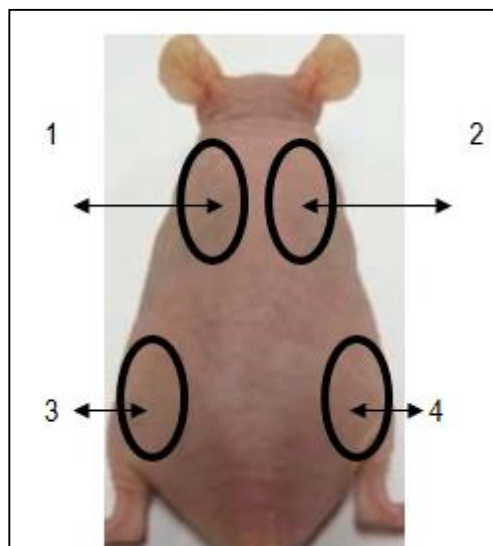
Corneometria este o tehnologie modernă, utilizată pentru măsurarea hidratării stratului exterior al epidermei (*stratum corneum*). Deoarece pielea este un mediu dielectric, variațiile de

hidratare apar prin modificarea capacității. Pentru a evalua conținutul de umiditate al pielii, un condensator de măsurare este presat pe piele folosind o presiune constantă. Diametrul îngust al senzorului permite chiar măsurători pe zonele mai puțin accesibile ale pielii. Corneometrul este un dispozitiv complet automat. Citirea indică nivelul de hidratare epidermică - înainte și după tratamentul cu produse cosmetice sau farmaceutice, de exemplu.

Al treilea parametru, deosebit de important într-un studiu toxicologic *in vivo* pe animale de laborator fără păr, este eritemul. Eritemul (din limba greacă: *erythros*, adică roșu) este roșeața pielii sau a membranelor mucoase, cauzată de hiperemie (creșterea fluxului sanguin) în capilarele superficiale. Un eritem se produce cu orice leziune, infectare sau inflamație a pielii. De asemenea, eritemul poate fi cauzat de un masaj, tratament electric, medicamente pentru acnee, alergii, exerciții fizice, radiații solare (arsuri solare), sindromul radiațiilor cutanate, toxicitatea mercurului, administrarea niacinului - oricare dintre acestea poate provoca dilatarea capilarelor, ducând la roșeață. Eritemul este un efect secundar comun al tratamentului prin radioterapie datorat expunerii pacientului la radiații ionizante.

#### Protocol

S-au folosit opt șoareci SKH-1 (femele) de șase săptămâni; probele au fost aplicate pe pielea de pe spatele acestora. Protocolul de lucru a urmat regulile Institutului Național de Sănătate Animală (NIAH): animalele au fost menținute în timpul experimentului în condiții standard oferite de Biobaza de la Universitatea de Medicină și Farmacie Timișoara: cicluri de lumină-întuneric 12 ore, hrană și apă *ad libidum*, temperatură relativ constantă ( $23 \pm 2$  °C), umiditate (40-60%). A fost obținută permisiunea Comisiei de Etică privind Experimentele pe Animale din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" Timișoara.



**Fig. 9.** Zone de aplicare pe spatele șoarecelui fără păr

Toate cerințele producătorului de echipamente, compania Courage-Khazaka (Germania), au fost îndeplinite. Astfel, menționăm următoarele: temperatura camerei ( $23\pm 2$  °C); umiditatea ( $50\pm 5\%$ ) în timpul măsurătorilor; toate măsurătorile au fost efectuate de același operator.

Măsurătorile de pe pielea șoarecilor au fost efectuate cu un sistem de adaptare multi-sondă (MPA5) de la Courage-Khazaka Electronics, Germania, dotat cu o sondă Tewameter® TM300, o sondă Mexameter®MX18 și o sondă Corneometer® CM825, conform Figurii 9.

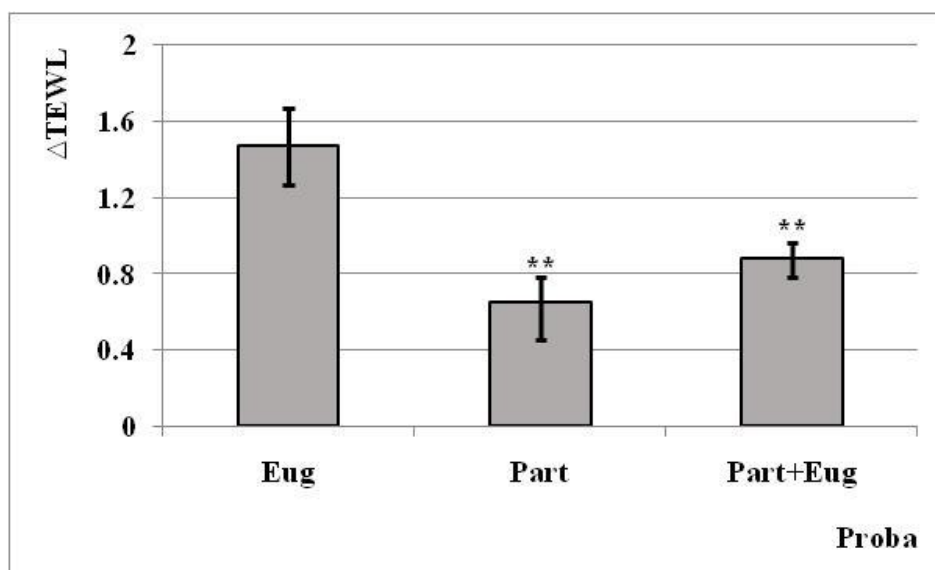
Zonele 1 și 3 au fost utilizate pentru aplicare de probă, iar zonele 2 și 4 au fost utilizate ca referință. Diferențele au fost calculate folosind următoarea formulă:

