



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00575**

(22) Data de depozit: **11/08/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2019** BOPI nr. **9/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. **5/2017**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI"
DIN IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ
NR.41 A, IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **BUTNARU ELENA, BD. NICOLAE IORGA
NR. 43A, BL. X1, ET. 3, AP. 15, IAȘI, IS, RO;**
• **STOLERU ELENA, BD. PRIMĂVERII
NR. 19C, BL. D2B, ET. 4, AP. 17, IAȘI, IS,
RO;**
• **BREBU MIHAJ ADRIAN,
STR. PLOPII FĂRĂ SOȚ NR. 7
TRONSON 1, ET. 1. AP. 6, IAȘI, IS, RO;**
• **RĂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3,
BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **VASILE CORNELIA, STR.PANTELIMON
NR.29, BL.308, SC.A, ET.3, AP.12, IAȘI, IS,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**Y. Y. QIN Ș.A., "PHYSIO-MECHANICAL
PROPERTIES OF AN ACTIVE CHITOSAN
FILM INCORPORATED WITH
MONTMORILLONITE AND NATURAL
ANTIOXIDANTS EXTRACTED FROM
POMEGRANATE RIND", J. FOOD. SCI.
TECHNOL., VOL. 52(3), 20015;**
**MOHAMMAD HASHEM HOSSEINI Ș.A.,
"IMPROVING ANTIBACTERIAL ACTIVITY
OF EDIBLE FILMS BASED ON CHITOSAN
BY INCORPORATING THYME AND CLOVE
ESSENTIAL OILS AND EDTA",
JOURNAL OF APPLIED SCIENCES, 2008**

(54) **MATERIAL POLIMERIC BIOCOMPATIBIL CU PROPRIETĂȚI
ANTIMICROBIENE ȘI ANTIOXIDANTE, ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTUIA**



1 Invenția se referă la un material polimeric antibacterian și antioxidant obținut, și la
3 procedeul de obținere al acestuia prin încorporarea de uleiuri vegetale, cum ar fi ulei din
5 sămburi de măceșe rezultat prin presare la rece și nanoargilă tip montmorilonit, în matrice
7 de chitosan, cu proprietăți mecanice îmbunătățite și proprietăți de barieră superioare, și pro-
9 cedeul de obținere a acestora, având aplicații în industria de ambalare bioactivă a alimen-
11 telor, oferind o mai bună conservare a acestora și prelungirea termenului lor de valabilitate.

13 Bioîncorporarea constă în introducerea și imobilizarea unor molecule bioactive în
15 matrici polimerice. Această metodă este intens utilizată în industria alimentară [Gomez-
17 Estaca J., López de Lacey A., López-Caballero M. E., Gómez-Guillén M.C., Montero P.,
19 “*Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial*
21 *agents for fish preservation*”, *Food Microbiology* 27(7): 889-896, 2010; López-Mata M.
23 A., Ruiz-Cruz S., Silva-Beltrán N. P., Ornelas-Paz J. J., Zamudio-Flores P. B., Burruel-
25 lbarra S. E., “*Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan*
27 *films incorporated with carvacrol*”, *Molecules* 18:13735-13753, 2013]. În ultimele decenii,
29 încorporarea compușilor bioactivi precum vitamine, proteine, coloranți, argile sau uleiuri
31 vegetale a devenit o tehnologie de mare interes. Încorporarea de compuși bioactivi în matrici
33 polimerice se poate realiza prin tehnica emulsiei. Emulsiile sunt amestecuri a două lichide
imiscibile care sunt stabilizate cu ajutorul unui agent tensioactiv. O emulsie poate fi obținută
utilizând diferite procese, precum: microfluidizarea, omogenizarea la presiune înaltă sau
ultrasonarea. Emulsiile sunt în general obținute prin procesul de dispersare cu ajutorul ultra-
sonetelor, fiind o metodă accesibilă și convenabilă din punct de vedere economic [Sugumar
S., Mukherjee A., Chandrasekaran N., “*Eucalyptus oil nanoemulsion-impregnated*
chitosan film: antibacterial effects against a clinical pathogen, Staphylococcus
aureus, in vitro”, *International Journal of Nanomedicine* 10 (Suppl 1):67-75, 2015].
Pentru stabilizarea emulsiilor, în general se folosesc surfactanți precum Tween 20 sau
Tween 80, cu rol de a ușura dispersarea fazei interne în cea externă și de a stabiliza emulsia
prin formarea unui strat monomolecular în jurul particulelor dispersate, astfel protejându-le
de aglomerare.

29 Biopolimerii utilizați ca matrici sub formă de filme sunt materiale excelente pentru
31 încorporarea unor tipuri variate de aditivi, precum substanțe antioxidante sau agenți antifun-
33 gici și antimicrobieni [Rhim J., Ng P., “*Natural biopolymer-based nanocomposite films*
for packaging applications”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(4):411-
433, 2007].

35 Determinarea proprietăților de barieră ale unui polimer este importantă pentru estima-
37 rea și precizarea termenului de valabilitate a produsului ambalat. În general, polizaharidele,
inclusiv chitosanul, pot forma legături intra- și intermoleculare, și astfel este de așteptat ca
39 aceste materiale biodegradabile să aibă proprietăți superioare de barieră comparativ cu
41 filmele convenționale utilizate în industria ambalajelor. Vaporii de apă, oxigenul și dioxidul
de carbon sunt parametri importanți care sunt studiați în aplicațiile pentru ambalaje, deoa-
43 rece pătrunderea oxigenului prin pereții ambalajului conduce la oxidarea alimentului (modi-
ficări de miros, culoare, aromă) [Mura S., Corrias F., Stara G., Piccinini M., Secchi N.,
Marongiu D., Innocenzi P., Irudayaraj J., Greppi G.F., “*Innovative composite films of*
chitosan, methylcellulose, and nanoparticles”, *Journal of Food Science* 76(7): N54-60,
2011].

