



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00576**

(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:  
• **MUNTEANU SILVESTRU BOGDANEL,  
STR. GRĂDINARI NR. 15, BL. B1-2, SC. A,  
ET. 3, AP 1, IAȘI, IS, RO;**  
• **GHIODEL EMIL IOANID, STR. SĂRĂRIE  
NR. 13, IAȘI, IS, RO;**  
• **PRICOPE GINA-MIHAELA,  
STR. PARCULUI NR. 24, BL. B6, SC. A,  
AP. 17 MANSARDA (5), IAȘI, IS, RO;**  
• **MITELUȚ AMALIA CARMEN,  
SOS. PANTELIMON NR. 258, BL. 47, SC. D,  
ET. 6, AP. 239, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO;**

• **TĂNASE ELISABETA-ELENA,  
STR. CONSTANTIN BRÂNCOVEANU NR. 4,  
BL. D2, AP. 6, PĂTĂRLAGELE, BZ, RO;**  
• **VASILE CORNELIA, STR.PANTELIMON  
NR.29, BL.308, SC.A, ET.3, AP.12, IAȘI, IS,  
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**PAOLA REYES-CHAPARRO Ș.A.,  
"EFFECT OF THE ADDITION OF  
ESSENTIAL OILS AND FUNCTIONAL  
EXTRACT OF CLOVE ON  
PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF  
CHITOSAN-BASED FILMS",  
INTERNATIONAL JOURNAL OF POLYMER  
SCIENCE VOLUME, 2015;**  
**TORRES-GINER Ș.A., "DEVELOPMENT OF  
ACTIVE ANTIMICROBIAL FIBER BASED  
CHITOSAN POLYSACCHARIDE  
NANOSTRUCTURES USING  
ELECTROSPINNING", ENG. LIFE SCI.  
NO. 3, VOL. 8, PP. 303-314, 2008**

(54) **COMPOZIT BIOACTIV STRATIFICAT, ANTIBACTERIAN,  
ANTIFUNGIC, ANTIOXIDANT ȘI PROCEDEU DE OBTINERE  
A ACESTUIA**



1 Prezenta invenție se referă la un compozit bioactiv stratificat cu proprietăți antimicro-  
biene și antioxidante pentru ambalarea alimentelor, pe bază de poliesteri biodegradabili, cum  
3 ar fi acidul polilactic (PLA), un polimer natural - chitosan și uleiuri vegetale, ca uleiul de argan  
și cel de cuișoare, și la un procedeu de obținere a acestui compozit.

5 Utilizarea uleiurilor vegetale în vederea obținerii de materiale bioactive pentru amba-  
larea alimentelor este intens studiată în ultimul deceniu datorită cerințelor consumatorilor și  
7 protecția alimentelor fără utilizarea aditivilor sintetici. În acest scop, s-au propus atât un  
număr mare de uleiuri, cât și de tehnici de obținere. Spre exemplu, folia de polietilenă de  
9 densitate joasă, utilizată frecvent în uzul casnic, a fost acoperită cu o soluție 10% în etanol  
de extract de rozmarin de uz alimentar comercial, solubil în lipide, care conține 4,5% acid  
11 carnosic. Soluția a fost distribuită uniform cu ajutorul unei pensule pe suprafața filmului și  
apoi solventul a fost evaporat. Acoperirea formată s-a dovedit eficientă în limitarea oxidării  
13 lipidelor din carne [Bolumar T., Andersen M.L., & Orlien V., “*Antioxidant active  
packaging for chicken meat processed by high pressure treatment*”, Food Chemistry,  
15 129(4), 1406-1412, (2011); T. Bolumar, D. LaPeña, L.H. Skibsted, V. Orlien, “*Rosemary  
and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced  
17 lipid oxidation in pork patties Food Packaging and Shelf Life 7*”, 26-33, (2016)], dar  
persistența acesteia timp îndelungat este limitată.

19 Este cunoscută atât activitatea antibacteriană a chitosanului, cât și cea antifungică,  
în cazul chitosanului conținând 10...25% oligomeri de chitosan [US 5965545, *Compositions  
21 and method for controlling fungal disease in plants*]. Datorită activității antibacteriene,  
chitosanul a fost utilizat pentru a obține acoperiri antibacteriene [Arlete B. Reis, Cristiana  
23 M.P. Yoshida, Ana Paula C. Reis, Telma T Franco, “*Application of chitosan emulsion  
as a coating on Kraft paper*”, Polym Int; 60, 963-969 (2011); Gallstedt M., Brottman A.  
25 and Hedenqvist M.S., “*Packaging-related properties of protein- and chitosan-coated  
paper*”, Packag Technol Sci 18:161-170 (2005), US 5919574; Biodegradable laminated  
27 films fabricated from pectin and chitosan; Peter D. Hoagland].