$$\Delta p = [(p1-p2) + (p3-p4)] / 2$$

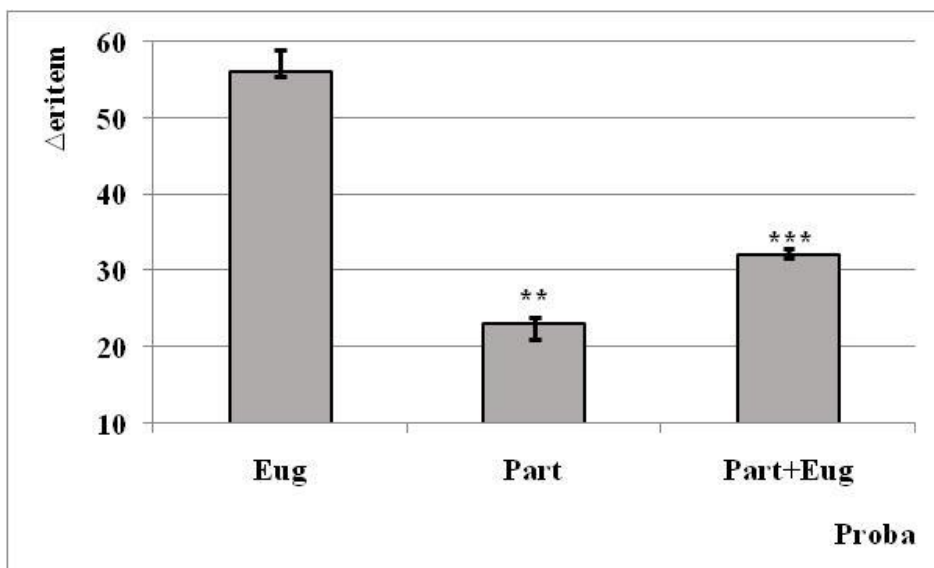
unde p reprezintă parametrul pielii, precum TEWL, eritem, sau umiditatea *stratum corneum*

### Rezultate

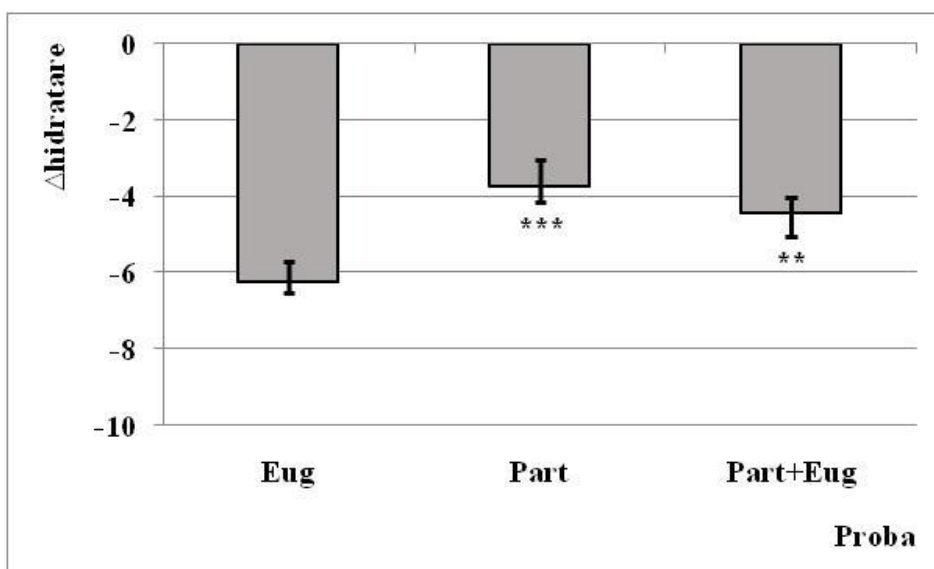
Testările pe piele de șoareci au furnizat valori/evoluții prezentate în următoarele figuri.



**Fig. 10.** Valoarea comparativă a TEWL în funcție de proba aplicată



**Fig. 11.** Valoarea comparativă a eritemului în funcție de proba aplicată



**Fig. 12.** Valoarea comparativă a eritemului în funcție de proba aplicată

Din figurile prezentate anterior, se poate concluziona faptul că, față de eugenol care prezintă un ușor efect iritativ (TEWL, eritem crescute, respectiv nivel de hidratare scăzut), probele noi obținute sunt mult mai ușor tolerabile, fiecare parametru de piele măsurat înregistrând modificări mai mici.

**Obiectivul 2.5 a fost îndeplinit complet, în condiții optime, rezultatele obținute fiind conforme cu cele asumate în cererea de finanțare depusă.**

## 2.6 Analiza histopatologică pe mucoasă (jugală și gingivală) implantată pe membrana de ou embrionat

Mucoasa orală este membrana care învelește interiorul gurii și constă din epiteliu stratificat scuamos numit epiteliu oral și un țesut conjunctiv sub denumirea de *lamina propria*. Cavitatea orală a fost uneori descrisă ca o oglindă care reflectă sănătatea individului. Modificările datorate unei boli sunt văzute ca modificări ale mucoasei orale care alcătuiesc gura, ceea ce poate dezvălui condiții sistemice cum ar fi diabetul sau deficitul de vitamine sau efectele locale ale consumului cronic de tutun sau alcool.

Mucoasa orală poate fi împărțită în trei categorii principale bazate pe funcție și pe histologie:

I. Mucoasa masticatoare - un epiteliu scuamos stratificat, keratinizat, găsit pe dorsumul limbii, palatul tare și gingiile atașate.

II. Mucoasa de căptușire - un epiteliu scuamos stratificat, nekeratinizat, găsit aproape oriunde în cavitatea bucală, incluzând:

II.1 Mucoasa bucală, care se referă la mucoasa interioară a obrazilor și a podelei gurii

II.2 Mucoasa labială, care se referă la căptușeala interioară a buzelor

II.3 Mucoasele alveolare, care se referă la mucoasa dintre mucoasele bucale și labiale.

Este de un roșu mai strălucitor, neted, cu multe vase de sânge

III. Mucoasa specializată - în special în regiunile gustative ale papilelor linguale pe suprafața dorsală a limbii, care conține terminații nervoase pentru recepția generală senzorială și percepția gustului.