45 Chitosanul este un polimer biodegradabil, netoxic, derivat din chitină, aceasta fiind
47 al doilea polimer natural după celuloză. De asemenea, chitosanul este un material mai des
utilizat în industria ambalajelor comparativ cu alți biopolimeri, datorită activității sale puternic
antimicrobiene împotriva bacteriilor și mucegaiurilor și prin urmare poate prelungi termenul

de valabilitate al alimentelor. S-a demonstrat că filmele de chitosan pot crea o barieră semi-permeabilă, care poate întârzia creșterea microbiană și astfel protejează calitatea alimentelor [González-Aguilar G. A., Valenzuela-Soto E., Lizardi-Mendoza J., Goycoolea F., Martínez-Téllez M. A., Villegas-Ochoa M. A., Monroy-García I. N., Ayala-Zavala J. F., “*Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh/cut papaya 'Maradol'*”, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(1): 15-23,2009]. Cu toate acestea, unul dintre principalele dezavantaje ale chitosanului este acțiunea sa limitată ca barieră împotriva umidității și a activității antioxidante slabe. Pentru îmbunătățirea acestor proprietăți s-a studiat posibilitatea încorporării de compuși bioactivi, precum uleiuri esențiale sau obținute prin presare la rece, în matricea de chitosan [Campos C. A., Gerschenson L. N., Flores S. K., “*Development of edible films and coatings with antimicrobial activity*”, *Food and Bioprocess Technology* 4(6):849-875, 2011]. Hosseini et al. [Hosseini M. H., Rayavi S. H., Mousavi, S.M. A., Zasagi S. A. S., Hasansaraei A. G., “*Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA*”, *J. Appl. Polym. Sci.*, 8 (16) 2895-2900, 2008] au încorporat uleiuri esențiale de cuișoare și cimbru în chitosan pentru a obține acoperiri comestibile pentru alimente. Pentru a împiedica pierderea uleiurilor esențiale din recepturi, se practică reticularea cu EDTA. Deși agentul de reticulare este aprobat pentru folosire în contact cu alimentele, reacția de reticulare complică procedeul, iar produșii de reacție nu au fost testați din punctul de vedere al toxicității.

Industria alimentară a acordat o atenție deosebită uleiurilor vegetale datorită proprietăților antioxidante și antimicrobiene. Uleiul din sămburi de măceșe are o consistență ușoară, de culoarea chihlimbarului, fiind obținut din miezul semințelor de măceșe prin presare la rece. Sămburii de măceșe au conținut mic de ulei, aproximativ 8%. Principalii componenți ai uleiului de măceșe sunt acizii linolenic și linoleic (40,5% și, respectiv, 16%) [da Silva C. E., Vandenabeele P., Edwards H. G., de Oliveira L. F., “*NIR-FT-Raman spectroscopie analytical characterization of the fruits, seeds, and phytotherapeutic oils from rosehips*”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392:1489-1496, 2008]. Uleiul din sămburi de măceșe (UM) conține o varietate de compuși chimici (în principal, carotenoide, tocoferoli, squalene, fitosteroli, compuși fenolici, acizi grași) care conferă activitate antioxidantă și antimicrobiană acestuia [Grajzera M., Prescha A., Korzonek K., Wojakowska A., Dziadas M., Kulma A., Grajeta H., “*Characteristics of rose hip (Rosa canina L.) cold-pressed oil and its oxidative stability studied by the differential scanning calorimetry method*”, *Food Chemistry* 188:459-466, 2015].

Uleiurile de măceșe obținute prin presare la rece conțin cantități însemnate de Omega-3 (acid linolenic), Omega-6 (acid linoleic), Omega 9 (acid oleic), care le conferă proprietăți regenerative, antiinflamatorii, de hidratare refăcând bariera lipidică. Vitamina C conținută în uleiul de măceșe dezactivează radicalii liberi și eliberează pielea de substanțele nocive, prevenind dermatitele și acneea [<https://www.mindbodygreen.com/articles/skin-benefits-of-rosehip-seed-oil>].

O altă alternativă privind îmbunătățirea proprietăților de barieră, precum și cele mecanice ale filmelor pe bază de chitosan, reprezintă obținerea de nanocompozite deoarece prin folosirea unei cantități mici de nanoargilă materialul nou obținut va avea proprietăți fizice, termice și mecanice semnificativ mai bune. Din mai multe studii s-a observat îmbunătățirea proprietăților mecanice [Lavorgna M., Piscitelli F., Mangiacapra P., Buonocore G. G., “*Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films*”, *Carbohydrate Polymers* 82(2):291-298, 2010] și de barieră [Casariego A., Souza B.W.S., Cerqueira M.A., Teixeira J.A., Cruz L., Diaz R, Vicente A.A.,

1 “Chitosan/clay films’ properties as affected by biopolymer and clay
micro/nanoparticles’ concentrations”, *Food Hydrocolloids* 23(7): 1895-1902, 2009] ale
3 filmelor pe bază de chitosan încorporate cu un conținut de 1/5 wt.% nanoargilă [Qin Y.-Y.,
Zhang Z.-H., Li.L., Yuan M.-L., Fran J., Zhao T.-R., “*Physio-mechanical properties of*
5 *an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants*
extracted from pomegranate rind”, *J. Food Sci. Technol.* 52(3) 147-1470, 2015]. Qin et
7 al., 2015, au raportat obținerea unor filme din chitosan, argilă și extract etanolic de rodie prin
plastifierea chitosanului cu glicerol și argilă MMT prin evaporarea solventului. De obicei,
9 uleiurile obținute prin extracție etanolică prezintă volatilitate ridicată, iar de aceea o cantitate
semnificativă se poate pierde în cursul preparării sau migrează în alimentul ambalat. Prin
11 prepararea soluției și filtrare, compoziția filmului final este modificată.

Tot în stadiul tehnicii, în articolele *Physio-mechanical properties of an active*
13 *chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted*
from pomegranate rind, *J. Food. Sci. Technol.* v.52(3), 2015 Mar, autor YY Qin ș.a., și
15 *Improving Antibacterial Activity of Edible Films Based on Chitosan by Incorporating*
Thyme and Clove Essential Oils and EDTA, *Journal of Applied Sciences*, 2008, autor
17 **Mohammad Hashem Hosseini ș.a.**, se prezintă îmbunătățirea caracteristicilor fizico-
macanice a filmelor pe bază de chitosan.