29 De asemenea, combinația chitosan/uleiuri esențiale s-a dovedit a avea efect anti-  
bacterian [WO 2015054377: Schiffman J. D.; Rieger K. A.; Wakimura M. L.; “*Essential  
31 oils or volatile organics thereof electrospun in chitosan nanofiber mats*”, 2015, Katrina  
A. Rieger, Jessica D. Schiffman, “*Electrospinning an essential oil: cinnamaldehyde  
enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers*”,  
33 Carbohydr Polym. Nov 26;113:561-568 (2014)], [Javid A., Raza Z.A, Hussain T., Rehman  
A., “*Chitosan microencapsulation of various essential oils to enhance the functional  
35 properties of cotton fabric*”, J. Microencapsul. 31(5):461-468 (2014), CN104975513 (A)  
2015-10-14, “*Efficient antibacterial chitosan essential oil microcapsule preparation  
37 method*”]. În acest sens, s-au obținut și analizat combinații de chitosan CU cinamaldehydă  
(0,5...5%) [WO2015054377: Schiffman J. D.; Rieger K. A.; Wakimura M. L.; “*Essential  
39 oils or volatile organics thereof electrospun in chitosan nanofiber mats*”, 2015], ulei  
de oregano și cuișoare (1%) [Emrah Torlak, Mustafa Nizamlioglu, “*Antimicrobial  
41 effectiveness of chitosan-essential oil coated plastic films against foodborne  
pathogens*”, Journal of Plastic Film and Sheeting, vol. 27 no. 3 235-248 (2011)], ulei de  
43 cimbru [Danijela Pecarski, Zorica Knezevic-Jugovic, Suzana Dimitrijevic-Brankovic,  
Katarina Mihajilovski, Slobodan Jankovic, “*Preparation, characterization and  
45 antimicrobial activity of chitosan microparticles with thyme essential oil*”, Polymers;  
SCIENTIFIC PAPER UDC 582.292.4:547.913:615.28:544.23 Hem. Ind. 68 (6) 721-729  
47 (2014) doi: 10.2298/HEMIND140415048P 721], ulei de cuișoare [Paola Reyes-Champarro,

Nestor Gutierrez-Mendez, Erika Sala-Munoz, Juan Guillermo Ayala-Soto, David Chavez-Flores and Leon Hernandez-Ochoa, “*Effect of the addition of essential oils and functional extracts of clove on physicochemical properties of chitosan-based films*”, Intern. J. Polym. Sci., ArticolID 714254, 6 pag], scortişoară [Lina Wang, Fei Liu, Yanfeng Jiang, Zhi Chai, Pinglan Li, Yongqiang Cheng, Hao Jing, and Xiaojing Leng, “*Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films*”, J. Agric. Food Chem., 59 (23), pp. 12411-12419 (2011)]. De asemenea, combinația chitosan/uleiuri esențiale s-a dovedit a avea efect antifungic pentru chitosan combinat cu polifenol extras din măr [CN 105145787 A, “*Natural composite antioxidant and antioxidant method thereof for inhibiting marine fish lipid oxidation*”].

Multe studii și brevete raportează atât activitate antibacterială, cât și antioxidantă pentru combinația chitosan/uleiuri esențiale: cu *Garcinia mangostana* [Nathan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, Monrudee Sukma, Praneet Opanasopit, “*Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with Garcinia mangostana extracts*”, Int J Pharm. 16;452(1-2):333-43 (2013)], extract de caprifoi, de goji, de semințe de struguri ori polifenoli extrași din ceai (20...25%) [CN 103275358 A, “*Method for preparing chitosan-based composite preservative film or coating*”], ulei de *Eucalyptus globulus* 1...4% [Jawhar Hafsa, Med ali Smach, Med Raâfet Ben Khedher, Basscm Charfeddine, Khalifa Limem, Hatem Majdoub, Sonia Rouatbi, “*Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil*”, LWT - Food Science and Technology, 68, 356-364 (2016)], chimen și oregano [N.M. Hromis, V.L. Lazic, S.L. Markov, Z.G. Vastag, Senka Popovic, D.Z. Suput, N.R. Dzinic, “*Improvement of antioxidant and antimicrobial activity of chitosan film with caraway and oregano essential oils*”, Acta periodica technologica 45(45):33-43 (2014)], *Aristotelia chilensis* [E. Genskowsky, L.A. Puente, J.A. Pérez-Álvarez, J. Fernandez-Lopez, L.A. Muñoz, M. Viuda-Martos, “*Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (Aristotelia chilensis)*”, LWT - Food Science and Technology 64, 1057-1062 (2015)].

În multe cazuri chitosanul și elementele bioactive se amestecă inițial în aceeași soluție din care se obține filmul final (prin evaporarea solventului) [CN 103275358 A, “*Method for preparing chitosan-based composite preservative film or coating*”; Jawhar Hafsa, Med ali Smach, Med Raâfet Ben Khedher, Bassem Charfeddine, Khalifa Limem, Hatem Majdoub, Sonia Rouatbi, “*Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil*”, LWT - Food Science and Technology, 68, 356-364 (2016); N.M. Hromis, V.L. Lazic, S.L. Markov, Z.G. Vastag, Senka Popovic, D.Z. Suput, N.R. Dzinic, “*Improvement of antioxidant and antimicrobial activity of chitosan film with caraway and oregano essential oils*”, Acta periodica technologica, 45(45):33-43 (2014); E. Genskowsky, L.A. Puente, J.A. Pérez-Álvarez, J. Fernandez-Lopez, L.A. Muñoz, M. Viuda-Martos, “*Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (Aristotelia chilensis)*”, LWT -Food Science and Technology 64, 1057-1062 (2015); CN 103159970 (A) 2013-06-19, “*Preparation method of edible film with antibacterial and antioxidant functions*”; Lina Wang, Fei Liu, Yanfeng Jiang, Zhi Chai, Pinglan Li, Yongqiang Cheng, Hao Jing, and Xiaojing Leng, “*Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films*”, J. Agric. Food Chem., 59 (23), pp. 12411-12419 (2011)] sau din care se obțin nanofire prin metoda electrofilării