Mucoasa orală exploatează diferite mecanisme pentru a proteja gazda împotriva agenților patogeni invadatori. *Lamina propria* oferă rezistență la forțe de rupere și comprimare, menținând astfel integritatea țesutului, rezistență care este crucială într-un astfel de loc activ care este în mod constant expus la microorganisme. Protecția față de microorganisme este de asemenea asigurată de eliminarea celulelor de pe stratul de suprafață, reducând astfel la minim colonizarea. Mai mult, secreția salivară ajută la menținerea mucoasei orale umedă și la limitarea acumulării bacteriene excesive. În plus față de mecanismele țesut-integrate menționate mai sus, mucoasa orală conține un sistem imunitar elaborat. Acest sistem este considerat a fi pro-tolerogen în natură, deoarece mucoasa orală rămâne în stare relativă de sănătate, în ciuda încărcăturii microbiene grele. Totuși, un infiltrat inflamator compus în principal din limfocite și neutrofile poate fi detectat în mod regulat în gingie, chiar și la indivizii considerați sănătoși din punct de vedere clinic. Aceasta evidențiază mecanismele complicate exercitate de sistemul imun oral pentru a menține homeostazia imunologică.

Membrana chorioallantoică - numită și chorioallantoida, abreviată CAM - este o membrană vasculară găsită în ouăle unor amniote, cum ar fi păsările și reptilele. Aceasta se

formează prin fuziunea straturilor mezodermice a două structuri de dezvoltare: alantoiză și corion. La mamifere, această structură formează placenta.

Analizele CAM au fost utilizate pe scară largă pentru a studia angiogeneza, invazia celulelor tumorale și metastaza. Modelul CAM are multe avantaje, cum ar fi: (a) natura foarte vascularizată a CAM promovează în mare măsură eficiența grefării celulelor tumorale; (b) reproductibilitate ridicată; (c) simplitate și eficiența costurilor și, în final, (d) deoarece testul CAM este un sistem închis, perioada de înjumătățire a multor molecule experimentale, cum ar fi peptide mici, tinde să fie mult mai lungă în comparație cu modelele animale, permițând studiul experimental al compușilor potențiali anti-metastatici care sunt disponibili numai în cantități mici. CAM este compus dintr-un epiteliu multistrat, care prezintă ectodermul la interfața aerată, mezodermul (sau stroma) și endodermul la interfața cu sacul alantoic. În plus, CAM conține proteine matrice extracelulare cum ar fi fibronectina, laminina, colagenul de tip I și integrină. Prezența acestor proteine matrice extracelulare imita mediul fiziologic al celulelor canceroase.

### Protocol

Membrana chorioallantoică a fost preparată conform metodei descrise în literatura de specialitate de către Ribatti și colaboratorii săi. Pe scurt, două grupe de câte 20 ouă albe Leghorn (grup control și grup tratat) s-au incubat la 37 °C timp de 3 zile. În a treia zi de incubare, s-au îndepărtat 2-3 ml de albumină și o fereastră a fost deschisă în coaja de ou pentru a observa membrana chorioallantoică. Studiul a început în ziua 7 de incubare prin inocularea celulelor sub membrana chorioallantoică.

Cultura de celule a fost spălată în soluție tampon fosfat - PBS Dulbecco (DPBS) și  $10^6$  celule vii / 100 ml PBS au fost inoculate sub membrana chorioallantoică. Inocularea a fost efectuată într-o zonă fără vase de sânge a membranei chorioallantoice pentru a evita evenimente hemoragice.

Rețeaua vasculară a fost ulterior observată pas cu pas, la 30 de minute, la 6 și 24 ore după inoculare utilizând un stereomicroscop Zeiss (Germania). Fotografii au fost capturate cu o cameră Canon (SUA) atașată stereomicroscopului.

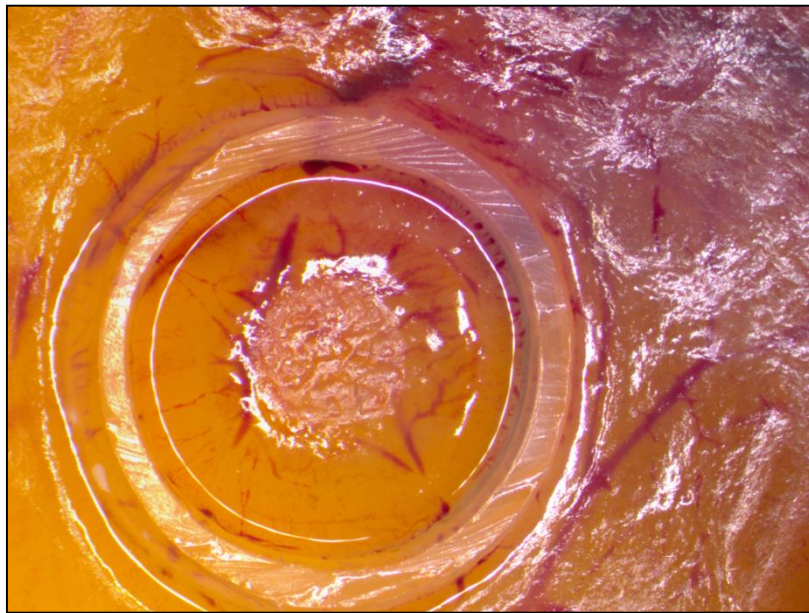
### Rezultate

Inocularea celulelor pe membrană chorioallantoică a fost efectuată cu atenție astfel încât aria membranei să fie lipsită de vase de sânge. Faptul că am avut de a face cu o inoculare adecvată a fost recunoscut prin prezența unor bule mici la locul de inoculare. Nu au apărut evenimente hemoragice.