19 Invenția de față rezolvă problema lipsei flexibilității filmului de chitosan pur, precum
și îmbunătățirea proprietăților mecanice și de barieră, prin încorporarea unor substanțe cu
21 caracter antioxidant și antimicrobian, precum uleiul de măceșe obținut prin presare la rece
și nanoargila C30B aprobată pentru utilizarea în contact cu alimentele și produsele
23 farmaceutice.

Materialul polimeric biocompatibil, cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante pentru
25 aplicații în industria ambalajelor pentru alimente, conform invenției, este constituit din
54,9...55,8% chitosan cu masă moleculară medie, 36,6...37,2% ulei din sămburi de măceșe
27 obținut prin presare la rece în raport de 0,75 ml/1 g chitosan, 6,86...6,97% monooleat de poli-
oxietilenă sorbitan în raport de 0,125 g/1 g chitosan și 1,64% argilă tip montmorilonit modi-
29 ficată cu sare cuaternară de amoniu de preferință clorură de alchil bis (2-hidroxietyl) metil-
amoniu.

31 Procedul de obținere a materialului biocompatibil conform invenției constă în dizol-
varea chitosanul în soluție de acid acetic de concentrație 5%, sub agitare magnetică
33 obținându-se o concentrație de 3%, apoi în soluția de chitosan se adaugă uleiul din sămburi
de măceșe în proporție de 0,75 ml/1 g chitosan, 0,375 g monooleat de polioxietilenă sorbitan,
35 în raport de 0,125 g/1 g chitosan, și 0,09 g argilă C30B; emulsiile astfel obținute se omoge-
nizează prin agitare magnetică/ultrasonare, apoi se obțin filme prin turnarea a 50 ml emulsie
37 în vase Petri și uscarea la o temperatură de 25°C timp de 24 h și apoi la o temperatură de
40°C, fiind condiționate în exicator timp de 2 zile la o temperatură de 22°C cu o soluție satu-
39 rată de NaBr, obținându-se filme uniforme de culoare gălbui-roșiatică, cu grosime de
0,148...0,237 mm, o alungire de 3,8...11,65%, un modul de elasticitate de
41 3232,3...9302,1 MPa, rezistență la rupere de 60,1...122,0 MPa, cu un grad de inhibare a
unor microorganisme de 59...82% pentru *Bacillus cereus*, 86...90% pentru *Escherichia coli*,
43 și de 61...68% pentru *Salmonella typhimurium*, permeabilitate mică la O₂ de
67...212 ml/m²/zi și, respectiv, CO₂ de 18...45 ml/m²/zi și cu activitate antioxidantă mărită de
45 la 1,6% la 6,78%.

Invenția prezintă avantajul că se obțin filme pe bază de chitosan în care se încorpo-
47 rează ulei de măceșe obținut prin presare la rece și argilă modificată organic C30B, cu pro-
rietăți speciale, ce se pot utiliza ca ambalaje în industria alimentară prin aceea că filmul pe

RO 131873 B1

bază de chitosan/ulei de măceșe/argilă montmorilonit prezintă o acțiune sinergetică a compușilor bioactivi constituenți, activitate antioxidantă și antibacteriană superioară celor ale componentelor, flexibilitate mărită, proprietăți de barieră la oxigen și dioxid de carbon, caracteristici necesare pentru aplicația urmărită. 1
3

Compoziția conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea că uleiul de măceșe obținut prin presare la rece are o volatilitate scăzută, fiind stabil atât în cursul preparării, cât și al utilizării, iar acesta și nanoargila C30B (aprobată FDA) sunt încorporate în filmul de chitosan la temperatura camerei, prin procesul de dispersare cu ajutorul ultrasunetelor și în prezență de agent emulsifiant Tween 80, asigurându-se astfel o bună omogenizare a componentelor, stabilitate și controlul proprietăților, obținându-se un material flexibil și cu proprietăți mecanice îmbunătățite, de barieră superioară, și cu activitate antimicrobiană și antioxidantă semnificativ îmbunătățite comparativ cu cele ale filmului de chitosan pur. 5
7
9
11

Scopul invenției de față este încorporarea unor compuși bioactivi, respectiv uleiul de măceșe rezultat din presarea la rece a semințelor, la presiuni ridicate, și nanoargila C30B în matricea de chitosan și crearea unei bariere între compușii bioactivi și mediul extern. Această barieră reprezintă o protecție împotriva oxigenului, apei, luminii și evitarea contactului cu alimentul, precum și controlul eliberării lor în timp. 13
15
17

Pentru obținerea materialelor încorporate descrise în invenția de față, s-au utilizat:
- chitosan cu masă moleculară medie (CHM), achiziționat de la firma Sigma Aldrich, cu Mw = 190000...300000 g/mol, grad de deacetilare de 75...85% și viscozitate 200...800 cP;
- ulei din sămburi de măceșe (UM) comercial de la firma Herbavit, România; acesta se obține prin presare la rece (presiune ridicată) în instalații mici din semințe de măceșe. Fructele au fost colectate din tufele de măceș sălbatic care crește în România (specia *Rosa canina L.*, aparținând clasei *Rosa genus* din familia *Rosaceae*). Conform specificațiilor producătorului, uleiul are un conținut ridicat de acizi grași mononesaturați, și anume oleic (10...20%); acizi grași polinesaturați esențiali: linoleic (35...50%) și linolenic (25...50%), și, de asemenea, acizi palmitic și stearic; 19
21
23
25
27

- monooleat de polioxietilenă sorbitan sau Tween 80 (T80), cunoscut și sub denumirea de Polisorbat 80, este un surfactant neionic și emulsifiant și se prezintă sub forma unui lichid galben vâscos solubil în apă. În protocolul experimental s-a utilizat Tween 80 produs de firma Sigma Aldrich, a cărui masă moleculară este de 1310 g/mol, cu un conținut > 58% acid oleic; 29
31