1 [WO2015054377: Schiffman J. D.; Rieger K. A.; Wakimura M. L. "*Essential oils or*  
2 *volatile organics thereof electrospun in chitosan nanofiber mats*", 2015; Katrina A.  
3 Rieger, Jessica D. Schiffman, "*Electrospinning an essential oil: cinnamaldehyde*  
4 *enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers*",  
5 *Carbohydr Polym.* Nov 26; 113:561-568 (2014); Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak  
6 Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, Monrudee Sukma, Praneet Opanasopit,  
7 "*Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with Garcinia mangostana*  
8 *extracts*", *Int. J. Pharm.* 16;452(1-2): 333-43 (2013)].

9 S-au raportat, de asemenea, încapsulări de uleiuri esențiale în particule de chitosan  
10 [CN104975513 (A) 2015-10-14, "*Efficient antibacterial chitosan essential oil*  
11 *microcapsule preparation method*"] de ordinul micronilor (microparticule)[Gallstedt M,  
12 Brottman A and Hedenqvist MS, "*Packaging-related properties of protein- and*  
13 *chitosan-coated paper*", *Packag Technol Sci* 18:161-170 (2005); Jefferson M. Souza,  
14 Artemisia L. Caldas, Shafagh D. Tohidi, Javier Molina, Antonio P. Souto, Râul  
15 Fangueiro, Andrea Zille, "*Properties and controlled release of chitosan micro-*  
16 *encapsulated limonene oil*", *Rev. bras. farmacogn.* 24, n. 6, pp. 691-698 (2014)] sau  
17 chiar mai mari (10 µm) [Jefferson M. Souza, Artemisia L. Caldas, Shafagh D. Tohidi,  
18 Javier Molina, Antonio P. Souto, Râul Fangueiro, Andrea Zille, "*Properties and*  
19 *controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil*", *Rev. bras. farmacogn.*  
20 *24, n. 6, pp. 691-698 (2014)*], 100...1000 µm [US 9333178, "*Essential oil microparticles*  
21 *and uses thereof for preventing enteric diseases*"], și dezvoltarea de fibre antimicrobiene  
22 cu dimensiuni micrometrice (850 nm), prin electrofilarea chitosanului împreună cu polimeri  
23 ca poli(acidul lactic) [S. Torres-Giner, M.J. Ocio, J.M. Lagaron, "*Development of active*  
24 *antimicrobial fiber based chitosan polysaccharide nanostructures using*  
25 *electrospinning*", *Eng. Life Sci.*, 8(3), 303-314, (2008)].

26 Există și studii în care materialul bioactiv pe bază de chitosan și uleiuri esențiale este  
27 depus pe diverse substraturi, ca cel de polipropilenă [Emrah Torlak, Mustafa Nizamoglu,  
28 "*Antimicrobial effectiveness of chitosan-essential oil coated plastic films against*  
29 *foodborne pathogens*", *Journal of Plastic Film and Sheeting*, vol. 27 no. 3 235-248  
30 (2011); CN 105169961 A, "*Production method of composite film with optimized*  
31 *parameters*"], sau pe material textil din bumbac [Javid A., Raza Z.A., Hussain T., Rehman  
32 A., "*Chitosan microencapsulation of various essential oils to enhance the functional*  
33 *properties of cotton fabric*", *J. Microencapsul.* 31(5):461-468 (2014)].

34 Au fost propuse diverse proceduri pentru acoperirea cu agent antimicrobian (cu/fără  
35 polimer cu rol de încapsulare/încorporare): prin aplicare cu un aplicator pentru cromatografie  
36 în strat subțire [Afef Ben Arfa, Laurence Preziosi-Belloy, Pascale Chalier, Nathalie  
37 Gontard, "*Antimicrobial Paper Based on a Soy Protein Isolate or Modified Starch*  
38 *Coating Including Carvacrol and Cinnamaldehyde*", *J. Agric. Food Chem.* 55, 2155-  
39 2162 (2007)], banc de acoperire de laborator [Carolin Hauser, Joachim Wunderlich,  
40 "*Antimicrobial packaging films with a sorbic acid based coating*"; 11<sup>th</sup> International  
41 Congress on Engineering and Food (ICEF11); *Procedia Food Science* 1, 197-202  
42 (2011)], aplicator cu bară [Virginia Muriel-Galet, Josep P. Cerisuelo, Gracia Lopez-  
43 Carballo, Marta Lara, Rafael Gavara, Pilar Hernández-Munoz, "*Development of*  
44 *antimicrobial films for microbiological control of packaged salad*", *International*  
45 *Journal of Food Microbiology*, 157, 195-201 (2012)], pensulă [Tomas Bolumar, Mogens  
46 L. Andersen, Vibeke Orlien, "*Antioxidant active packaging for chicken meat processed*  
47 *by high pressure treatment*", *Food Chemistry*, 129, 1406-1412, (2011)], pulverizare