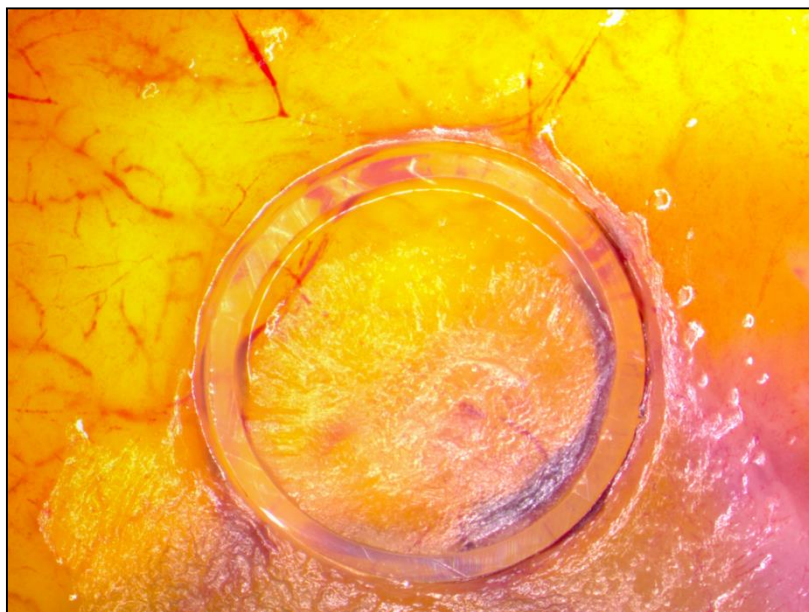
Treizeci de minute mai târziu, evaluarea membranei chorioallantoice a evidențiat modificări vasculare în jurul locului de inoculare. A apărut o reacție hiperemică în vasele de sânge mici, perfuzate, orientate spre locul de inoculare. Dezvoltarea rețelei vasculare a



continuat și, la 5 ore după inoculare, am observat o rețea bine dezvoltată de vase de sânge mici interconectate.



**Fig. 13.** Aspectul membranei chorioallantoice expuse la eugenol



**Fig. 14.** Aspectul membranei chorioallantoice expuse la eugenol

În cazul probei de eugenol au fost evenimente hemoragice persistente și au devenit mai evidente la 24 ore după inoculare împreună cu o zonă vasculară matură și funcțională. Proba de poliuretan cu eugenol s-a comportat mai bine, nefiind înregistrate efecte hemoragice nedorite.

**Obiectivul 2.6 a fost îndeplinit complet, în condiții optime, rezultatele obținute fiind conforme cu cele asumate în cererea de finanțare depusă.**

## 2.7 Validarea cunoștințelor transferate către SC TITUS&SONS SRL, cu privire la testele fizico-chimice ale noilor formulări

În cadrul acestui an de activitate aferent proiectului în parteneriat UMFVBT – SC TITUS&SONS SRL s-au programat vizite și training-uri observaționale ale tinerilor din grupul UMFVBT, coordonat de d-na Prof.univ.dr. Laura-Cristina Rusu.

Tinerii au beneficiat de un training premergător în ceea ce privește tema și datele de studiu din actualul proiect, training asigurat de managerul firmei SC TITUS&SONS SRL, participant direct la realizarea primelor obiective. Menționăm că acest coordonator al training-ului beneficiază de un background solid în domeniul de studiu. Datele prezentate au avut în conținut și mențiuni cerute de UMFVBT, prin reprezentatul său d-na Prof.univ.dr. Laura-Cristina Rusu, care a adus un aport deosebit referitor la aplicabilitatea practică a ideilor cuprinse în acest proiect. În prima vizită de lucru reprezentanții agentului economic au prezentat istoricul și specificul companiei de producție, precum și organizarea generală a acesteia. Au urmat alte două vizite pe teme științifice, susținute de d-na Prof.univ.dr. Laura-Cristina Rusu și d-nul Conf.univ.dr. Florin Borcan. Întreaga logistică și programare a fost derulată cu ajutorul agentului economic, care a oferit și pus la dispoziție noțiuni legate de managementul firmei și cel al pieței de desfacere.

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) este o tehnică importantă și comună în determinarea structurii chimice, orientarea lanțului polimeric și compoziției în cazul compușilor organici, anorganici și polimerici.

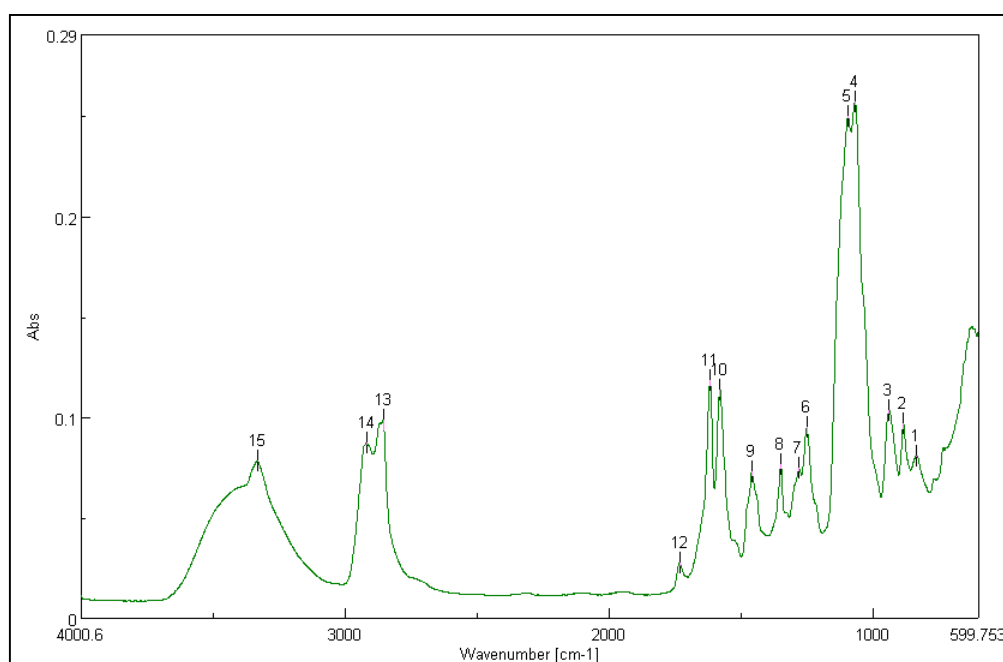


**Fig. 15.** Echipament FT-IR Jasco 600

Analizele s-au efectuat pe un spectrometru FT-IR JASCO 6200, echipat cu dispozitiv de reflexie totală atenuată (ATR) de tip Golden Gate, din dotarea laboratorului nostru. După

realizarea unui contact bun între probă și cristal, s-au înregistrat spectrele cu o rezoluție de  $4\text{ cm}^{-1}$ , prin suprapunerea a aproximativ 160 spectre. După înregistrare, fiecare spectru a fost prelucrat folosind soft-ul dedicat al aparatului, respectiv *Spectra Analysis*.