- cloisite 30B Montmorilonite (C30B) procurat de la firma Southern Clay Inc de la Rockwood Additives Ltd., este o argilă tip montmorilonit modificată cu sare cuaternară de amoniu (MT2EtOH = clorură de alchil bis (2-hidroxietil) metilamoniu), cu un conținut de argilă de 75%, umiditate < 2% și densitate 1,98 g/cm³. Structura argilei conține lanțuri de grăsimi derivate din seu (T) cu următoarea compoziție: ~ 65% C18, ~ 30% C16 și ~ 5% C14. Cloisite 30B este cea mai utilizată argilă tip montmorilonit, deoarece, fiind modificată organic cu un surfactant, dispune de două grupări funcționale (grupări OH și ramificări alchil legate de grupări cuaternare de amoniu) [Esposito A., Raccurt O., Charneau J-Y., Duchet-Rumeau J., "Functionalization of Cloisite 30B with fluorescent dyes", *Applied Clay Science* 50(4):525-532, 2010] și este aprobat pentru utilizarea în contact cu alimentele de către FDA. 33
35
37
39
41

Procedeele de obținere conform invenției, constă în aceea că se obțin filme pe bază de CHM/UM și CHM/UM_C30B prin tehnica de emulsifiere/evaporare a solventului în condiții controlate. Pentru aceasta s-au dizolvat 3 g chitosan în 100 ml soluție acid acetic de concentrație 5%, timp de 72 h sub agitare magnetică. Apoi, în soluția de chitosan se adaugă 2 ml ulei din sămburi de măceșe (0,75 ml/1 g chitosan), 0,09 g argilă C30B și 0,375 g Tween 43
45
47

RO 131873 B1

1 80 (0,125 g/1 g chitosan). Emulsiile astfel obținute au fost omogenizate cu ajutorul unui
2 aparat de ultrasonare UP50H (Hielscher - Ultrasound Technology, Teltow, Germania, 50 W
3 la 30 kHz). Filmele au fost obținute prin turnarea a 50 ml emulsie în vase Petri din sticlă
4 (suprafață de 153 cm) și uscarea mai întâi în nișă cu ventilație la 25°C timp de 24 h și apoi
5 la etuvă la 40°C. Pentru o uscare mai eficientă, filmele au fost ulterior uscate și la etuva de
6 vid, la 40°C, timp de 24 h, pentru a obține filme uniforme de culoare gălbui-roșiatic. Înainte
7 de caracterizarea fizico-chimică, filmele au fost condiționate în exicator timp de 2 zile la 22°C,
8 cu o soluție saturată de NaBr (umiditate relativă 58%). Noile materiale sub formă de filme
9 antioxidante, antimicrobiene și cu permeabilitate scăzută la gaze, flexibile, au proprietăți
10 mecanice îmbunătățite și sunt destinate aplicațiilor în industria ambalajelor pentru alimente
11 pentru o bună conservare și prelungirea termenului de valabilitate a acestora.

În continuare, se dau 2 exemple de realizare a invenției, unde sunt redate comporta-
12 rea mecanică și permeabilitatea la O₂/CO₂ a materialelor obținute, gradul de inhibare a unor
13 microorganisme ca, de exemplu, *Bacillus Cereus*, *Escherichia coli* și *Salmonella*
14 *typhymurium*, precum și date privind caracterul antioxidant al materialelor pe bază de CHM
15 conținând ulei din sămburi de măceșe și argilă C30B ca agenți bioactivi, antimicrobieni și
16 antioxidanți. Exemplele sunt date și în legătură cu fig. 1...4, care reprezintă:

17 - fig. 1: schema tehnologiei de obținere a filmelor pe bază de chitosan, ulei din
18 sămburi de măceșe și argilă C30B.

19 - fig. 2: spectrele FTIR-ATR ale uleiului de măceșe, chitosan și a materialelor obținute
20 prin tehnica emulsiei.

21 - fig. 3: valorile (a) alungirii la rupere, (b) modulului lui Young și (c) rezistenței la
22 rupere pentru CHM și materialele (exemplele 1 și 2) obținute prin tehnica emulsiei.

23 - fig. 4: activitatea antiradicalică DPPH a CHM și materialele (exemplele 1 și 2)
24 obținute prin tehnica emulsiei.

25 Metode de caracterizare

26 FTIR-ATR: Probele au fost investigate cu ajutorul tehnicii analitice FTIR-ATR, înregist-
27 trând spectrele corespunzătoare în absorbantă, în domeniul spectral cuprins între
28 500...4000 cm⁻¹ cu ajutorul unui spectrometru Bruker VERTEX 70. Toate spectrele (16 sca-
29 nări cu o rezoluție de 4 cm⁻¹ și raportat la un spectru background adecvat) au fost înregistrate
30 la 25°C. Procesarea și analiza spectrelor s-au realizat folosind programele OPUS și Origin.

31 Proprietăți mecanice: Testarea la tracțiune - caracteristicile evaluate la testele de
32 tracțiune (modulul lui Young, rezistența la rupere, alungirea la rupere) au fost înregistrate
33 conform standardului SR EN ISO 527-2/1996, utilizând un aparat Instron 3345, având viteza
34 de testare de 10 mm/min, lungimea epruvetei fiind de 40 mm. Toate epruvetele au fost inițial
35 condiționate la 23°C și 50% umiditate relativă. Au fost testate 5 epruvete și s-au luat în consi-
36 derare valorile medii ale rezultatelor.

37 Permeabilitatea la O₂/CO₂ - testele de permeabilitate au fost realizate cu ajutorul unui
38 tester de permeabilitate model Lyssy L100-5000 (Systech Illinois), la 23°C, după ce probele
39 au fost stabilizate minimum 4 h. Principiul de funcționare al aparatului constă în modificarea
40 presiunii prin intermediul transducerii gazului prin filme. În camera de măsurare, probele sub
41 formă de filme sunt separate în două compartimente, compartimentul inferior fiind vidat sub
42 presiune definită, în timp ce un flux continuu de gaz (O₂, CO₂, N₂ etc.) trece prin compar-
43 timentul superior. Prin închiderea supapei crește presiunea în compartimentul inferior dato-
44 rită migrației, prin intermediul filmului, a gazului din compartimentul superior. Instrumentul
45 măsoară timpul necesar pentru creșterea presiunii în termen de două limite pre-definite și,
46 comparând cu valorile măsurate pentru un film etalon, calculează permeabilitatea filmului
47 testat.