(nebulizare) [Claudia Contini, Maria G. Katsikogianni, Feidhlim T. O'Neill, Michael O'Sullivan, Denis. P. Dowling, Frank. J. Monahana, "Development of active packaging containing natural antioxidants", <i>Procedia Food Science</i> 1 (2011) 224-228; doi:10.1016/j.profoo.2011.09.035; 11 <sup>th</sup> International Congress on Engineering and Food (ICEF11)], laminare [US 5919574, "Biodegradable laminated films fabricated from pectin and chitosan"; Peter D. Hoagland], imprimare prin gravură [Virginia Muriel-Galet, Josep P. Cerisuelo, Gracia López-Carballo, Susana Aucejo, Rafael Gavara, Pilar Hernández-Muñoz, <i>Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad</i> , <i>Food Control</i> 30 137-143 (2013)], imersie [Bogdănel Silvestru Munteanu, Elena Pâslaru, Lidia Fras Zemljic, Anamaria Sdrobis, Gina Mihaela Pricope, Cornelia Vasile, "Chitosan coatings applied to polyethylene surface to obtain food-packaging materials", <i>Cellulose Chem. Technol.</i> , 48 (5-6), 565-575 (2014)]. Aceste procedee, deși sunt simple, nu asigură stabilitatea în timp a stratului aplicat, iar substanțele conținute pot migra în alimentul ambalat.	1 3 5 7 9 11 13
Uleiul de argan obținut prin presare la rece este benefic în tratamentul artritelor sau a altor boli reumatice, are beneficii pentru organism în lupta cu cancerul și alte boli grave, boli vasculare și obezitate. Uleiul esențial de cuișoare conține cei mai mulți agenți antioxidanți. Acesta este apreciat ca antifungic, agent antibacterian, antiseptic și analgezic, este o excelentă sursă de mangan, de acizi grași omega-3, vitamina K, vitamina C, calciu, magneziu și fibre. Uleiul esențial de cuișoare conține o cantitate importantă de eugenol, care a făcut subiectul a numeroase studii de prevenire a toxicității produse de poluanții din mediu (precum tetraclorura de carbon) și studii privind prevenirea cancerului tractului digestiv sau a inflamațiilor articulațiilor. Uleiul esențial de cuișoare poate reduce concentrația de glucide din sânge la diabetici și este cunoscut ca fiind un potențial remediu împotriva cancerului pulmonar.	15 17 19 21 23 25
Acidul polilactic (PLA) este un poliester biodegradabil ce poate fi sintetizat din resurse regenerabile. Este pe larg studiat pentru posibile aplicații în producerea de ambalaje datorită modulului de elasticitate mare și permeabilității scăzute pentru arome.	27
După cum s-a arătat mai sus, au fost propuse diverse proceduri pentru acoperirea diverselor materiale cu agent antimicrobian (cu/fără polimer cu rol de încapsulare/încorporare). Aceste procedee, deși sunt simple, nu pot evita consumul mare de materiale bioactive față de cantitatea mult mai mică necesară pentru obținerea efectelor antibacteriene/antifungice/antioxidante prin procedeul propus în prezenta invenție și, de asemenea, nu asigură stabilitatea în timp a stratului aplicat, iar substanțele conținute pot migra în alimentul ambalat.	29 31 33 35
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția, constă în obținerea filmului de acid polilactic cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante.	37
Compozitul bioactiv stratificat, antibacterian, antifungic, antioxidant, pe bază de acid polilactic și chitosan conform invenției, este constituit din 90...99,9% acid polilactic, 0,05...5% chitosan și 0,05...5% ulei vegetal ales dintre uleiul de argan și uleiul de cuișoare.	39
Procedeul de obținere de filme pe bază de compozit bioactiv conform invenției, constă într-o primă etapă în care se activează filmul de acid polilactic prin tratare în plasmă de azot la o frecvență de 1,3 MHz, o putere de 100 W și o presiune de lucru de 0,4 mbar urmată de expunere la aer, iar în a doua etapă filmul activat se acoperă propriu-zis prin electrofilare/electropulverizare coaxială la o intensitate a câmpului electric de 10 kV/cm cu un debit de 1,2 μl/min, timp de 30 min cu o soluție de chitosan de concentrație 1,5% în greutate în acid acetic glacial și cu o soluție din elementul activ ne-electrofilabil de ulei vegetal 1,5% în cloroform sau acid acetic, ales dintre uleiul de argan și uleiul de cuișoare din care se obține un compozit stratificat stabil, cu activitate antimicrobiană, antifungică și antioxidantă.	41 43 45 47 49

# RO 131883 B1

1           Invenția prezintă următoarele avantaje:

3           - rezolvă problema lipsei caracterului antimicrobian și antioxidant al PLA prin adăuga-  
rea unui polimer natural, chitosanul, și a unor uleiuri vegetale, ca cel de argan obținut prin  
5           presare la rece sau cel esențial de cuișoare, care imprimă atât proprietăți antioxidante, cât  
și antimicrobiene, și, de asemenea, determină efecte biologice specifice materialelor  
obținute;

7           - înlătură dezavantajele menționate mai sus (consumul mare de materiale bioactive,  
instabilitatea în timp a stratului aplicat și migrarea substanțelor bioactive în alimentul amba-  
9           lat) prin aceea că chitosanul în amestec cu uleiurile vegetale este depus sub formă de nano-  
acoperiri legate covalent pe suprafața poli(acidului lactic) (PLA) la temperatura camerei, își  
11          menține activitatea antimicrobiană și este împiedicat să difuzeze rapid în alimentele amba-  
late, menținându-se la suprafața ambalajului și prin încorporarea simultană în compoziție a  
13          uleiurilor vegetale de argan sau de cuișoare cu proprietățile specifice menționate.