În spectrul FTIR realizat pe proba de poliuretan se observă benzi de absorbție caracteristice la:  $3334,32\text{ cm}^{-1}$  datorată vibrației de alungire a legăturii N-H (gruparea uretanică); la  $1733,69\text{ cm}^{-1}$  datorate vibrației de alungire a legăturii C=O din gruparea carbonil uretanică; la  $1580,38\text{ cm}^{-1}$  datorate vibrației de deformare a legăturii uretanice N-H; la  $1251,58\text{ cm}^{-1}$  datorate vibrației de alungire a legăturii C-N cuplată cu vibrația de alungire a legăturii C-O, iar la  $1068,37\text{ cm}^{-1}$  banda de absorbție care corespunde legăturii formate între grupările -OH și -NCO (C-O-C) din poliuretan. Alături de aceste benzi se mai evidențiază și benzile de absorbție datorate vibrațiilor de alungire asimetrice și simetrice a legăturii C-H din gruparea metilenică, la  $2920,66\text{ cm}^{-1}$  și  $2857,02\text{ cm}^{-1}$  precum și banda de absorbție datorată vibrației de deformare a grupării metilen la  $1459,85\text{ cm}^{-1}$ .

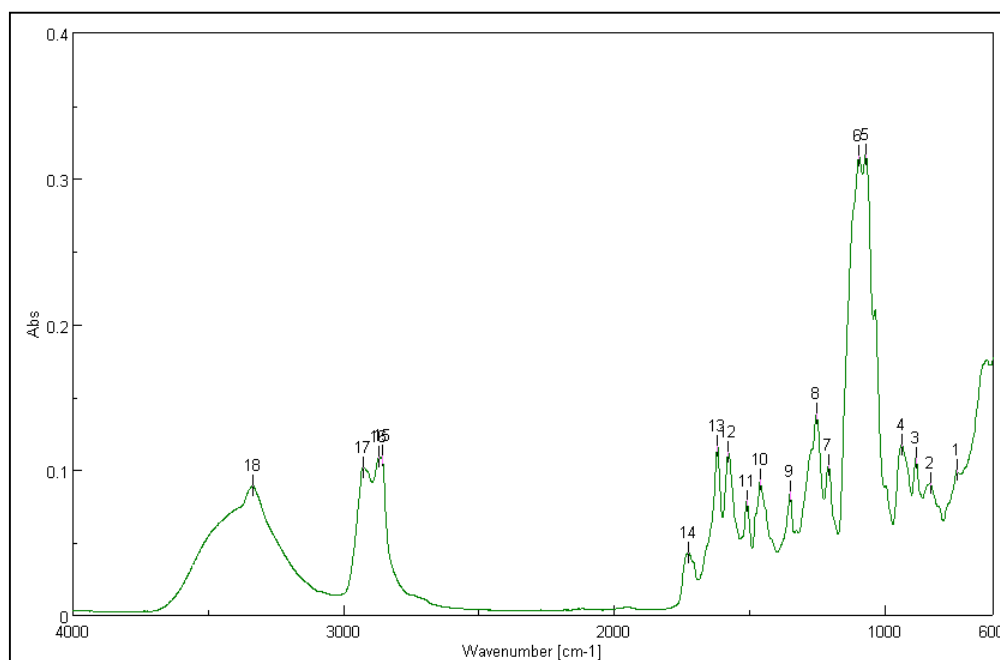


**Fig. 16.** Spectrul FTIR obținut pe proba de poliuretan

**Tabelul 4.** Numerele de undă pentru grupările funcționale prezente în structura poliuretanului

Număr bandă de absorbție	Numărul de undă, $[\text{cm}^{-1}]$	Gruparea de absorbție și tipul de vibrație
15	3334,32	$\nu(\text{N-H})$
14	2920,66	$\nu_a(\text{C-H})$ din gruparea $\text{CH}_2$

13	2857,02	$\nu_s(\text{C-H})$ din gruparea $\text{CH}_2$
12	1733,69	$\nu(\text{C=O})$
11	1617,98	$\nu(\text{C=C})$ din inelul benzenic
10	1580,38	$\delta(\text{N-H})$
9	1459,85	$\delta(\text{C-H})$ din gruparea $\text{CH}_2$
6	1251,58	$\nu(\text{C-N}), \nu(\text{C-O})$
4	1068,37	$\nu(\text{C-O-C})$