RO 131873 B1

Teste antimicrobiene - testele antimicrobiene au fost efectuate în conformitate cu metodele standard ISO 16649-2 SR/2007 - Microbiologia produselor alimentare și animale. Protocolul experimental pentru testarea eficienței antimicrobiene împotriva *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*, constă în următoarele etape: sterilizarea mostrelor; contaminare cu bacterii de cultură ATCC; inoculare și incubare efectuată la 24 și 48 h la 44°C; identificarea germenilor țintă. Sterilizarea probelor a fost făcută într-o autoclavă la 110°C, 0,5 bar timp de 20 min.

Identificarea germenilor țintă: următoarele metode standardizate ale procedurilor bacteriologice au fost utilizate în conformitate cu standardele în vigoare:

- SR ISO 16649 - *Escherichia coli*; Metoda orizontală pentru enumerarea bacteriilor din genul *Escherichia coli* β-glucuronidaza pozitivă. Partea 2: Tehnica numărării coloniilor la 44°C folosind 5-brom-4-clor-3-indolil beta-D-glucuronid conform "*Minerale Modified Glutamat bulion*" (Cat. 1,365) producerea coloniilor albastru sau verde-albastru pe agar glucuronid;

- SR EN ISO 6579/2003/AC/2004/AC/2006, 2007, metoda orizontală pentru detectarea bacteriilor din genul *Salmonella spp*;

- SR EN ISO 7932/2005, metoda orizontală pentru numărarea *Bacillus Cereus* prezumtiv. Tehnica de numărare a coloniilor la 30°C.

Activitatea antioxidantă: Pentru realizarea testului s-a utilizat 300 mg din fiecare probă, care au fost plasate într-un vas ce conține 10 ml cloroform sub agitare continuă timp de 24 h. Din fiecare amestec s-a extras un volum de 1,5 ml care s-a amestecat cu 3 ml de soluție etanolică DPPH (1,5*10...4 mol/l). Controlul a fost obținut prin amestecarea aceluiași volum de cloroform cu 3 ml de DPPH. Amestecurile au fost lăsate timp de 30 min la temperatura camerei, la întuneric, după care s-a măsurat absorbanta la 520 nm. Activitatea de dezactivare a radicalului a fost calculată folosind următoarea ecuație:

$$\% RSA = 100x \left(\frac{A_{control} - A_{proba}}{A_{proba}} \right) \quad (1)$$

Unde: %RSA reprezintă activitatea procentuală de inactivare a radicalului DPPH, $A_{control}$ este absorbanta soluției etanolice de DPPH și A_{proba} este absorbanta probei.

Exemplul 1

Într-un pahar Berzelius se prepară o soluție de chitosan prin dizolvarea a 3 g de chitosan în 100 ml soluție slab acidă și se lasă la temperatura camerei sub agitare magnetică timp de 72 h. În soluția de chitosan se adaugă 2 ml ulei de măceșe (0,75 ml ulei/1 g CHM) și 0,375 g Tween 80 (0,125g/1 g CHM) și se ultrasonază timp de 10 min, cu ajutorul unui aparat de ultrasonare UP50H. 50 ml din emulsia obținută se toarnă într-un vas Petri din sticlă (153 cm²) și se lasă la etuvă la 40°C timp de 24 h, obținându-se filme cu compoziția 55,8% chitosan cu masă moleculară medie, 37,2% ulei din sămburi de măceșe, 6,97% Tween 80. Pentru o uscare mai eficientă (evaporarea acidului acetic) filmele au fost uscate și la etuva cu vid, la 40°C, obținându-se filme uniforme galben/roșiatic, cu grosime de 0,237 mm, având rezistență la rupere de 60,09 MPa și o valoare a modulului lui Young de 3232,33 MPa. Alungirea la rupere are o valoare de 11,65%, gradul de inhibare după 24 h de acțiune a unor microorganisme a fost de 59% pentru *Bacillus cereus*, 86% pentru *Escherichia coli*, și de 61% pentru *Salmonella typhimurium*, permeabilitate mică la O₂ și CO₂ de 212 ml/m²/zi și, respectiv, 37 ml/m²/zi, iar activitatea antioxidantă este de 6,78%.

Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul 1, iar în soluția de chitosan se adaugă în plus 0,09 g argilă modificată organic, C30B, filmul rezultat având compoziția 54,9% chitosan cu masă moleculară medie, 36,6% ulei din sămburi de măceșe, 6,86% Tween 80 și 1,64% argilă C30B. Se obține un film gălbui/roșiatic cu o grosime de 0,193 mm, având rezistență la rupere

RO 131873 B1

1 de 70,72 MPa și o valoare a modulului lui Young de 4110,95 MPa. Alungirea la rupere are
o valoare de 11,4%, gradul de inhibare după 24 h de acțiune a unor microorganisme a fost
3 de 82% pentru *Bacillus cereus*, 90% pentru *Escherichia coli*, și de 68% pentru *Salmonella*
typhimurium, permeabilitate mică la O₂ și CO₂ de 134 ml/m²/zi și, respectiv, 18 ml/m²/zi, iar
5 activitatea antioxidantă este de 6,22%.

7 Materialele sintetizate au fost investigate cu ajutorul spectroscopiei FTIR-ATR cu
scopul de a se demonstra încorporarea în emulsia de chitosan a uleiului de măceșe. Astfel,
9 din spectrele FTIR-ATR - fig. 2, se observă că unele benzi caracteristice uleiului de măceșe
s-au evidențiat și în spectrele FT-IR ale probelor CHM/UM și CHM/UMC30B. Astfel, în inter-
11 valul 3100...2800 cm⁻¹ se evidențiază benzile de absorbție caracteristice vibrațiilor simetrice
și asimetrice ale grupărilor alifatiche ν(C-H) din CH₂ și CH₃ din resturi alchil ale trigliceridelor.
13 Banda de la 1741 cm⁻¹ este caracteristică uleiurilor cu un conținut mare de acizi grași satu-
rați, iar banda caracteristică uleiului de măceșe de la 1461 cm⁻¹ este asociată vibrațiilor de
deformare δ(CH) (fig. 2).