15          Scopul invenției de față este obținerea de noi materiale pentru ambalarea alimentelor  
pe bază de PLA tratat în plasmă rece de înaltă frecvență, chitosan și uleiuri vegetale, în  
17          ideea de a combina caracteristicile unice ale acestora cu scopul de a obține materiale cu  
proprietăți antimicrobiene, antioxidante și biologic active, având în vedere calitățile parti-  
19          culare ale chitosanului și ale uleiurilor vegetale.

21          În practica uzuală, chitosanul și elementele bioactive sunt amestecate în masa  
filmului final care se dorește a avea proprietăți antibacteriene prin amestecarea chitosanului  
și a elementelor bioactive în aceeași soluție din care se obține filmul final fie sub formă com-  
23          pactă prin evaporarea solventului [**Paola Reyes-Champarro, Nestor Gutierrez-Mendez,**  
**Erika Sala-Munoz, Juan Guillermo Ayala-Soto, David Chavez-Flores and Leon**  
**Hernandez-Ochoa, “Effect of the addition of essential oils and functional extracts of**  
25          **clove on physicochemical properties of chitosan-based films”, Intern. J. Polym. Sci.,**  
**Articol ID 714254, p. 6],** fie sub formă de meșă nanofibroasă prin metoda electrofilării [**S.**  
27          **Torres-Giner, M.J. Ocio, J.M. Lagaron, “Development of active antimicrobial fiber**  
**based chitosan polysaccharide nanostructures using electrospinning”, Eng. Life Sci.,**  
29          **8(3), 303-314, (2008)].** O altă modalitate de a efectua imobilizarea compusului bioactiv este  
acoperirea prin electrofilare/electropulverizare a unui film polimeric. Electrofilarea este un  
31          proces prin care un jet polimeric încărcat electrostatic se deplasează spre un electrod  
colector metalic datorită forțelor electrostatice. În urma evaporării solventului, jetul de polimer  
33          se solidifică și se obține astfel pe colector o structură de micro/nanofire polimerice, cu raport  
suprafață/volum mare, cu diametre de ordinul 0,01...10 μm [**Wendorff J.H., Agarwal S.,**  
35          **Greiner A., Electrospinning: Materials, Proceing, and Applications. John Wiley & Sons,**  
**Germany (2012), Bogdanel Silvestru Munteanu, Elena Paslaru, Lidia Fras Zemljic,**  
37          **Anamaria Sdrobis, Gina Mihaela Pricope, Cornelia Vasile, “Chitosan coatings applied**  
**to polyethylene surface to obtain food-packaging materials”, Cellulose Chem.**  
39          **Technol., 48 (5-6), 565-575 (2014)].** În cazul în care pe colector nu se obțin fire, ci numai  
particule, procesul se mai numește electropulverizare.

41          Acoperirea prin electrofilare/electropulverizare este o metodă convenabilă datorită  
mai multor avantaje, dintre care se menționează:

43          - prin electrofilare se pot obține nanofibre foarte subțiri (de ordinul nanometrilor).  
Fibrele pot da naștere la o structură mai poroasă decât o aglomerare de particule, cu raport  
45          arie/volum mare;

47          - grosimea stratului acoperit poate fi ușor controlată prin varierea timpului de depu-  
nere și a debitului de curgere. Astfel, este posibil să se obțină acoperiri foarte subțiri utilizând  
cantități foarte mici de compus bioactiv, care pot fi suficiente pentru a imprima efectul  
49          antibacterian dorit. Dacă se compară grosimea stratului obținut prin alte metode (3 μm [J.