**Fig. 17.** Spectrul FTIR obținut pe proba de poliuretan cu eugenol

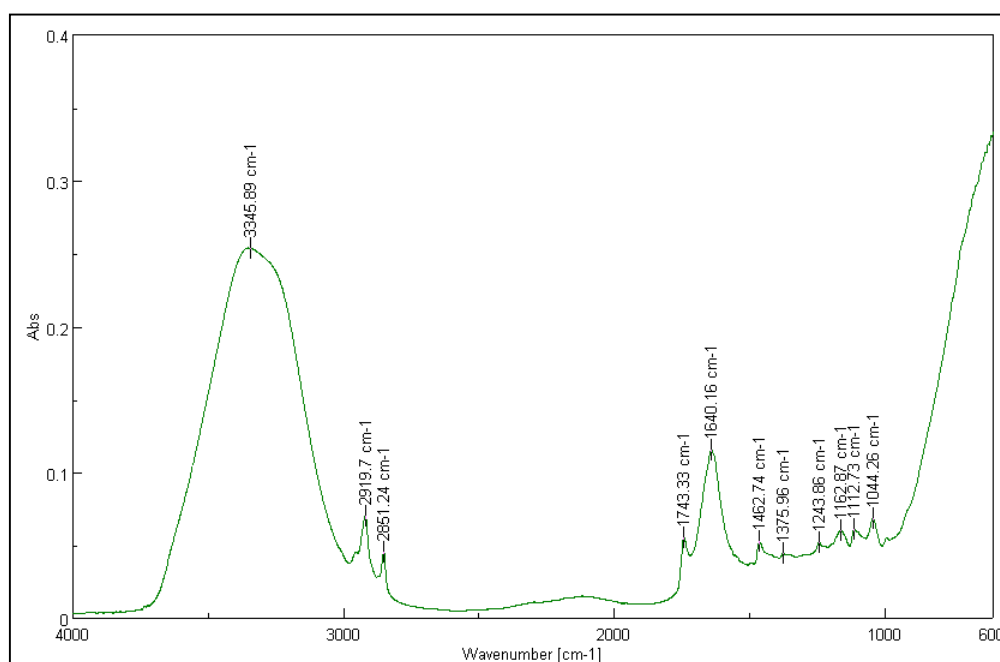
**Tabelul 5.** Numerele de undă pentru grupările funcționale prezente în structura poliuretanului cu eugenol

Număr bandă de absorbție	Numărul de undă, $[\text{cm}^{-1}]$	Gruparea de absorbție și tipul de vibrație
18	3335,28	$\nu(\text{N-H})$
17	2929,34	$\nu_a(\text{C-H})$ din gruparea $\text{CH}_2$
15	2858,02	$\nu_s(\text{C-H})$ din gruparea $\text{CH}_2$
14	1725,98	$\nu(\text{C=O})$
13	1618,95	$\nu(\text{C=C})$ din inelul benzenic
12	1577,49	$\delta(\text{N-H})$
11	1509,99	$\nu(\text{C-C})$ din nucleul benzenic
10	1459,85	$\delta(\text{C-H})$ din gruparea $\text{CH}_2$

8	1252,54	$\nu(\text{C-N}), \nu(\text{C-O})$
5	1070,30	$\nu(\text{C-O-C})$

În spectrul FTIR al probei de poliuretan cu eugenol se pot identifica benzile caracteristice poliuretanului (prezentate în Tabelul 2) datorate vibrației de alungire a legăturii N-H (gruparea uretanică); vibrației de alungire a legăturii C=O din gruparea carbonil uretanică; vibrației de deformare a legăturii uretanice N-H; vibrației de alungire a legăturii C-N cuplată cu vibrația de alungire a legăturii C-O; vibrațiilor de alungire asimetrice și simetrice a legăturii C-H din gruparea metilenică și vibrației de deformare a grupării metilen. Suplimentar se poate identifica la  $1509,99 \text{ cm}^{-1}$  o bandă de absorbție datorată vibrației legăturii C-C din nucleul benzenic al eugenolului.

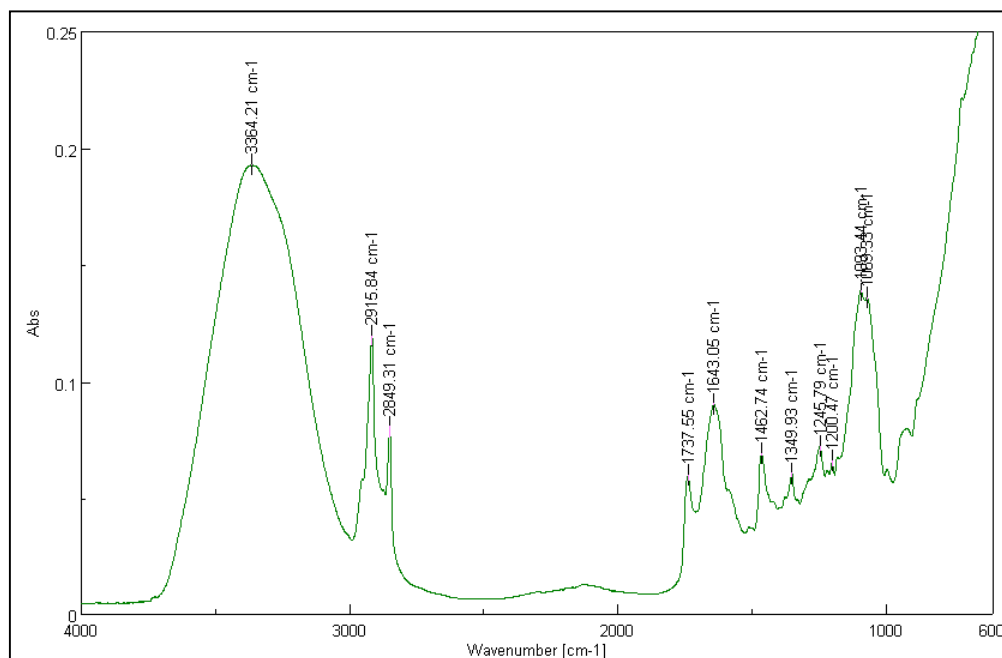
Formula Quasiderm este una consacrată și prezintă următoarea compoziție: ulei de cătină, ulei de măceșe, ulei de sămburi de strugure, ulei de măsline, alantoină, glicerină, unt de avocado, unt de migdale dulci, sabowax, dermarol, carbomer, EDTA, hidroxid de sodiu, Niparox TM BHT, apă până la 100 părți.