15 Au fost determinate proprietățile mecanice ale materialelor obținute. Proprietățile
mecanice sunt importante atunci când facem referire la materiale propuse pentru aplicații în
17 industria ambalajelor, deoarece rezistența la rupere și flexibilitatea asigură integritatea amba-
lajului. Proprietățile mecanice ale filmelor pe bază de chitosan sunt afectate de către tipul de
19 chitosan, prezența plastifiantilor și de temperatura de uscare a filmului.

21 Pentru filmul de chitosan pur, considerat referință în cadrul invenției, s-a obținut o
rezistență la rupere de 122,02 MPa, o valoare a modulului lui Young de 9302,12 MPa și o
23 alungire la rupere de 3,8%. Astfel, din rezultatele obținute - fig. 3, se observă că alungirea
la rupere a materialului crește semnificativ de la 3,8% în cazul filmului de chitosan la 11,65%
25 prin adăugarea uleiului din sămburi de măceșe și la 11,4% prin adăugarea argilei C30B. Nu
se observă diferențe majore între materialul care conține argila C30B (exemplul 2) și cel care
are doar ulei în compoziție (exemplul 1). S-au înregistrat valori mari ale modulului lui Young
27 pentru filmul de chitosan de aproximativ 9000 MPa, acesta fiind un material rigid. Pentru
filmele în care s-a încorporat ulei și argilă, valorile modulului lui Young au scăzut la
29 3232,33 MPa și, respectiv, 4110,95 MPa. De asemenea, rezistența la rupere a materialelor
încorporate este mai mică comparativ cu cea a filmului de chitosan, deoarece uleiul vegetal
31 acționează ca un plastifiant. Totuși, rezistența la rupere a filmului încorporat cu ulei este de
60,09 MPa și, respectiv, 70,72 MPa pentru materialul care conține și argilă, aceste valori fiind
33 acceptabile în cazul materialelor propuse pentru obținerea de ambalaje alimentare bioactive
(fig. 3).

35 Permeabilitatea la gaze a unui material polimeric poate fi definită ca fiind proprietatea
materialului de a permite trecerea unui gaz sau a vaporilor de apă prin el. Proprietățile de
37 barieră ale unui film au o importanță fundamentală pentru aplicații în obținerea ambalajelor
de uz alimentar, deoarece prin contactul alimentelor cu oxigenul are loc degradarea alimen-
39 telor prin: fenomene corozive, oxidări și modificări ale proprietăților organoleptice. Oxigenul
afectează în mod negativ proprietățile alimentelor în timpul perioadei de depozitare pre-
41 lungită, deoarece acesta poate provoca oxidarea proteinelor și, de asemenea, poate afecta
negativ aroma și culoarea alimentelor. Astfel, o valoare mai mică a permeabilității la oxigen
43 a materialelor de ambalare înseamnă o protecție mai mare a calității produselor. De
asemenea, dioxidul de carbon poate iniția reacții de deteriorare și trebuie eliminat pentru a
45 asigura prospețimea produselor alimentare.

În literatură, au fost raportate valori scăzute ale permeabilității la O₂ pentru filme de
47 chitosan [Butler B. L., Vergano P. J., Testin R.F., Bunn J.M., Wiles J.L., "**Mechanical and**
barrier properties of edible chitosan film as affected by composition and storage",
49 **Journal of Food Science**, 61 (5):953/961, 1996]. În cazul materialelor supuse invenției,

RO 131873 B1

pentru permeabilitatea la oxigen s-au obținut valori de 134 ml/m²/zi (exemplul 2) și 212 ml/m²/zi (exemplul 1). Variația permeabilității la oxigen în funcție de compoziție, prezentată în tabelul 1, a evidențiat o scădere a acestei proprietăți, după adăugarea nanoargilei C30B în sistem. Cele mai frecvente materiale comerciale folosite în industria ambalajelor sunt: polietilena (PE), polipropilena (PP), poli(acid lactic) (PLA), polietilentereftalat (PET). Pentru comparație, au fost testate două tipuri de ambalaje comerciale pe bază de LDPE/PP - tabelul 1. Se observă că pentru materialele obținute în cadrul invenției se obțin valori ale permeabilității mult mai mici comparativ cu ambalajele din comerț pe bază de LDPE/PP.

Tabelul 1

Rezultate teste permeabilitate la dioxid de carbon și oxigen

Nr.	Probă	Grosime probă (mm)	CO ₂ ml/m ² /zi	O ₂ ml/m ² /zi
1	Foliei ambalare LDPE/PP	0,009	128347	35 629
2	Pungi de congelator	0,020	64601	50 266
3	CHM	0,148	45	67
4	CHM/UM	0,237	37	212
5	CHM/UM_C30B	0,193	18	134

S-a investigat activitatea de inhibare a materialelor sintetizate asupra a două bacterii Gram-negative și anume *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*, și o bacterie Gram-positivă, *Bacillus cereus*. Rezultatele testelor antimicrobiene sunt redate în tabelul 2.

Tabelul 2

Activitatea antimicrobiană a CHM și a materialelor (exemplele 1...2) obținute prin tehnica emulsiei

Probe	% Inhibare ATCC <i>Bacillus cereus</i> 14579	% Inhibare <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	% Inhibare <i>Salmonella typhimurium</i> 14028
	24 h	24 h	24 h
Folie comercială PE	0	0	0
CHM	82	73	65
CHM/UM	59	86	61
CHM/UM_C30B	82	90	68

Din tabelul 2, se observă că folia comercială de polietilenă nu manifestă efect de inhibare împotriva coloniilor *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*; în schimb, în cazul probelor care conțin CHM, creșterea celor trei bacterii a fost inhibată. La 24 h, s-a înregistrat un procent de inhibare cuprins între 59 și 90% pentru toate cele trei bacterii. Precum se observă din tabelul 2, activitatea antimicrobiană a materialelor a fost ușor influențată de conținutul de ulei de măceșe și argilă C30B. Astfel, cea mai eficientă activitate antimicrobiană s-a obținut față de *Escherichia coli*, obținându-se un procent de inhibare la 24 h de 86% și 90% pentru filmele care conțin ulei de măceșe și, respectiv, argilă C30B.