<b>P. Cerisuelo, Virginia Muriel-Galet, Jose M. Bermudez, Susana Aucejo, Ramon Català, Rafael Gavara, Pilar Hernández-Muñoz, “Mathematical model to describe the release of an antimicrobial agent from an active package constituted by carvacrol in a hydrophilic EVOH coating on a PP film”, Journal of Food Engineering 110 26-37 (2012)], 2...9 μm [Funda Tihminlioglu, Isa Dogan Atik, Banu Ozen, Effect of Corn-Zein Coating on the Mechanical Properties of Polypropylene Packaging Films, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 119, 235-241 (2011)], 2...3 μm [Funda Tihminlioglu, Isa Dogan Atik, Banu Ozen, Effect of Corn-Zein Coating on the Mechanical Properties of Polypropylene Packaging Films, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 119, 235-241 (2011)])</b> cu acoperirea foarte subțire (sute de nm) realizată prin electrofilare/electropulverizare, este evident, de asemenea, avantajul de a consuma o cantitate mică din materialul de acoperire.	1 3 5 7 9 11
Proprietățile uleiurilor vegetale (esențiale/obținute prin presare la rece) depind de modul de distribuire al acestora pe suprafețele acoperite și de modul în care acestea intră în contact cu alimentul. Prin urmare, încorporarea acestora în interiorul fibrelor sau particulelor de chitosan oferă ocazia de a produce materiale fibroase/poroase performante prin electrofilare. Datorită dimensiunilor nanometrice și a raportului mare suprafață/volum al nanoparticulelor, înglobarea acestora în interiorul (și implicit și la suprafața) nanofirelor polimere conduce la creșterea cantității de agent bioactiv (AA) care este accesibil pentru interacțiunea cu alimentul.	13 15 17 19
Încorporarea agentului bioactiv (de exemplu în chitosan) duce la îmbunătățirea caracteristicilor materialului (filmului) mixt obținut.	21
Prin metoda coaxială de electrofilare/electropulverizare se pot obține fire și particule de agent bioactiv (de exemplu chitosan) electrofilabil ce încapsulează un al doilea agent bioactiv (de exemplu ulei de cuișoare sau argan) care nu este electrofilabil. Prin acul exterior se injectează agentul bioactiv electrofilabil (chitosanul), iar prin acul interior se injectează al doilea agent bioactiv non-electrofilabil (uleiul de cuișoare sau argan).	23 25 27
Datorită metodei de acoperire prin electrofilare se pot obține acoperiri cu grosimi controlabile mult mai subțiri (zeci de nm) comparativ cu celelalte metode utilizând implicit cantități mai mici de compus bioactiv, care pot fi suficiente pentru a imprima efectul antibacterial/antioxidant/antifungic dorit în timp ce legarea covalentă de substrat asigură o stabilitate mai mare a acoperirii. Fibrele obținute pot da naștere la o structură mult mai poroasă decât un film/strat omogen de acoperire, structura care poate genera un contact mult mai bun între alimentul ambalat și substanțele bioactive. Prin electrofilarea coaxială se poate obține încapsularea elementelor active, încapsulare ce asigură migrarea lentă (controlată) a unei mai mari părți din materialul bioactiv încapsulat decât în cazul încapsulării într-un film/strat de acoperire compact și relativ gros față de nanofire unde este accesibilă migrării lente doar materialele bioactive situate spre partea exterioară a filmului.	29 31 33 35 37
Procedeul conform invenției de obținere prin electrofilare/electropulverizare a unor suprafețe bioactive constă în două etape:	39
I. Tratarea filmelor de poliester biodegradabil (PLA) în plasmă de azot în condiții optime de descărcare (frecvența 1,3 MHz, putere 100 W, presiune de lucru 0,4 mbar).	41
II. Acoperirea propriu-zisă a filmelor de poliester biodegradabil (PLA) prin electrofilare/electropulverizare coaxială care duce la încapsularea unui agent bioactiv non-electrofilabil în interiorul agentului bioactiv electrofilabil.	43 45
Procedeul și suprafețele biocompatibile obținute în acest mod prezintă următoarele avantaje:	47
- tratarea suprafeței poliesterului biodegradabil (PLA) în plasmă de azot urmată de expunerea în aer asigură funcționalizarea suprafeței prin formarea de radicali activi și conduce la implementarea pe suprafață a unor grupe polare reactive (peroxizi, carbonil, carboxil, amino, amida) de care se pot lega covalent chitosanul și unele componente din	49 51

# RO 131883 B1

1 uleiul vegetal folosit. În acest mod, stratul bioactiv se leagă prin legături covalente de sub-  
3 strat, devenind mai stabil, împiedicând pierderea agenților activi în timpul stocării și migrarea  
în alimentele ambalate, și asigură protecția alimentelor ambalate fără a migra;

5 - se pot depune straturi foarte subțiri cu grosime controlabilă. În acest mod, caracterul  
bioactiv se imprimă la costuri și cu consum minim de compuși bioactivi;

7 - se poate controla morfologia straturilor depuse prin modificarea condițiilor de elec-  
trodepunere (tensiunea aplicată, distanța dintre ac și colector, concentrația soluției utilizate  
și debitul de depunere) în scopul modificării caracteristicilor de suprafață ale substratului,  
9 fără a le modifica și pe cele de volum, caracteristicile depunerilor realizate fiind repro-  
ductibile;

11 - prezența nanofirelor/particulelor de chitosan imprimă suprafeței materialului poli-  
meric o structură nano-poroasă, precum și caracter antibacterian/antifungic;

13 - prezența AA încapsulați în firele/particulele de chitosan conduce la îmbunătățirea  
proprietăților antibacteriene/antioxidante/antifungice ale chitosanului, cele două componente  
15 acționând sinergetic, acoperirile în ansamblu prezentând caracteristici superioare și efecte  
biologice specifice.

17 S-au utilizat următoarele materiale:

19 - Poli(acidul lactic) (PLA) - 2002D, are o densitate de 1,24 g/cm<sup>3</sup>, indicele de curgere  
(MFI) de 5...7 g/(10 min) (la 210°C/2,16 kg) și un conținut de 96% L-lactidă și 4% izomer D.  
Masa moleculară medie gravimetrică determinată prin GPC a fost de 4475 kDa;

21 - Chitosan (CS) (Aldrich) cu masă moleculară medie = 400000 Da, grad de de  
acetilare (DD) = 68%;

23 - Uleiul de argan: ulei de argan extra virgin obținut prin presare la rece, extras din  
semințele arborelui de argan (*Argania spinosa*). Fără adaosuri;

25 - Uleiul de cuișoare: obținut din muguri floralii uscați de *Syzygium aromaticum*.