**Fig. 18.** Spectrul FTIR obținut pe formula QUASIDERM

Spectrul FTIR înregistrat pe produsul Quasiderm pune în evidență benzi de absorbție datorate vibrațiilor de alungire a grupării hidroxil la  $3345,89 \text{ cm}^{-1}$  iar la  $1743,33 \text{ cm}^{-1}$  datorate vibrațiilor de alungire a legăturii C=O (gruparea carbonil). Între  $1110 \text{ cm}^{-1}$  și  $1245 \text{ cm}^{-1}$  apar benzi datorate vibrațiilor de deformare a grupării -OH și benzi datorate vibrațiilor de alungire a legăturii C-O din vecinătatea grupării carbonil. De asemenea, se mai evidențiază benzi

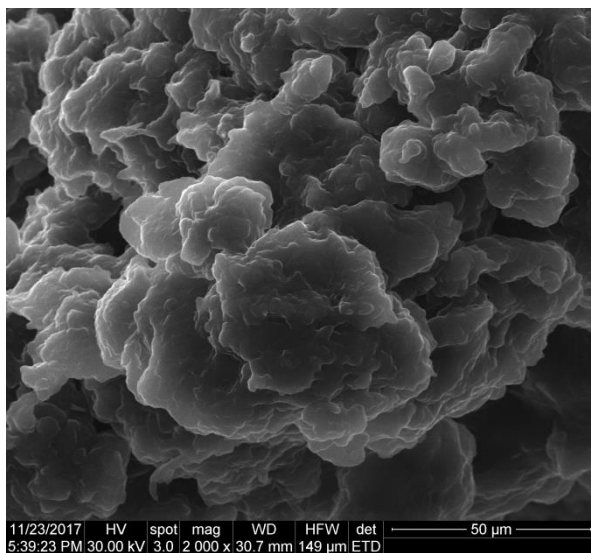
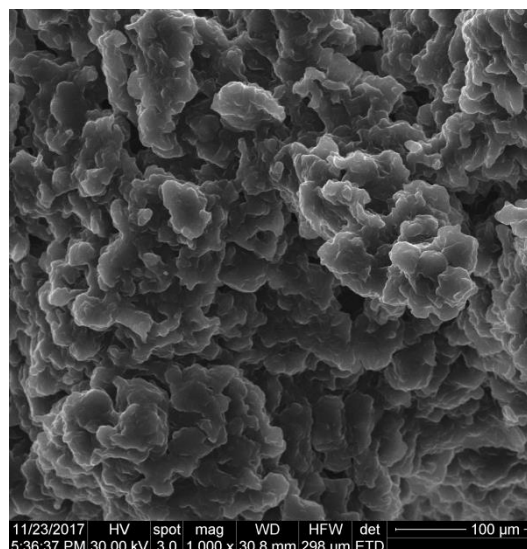
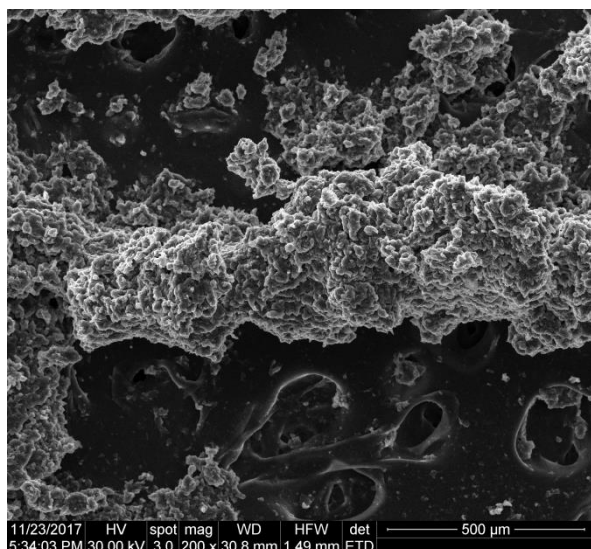
datorate vibrațiilor de alungire și deformare a legăturilor C-H din gruparea metilen. Toate aceste benzi sunt caracteristice compușilor existenți în compoziția formulei Quasiderm, carbomer (polimeri ai acidului acrilic), EDTA, NaOH, apă și uleiuri.



**Fig. 19.** Spectrul FTIR obținut pe proba de poliuretan-eugenol-formula QUASIDERM

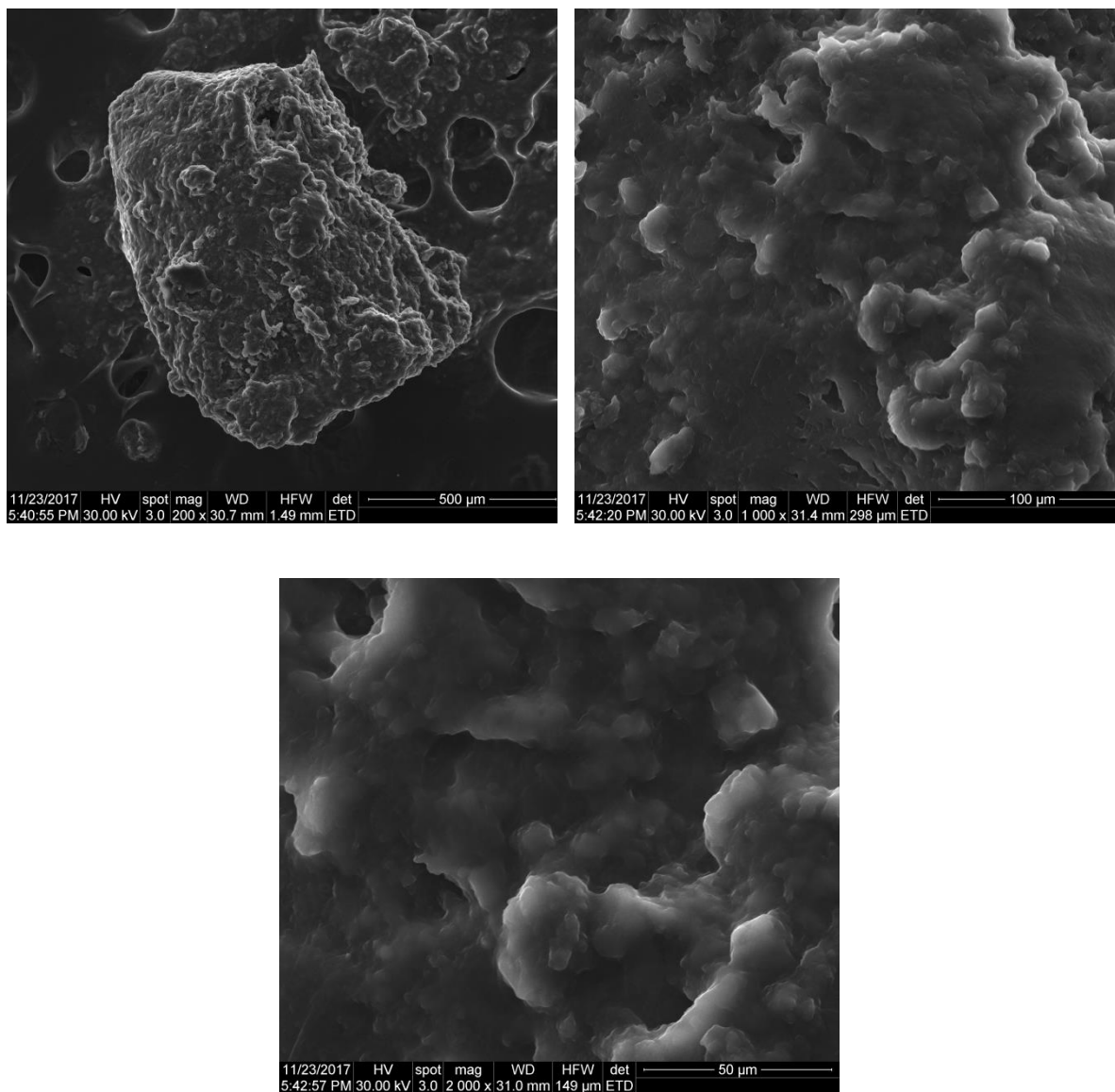
În spectrul FTIR al probei poliuretan-eugenol-formula QUASIDERM se observă benzile de absorbție datorate vibrațiilor de alungire a grupării hidroxil, benzi datorate vibrațiilor de alungire a legăturii C=O, benzi datorate vibrațiilor de deformare a grupării -OH, benzi datorate vibrațiilor de alungire a legăturii C-O din vecinătatea grupării carbonil, benzi de absorbție a legăturii C-O-C din poliuretan și benzi datorate vibrațiilor de alungire și deformare a legăturilor C-H din gruparea metilen.