RO 131873 B1

1 Proprietățile antioxidante, în special activitatea de inactivare a radicalilor, sunt
importante, deoarece radicalii liberi au un efect negativ asupra produselor alimentare.
3 Activitatea de inactivare a radicalilor pentru materiale pe bază de chitosan a fost măsurată
folosind metoda DPPH (2,2-difenil-1-pierilhidrazil). DPPH este un foarte cunoscut radical
5 care prezintă un maximum de absorbție în UV la 517 nm și care devine incolor sau slab
gălbui atunci când este neutralizat.

7 Din rezultatele înregistrate pentru evaluarea activității antioxidante și prezentate în
fig. 4 se constată că, prin încorporarea uleiului de măceșe și, respectiv, a argilei C30B,
9 activitatea de inactivare a radicalului este îmbunătățită înregistrându-se valori de la 1,6%
pentru referință CHM la 6,78% (exemplul 1) și 6,22% (exemplul 2). Activitatea antioxidantă
11 a emulsiilor pe bază de chitosan (exemplele 1 și 2) poate fi atribuită efectului sinergetic dintre
chitosan și ulei.

RO 131873 B1

Revendicări

1. Material polimeric biocompatibil, cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante pentru aplicații în industria ambalajelor pentru alimente, **caracterizat prin aceea că** este constituit din 54,9...55,8% chitosan cu masă moleculară medie, 36,6...37,2% ulei din sămburi de măceșe obținut prin presare la rece în raport de 0,75 ml/1 g chitosan, 6,86...6,97% monooleat de polioxietilenă sorbitan în raport de 0,125 g/1 g chitosan și 1,64% argilă tip montmorilonit modificată cu sare cuaternară de amoniu, de preferință clorură de alchil bis (2-hidroxietyl) metilamoniu. 1 3 5 7 9
2. Procedeu de obținere a materialului definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** se dizolvă chitosanul în soluție de acid acetic de concentrație 5%, sub agitare magnetică obținându-se o concentrație de 3%, apoi în soluția de chitosan se adaugă uleiul din sămburi de măceșe în proporție de 0,75 ml/1 g chitosan, 0,375 g monooleat de polioxietilenă sorbitan, în raport de 0,125 g/1 g chitosan, și 0,09 g argilă C30B, emulsiile astfel obținute se omogenizează prin agitare magnetică/ultrasonare, apoi se obțin filme prin turnarea a 50 ml emulsie în vase Petri și uscarea la o temperatură de 25°C timp de 24 h și apoi la o temperatură de 40°C, fiind condiționate în exicator timp de 2 zile la o temperatură de 22°C cu o soluție saturată de NaBr, obținându-se filme uniforme de culoare gălbui-roșiatică, cu grosime de 0,148...0,237 mm, o alungire de 3,8...11,65%, un modul de elasticitate de 3232,3...9302,1 MPa, rezistență la rupere de 60,1...122,0 MPa, cu un grad de inhibare a unor microorganisme de 59...82% pentru *Bacillus cereus*, 86...90% pentru *Escherichia coli*, și de 61...68% pentru *Salmonella typhimurium*, permeabilitate mică la O₂ de 67...212 ml/m²/zi și, respectiv, CO₂ de 18...45 ml/m²/zi și cu activitate antioxidantă mărită de la 1,6% la 6,78%. 11 13 15 17 19 21 23