Procedeul de obținere a unor noi compozite stratificate sub formă de filme cu proprie-  
tăți antioxidante și antimicrobiene pe bază de poliesteri, chitosan și uleiuri vegetale pentru  
27 ambalarea alimentelor, conform invenției, constă în aceea că filmele de PLA cu o grosime  
de 0,3 ± 0,05 mm s-au obținut prin presarea granulelor cu o presă Carver la 175°C (2 min  
29 pre-topire și 2 min presare la 240 bar). Înainte de activare în plasma rece, au fost spălate cu  
31 etanol și apoi uscate. Filmele de PLA sau PHB obținute, care sunt transparente și au o gro-  
sime de aproximativ 25 μm au fost expuse la acțiunea plasmă reci de azot de frecvență  
33 înaltă (1,3 MHz) cu puterea sursei 100 W și o presiune de 0,4 mbar. Pe suprafața tratată în  
plasmă a filmelor se depune prin electrofilare chitosan în care s-au încapsulat diferite uleiuri  
35 vegetale.

Instalația de electrofilare constă dintr-o sursă de înaltă tensiune continuă (0...30 kV),  
37 platan rotitor metalic și o seringă orientată cu acul perpendicular pe acesta. Tensiunea înaltă  
este aplicată între platanul metalic și acul seringii. Soluțiile de chitosan/ulei din seringă sunt  
39 împinse afară cu debit constant. Pe colectorul metalic rotator se montează substratul de  
poliester biodegradabil expus în prealabil în plasmă.

41 Parametrii utilizați în procesul de electrofilare/electropulverizare (pentru toate probele)  
au fost:

43 - intensitatea câmpului electric 10 kV/cm;

45 - debit 1,2 μl/min; (atât pentru acul interior, cât și pentru acul exterior);

45 - timp de depunere 30 min.

Soluțiile de chitosan 1,5% cu masa moleculară mare (CSH) au fost preparate în  
47 amestec 9/1 acid acetic glacial/apă distilată. Soluțiile de ulei vegetale 1,5 wt% au fost prepa-  
rate în acid acetic glacial. Prin acul exterior s-a injectat chitosan, iar prin acul interior s-a



# RO 131883 B1

injectat uleiul vegetal. Prin metoda coaxială de electrofilare/electropulverizare s-au obținut straturi omogene de fire și particule de chitosan ce încapsulează (conțin) ulei vegetal, material obținut fiind o compozită stratificată.	1 3
Pentru materialele obținute s-au determinat următoarele proprietăți:	
- morfologia, diametrul și mărimea particulelor/firelor prin metode microscopice;	5
- proprietățile antibacteriene/antioxidante și antifungice.	
<i>Metode de investigație</i>	7
Microscopia electronică de baleiaj (SEM): s-a utilizat un microscop QUANTA200.	
Microscopie electronică prin transmisie (TEM): s-a utilizat un microscop Hitachi High-Tech HT7700 (tensiune de accelerare 100 kV).	9
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 <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , și <i>Listeria monocytogenes</i> constă în următoarele etape: sterilizarea mostrelor; contaminare cu bacterii de cultură ATCC; inoculare și incubare efectuată 24 și 48 h la 44°C; identificarea germeilor țintă. Sterilizarea probelor a fost făcută într-o autoclavă la 110°C, 0,5 bar timp de 20 min.	11 13 15 17
Identificarea germeilor țintă: următoarele metode standardizate ale procedurilor bacteriologice au fost utilizate în conformitate cu standardele în vigoare: SR ISO 16649- <i>coli Escherichia</i> ; metoda orizontală pentru b-glucuronidase - <i>Escherichia coli</i> pozitivă cuantificarea - partea 2: numărarea coloniilor la 44°C folosind 5-brom-4-clor-3-indolil beta-D-glucuronid conform "Minerale Modified Glutamat bulion" (Cat. 1,365) producerea coloniilor albastre sau verde-albastre pe agar glucuronid; SR ISO 11290 monocytogenes EN-monocytogenes; SR EN ISO 6579/2003/AC/2004/AC/2006, Amd.I: 2007 - <i>Salmonella sp.</i>	19 21 23
Prin testele antifungice s-a testat efectul probelor acoperite la suprafața de contact a acestora cu trei ciperici: <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, <i>Penicillium corylophilum</i> CBMF1 și <i>Fusarium graminearum</i> G87. Ciupercile au fost crescute în mediu PDA timp de 7...9 zile și depozitate la 25°C. Suspensia de pori a fost obținută în condiții aseptice și apoi colectate de pe suprafața coloniilor. Mediul de cultură a fost preparat conform protocolului, sterilizat și turnat în vase Petri. După solidificare, acesta a fost inoculat cu 2 μl de suspensie de spori în patru puncte din vasul Petri. Probele au fost apoi aplicate în contact cu spori. Vasele Petri au fost apoi izolate cu parafină și incubate 25°C timp de 7 zile. Rezultatele au fost exprimate ca număr de spori aflați pe suprafața în contact cu proba exprimată ca procent din numărul de spori care nu au fost în contact cu proba (rata de inhibiție).	25 27 29 31 33
Activitatea antioxidantă: activitatea antioxidantă a nanofirelor a fost măsurată utilizând metoda de evaluare a inhibare a radicalilor liberi cu ajutorul 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (metoda DPPH). În prezența probelor, s-a măsurat descreșterea absorbantei la 517 nm.	35 37
Se prezintă, în continuare, două exemple de realizare ale invenției, utilizând ca substrat poliester degradabil PLA, iar ca agenți bioactivi chitosanul cu masa moleculară mare (agentul electrofilabil) în combinație cu uleiul de cuișoare respectiv uleiul de argan (agentul ne-electrofilabil). Filmele de PLA s-au obținut prin presarea din topitură la presiune de timp de 5 min.	39 41
Exemplele descrise în continuare se bazează pe rezultatele prezentate în fig. 1...3 și în tabel:	43
- fig. 1 reprezintă imagini SEM (a) și TEM (b, c, d) ale probelor PLA/Chitosan cu masa moleculară mare/cuișoare.	45
- fig. 2 reprezintă activitatea antioxidantă a probelor PLA/Chitosan cu masa moleculară mare/cuișoare.	47
- fig. 3 reprezintă imagini SEM (a) și TEM (b, c, d) ale probelor PLA/Chitosan cu masa moleculară mare/argan.	49