Imaginile SEM înregistrate pe probele investigate sunt prezentate în figurile următoare. A fost utilizat un microscop electronic de baleiaj QUANTA INSPECT F prevăzut cu un tun de electroni cu emisie în câmp – FEG (field emission gun) cu rezoluție de 1,2 nm și spectrometru de raze X dispersiv în energie (EDS) cu rezoluția la MnK de 133 eV.

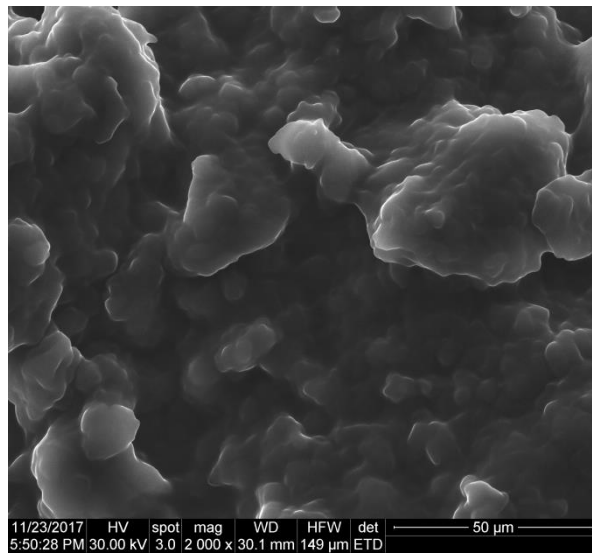
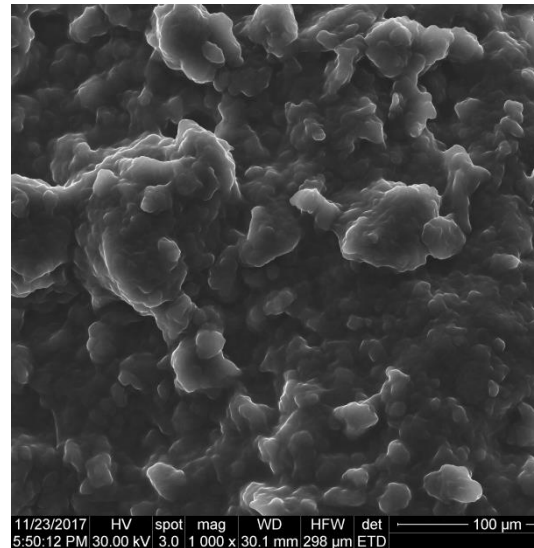
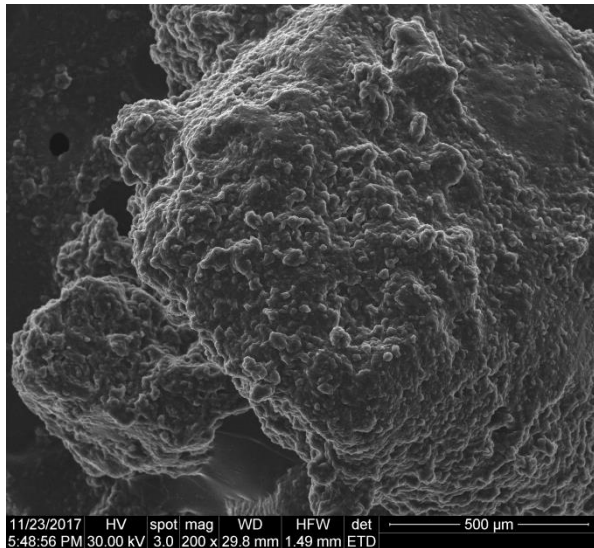


**Fig. 20.** Imagini SEM obținute pe proba de poliuretan





**Fig. 21.** Imagini SEM obținute pe proba de poliuretan cu eugenol



**Fig. 22.** Imagini SEM obtinute pe proba de poliuretan-eugenol-formula QUASIDERM

**Obiectivul 2.7 a fost îndeplinit complet, în condiții optime, rezultatele obținute fiind conforme cu cele asumate în cererea de finanțare depusă.**