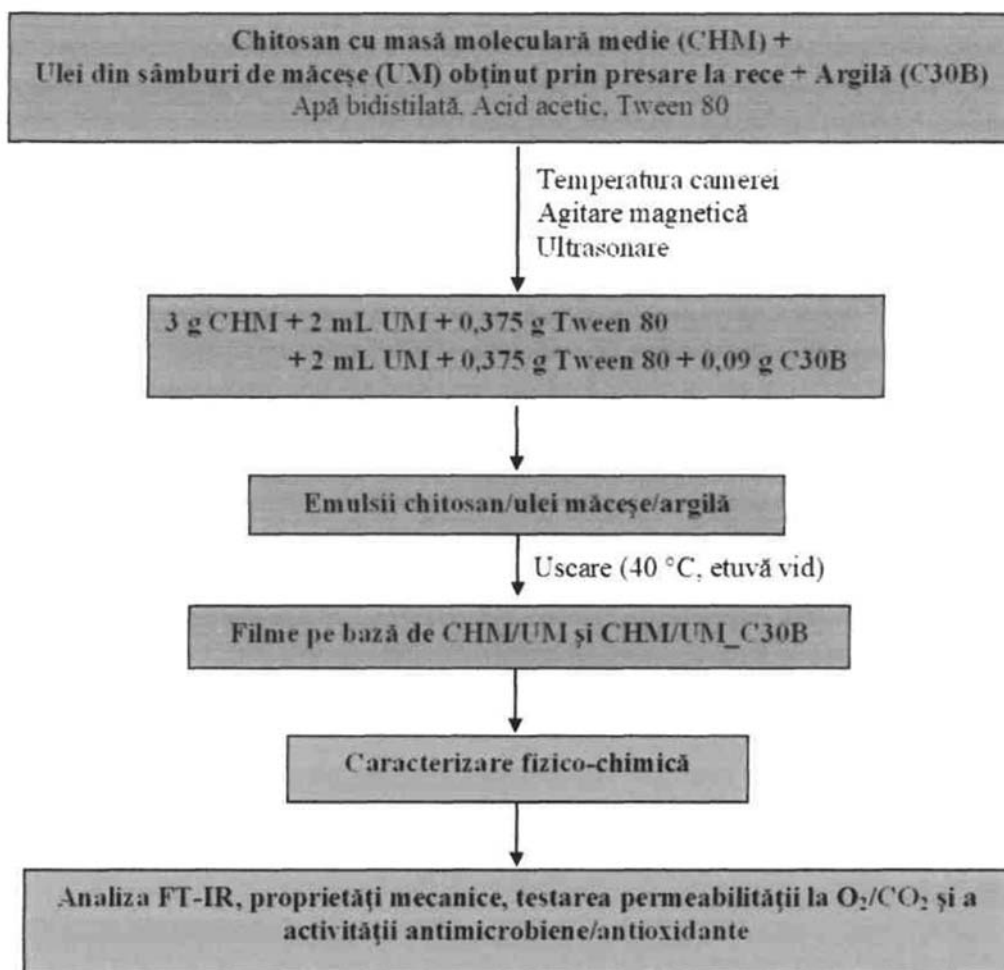


Fig. 1

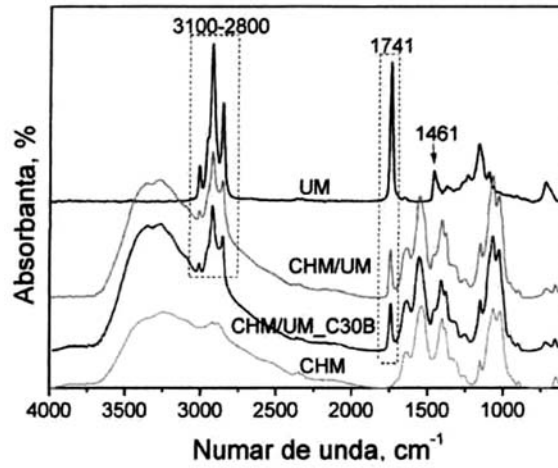


Fig. 2

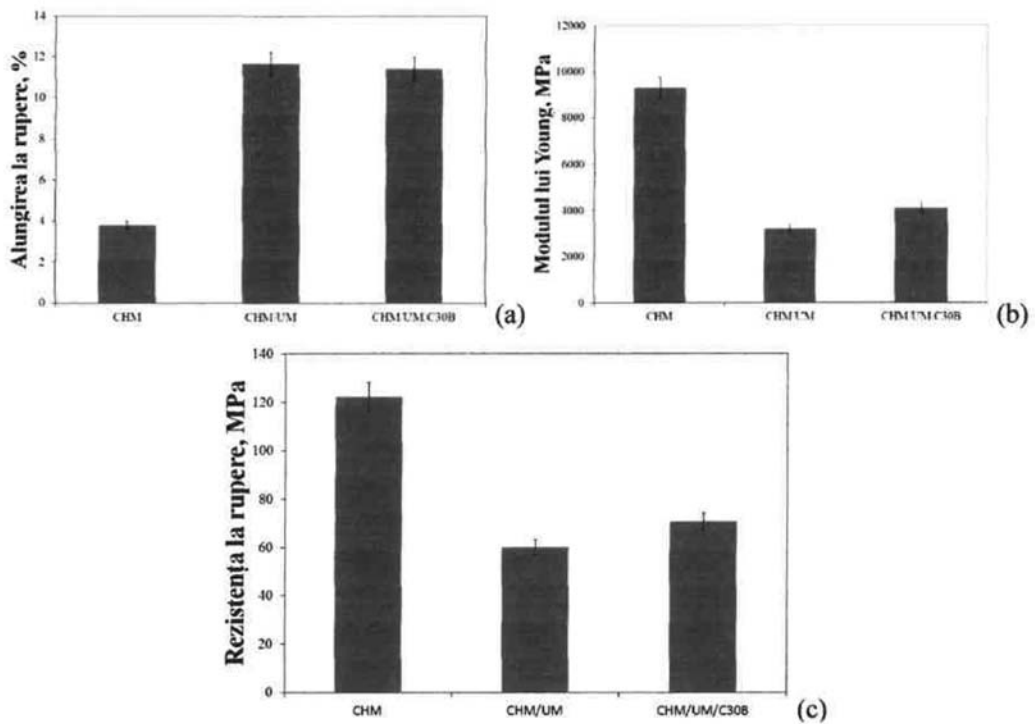


Fig. 3

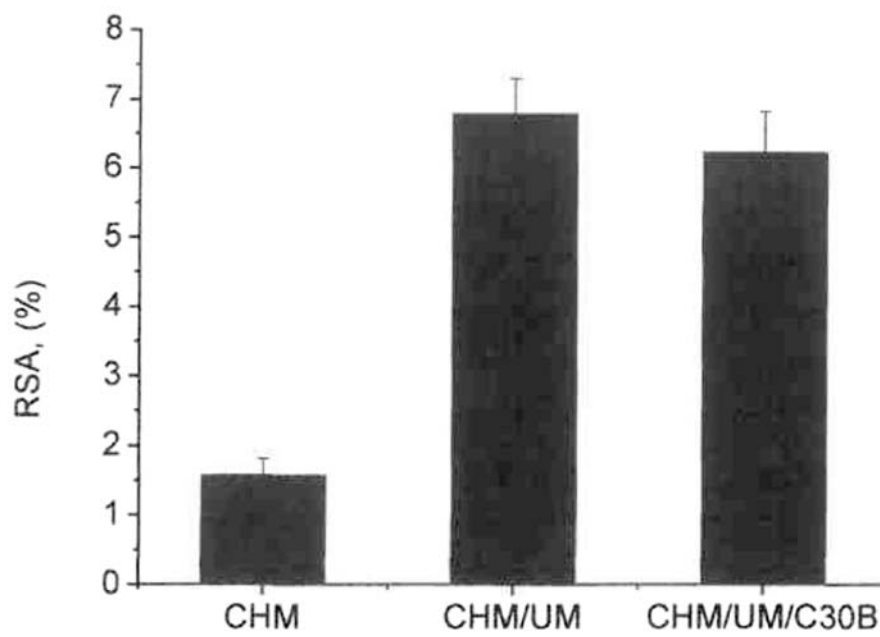


Fig. 4