## 1 Exemplul 1

### PLA/ulei de cuișoare

3 Pe colector se montează filmul de PLA obținut prin presarea din topitură la 175°C  
 (2 min pre-topire și 2 min presare la 240 bar) care este transparent și are o grosime de  
 5 25 μm și este tratat în plasma de azot.

7 Se prepară soluții de 1,5% CSH în amestec 9/1 acid acetic glacial/apă distilată și de  
 ulei de cuișoare 1,5 wt% în acid acetic glacial cu care se încarcă seringile de la pompa 1,  
 9 respectiv 2. Prin acul exterior s-a injectat soluția de chitosan în acid acetic, iar prin acul  
 interior s-a injectat soluția de ulei (cuișoare sau argan). Colectorul se rotește cu o viteză de  
 11 30 rpm. Se pornesc cele două pompe care trimit soluțiile prin acul exterior și respectiv interior  
 cu un debit constant de 1,2 μl/min timp de 30 min.

13 Prin metoda de electrofilare/electropulverizare s-au obținut pe filmele PLA plasate pe  
 colectorul metalic o acoperire cu un diametru de 12...15 cm, grosimea stratului depus este  
 15 de aproximativ 200 nm, ce constă din fire și particule de chitosan ce încapsulează (conțin)  
 ulei de cuișoare.

17 Filmul de PLA acoperit cu nanostructuri încapsulate de ulei de cuișoare în chitosan  
 se investighează prin SEM și TEM și se testează pentru activitatea antioxidantă, antibacte-  
 riană și antifungică.

19 Nanofibrele au un diametru mediu de 400 nm, iar particulele, de 250 nm, și formează  
 împreună o meșă relativ poroasă care acoperă uniform suprafața. Testele antioxidante indică  
 21 o activitate antiradicalică de 80% (după 70 h), cele antifungice de peste 95%, iar activitatea  
 antibacteriană de peste 80%. Aceste valori sunt superioare celor imprimate de chitosan  
 23 (tabel).

25 Imaginile SEM evidențiază o morfologie de tip fibre/particule. Aceasta se datorează  
 viscozității mari a chitosanului, ceea ce duce la o mai bună întrepătrundere a lanțurilor  
 27 moleculare în cazul acestor probe. Este cunoscut faptul că, pentru a obține nanofibre  
 utilizând procedeul de electrofilare/electropulverizare, este necesar un anumit grad de  
 întrepătrundere a lanțurilor macromoleculare în soluția electropulverizată [**Suresh L.**  
 29 **Shenoy; W. Douglas Bates, Harry L. Frisch, Gary E. Wnek, Role of chain**  
**entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good**  
 31 **solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit, Polymer 46 3372-3384 (2005)**].  
 Imaginile TEM evidențiază o morfologie mai fină decât imaginile SEM pentru toate probele.  
 33 Precum și nanofibre cu diametre mai mici decât cele vizibile în imaginile SEM. De  
 asemenea, se evidențiază existența particulelor foarte fine (de ordinul 100 nm). Imaginile  
 35 TEM evidențiază, de asemenea, o morfologie de tip "beads-into-fiber/beads-into-string" cu  
 particule de ulei încapsulate din loc în loc în interiorul fibrei de chitosan. Între "nodurile"  
 37 conținând particulele de ulei nu există decât chitosan simplu.

### 39 Rezultatele testelor antibacteriene pentru probele PLA/Chitosan cu Masă Moleculară Mare/Cuișoare și PLA/Chitosan cu Masă Moleculară Mare/Argan

<i>E. coli</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonela typhimurium</i>	
24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
43 PLA/Chitosan cu Masă Moleculară Mare					
10	53	16	58	35	71
45 PLA/Chitosan cu Masă Moleculară Mare/Argan					
49	82	47	100	55	94
47 PLA/Chitosan cu Masă Moleculară Mare/Cuișoare					
53	78	53	100	65	90

# RO 131883 B1

Rezultatele testelor pentru activitatea antioxidantă:	1
S-a determinat și reprezentat grafic pentru soluția martor DPPH: $A_{DPPH}(t)/A_{DPPH}(t_{init}) =$	
= absorbanta soluției de DPPH (martor) la momentul la care s-a făcut măsurătoarea (ca	3
fracție din absorbantă la momentul începerii experimentului), iar pentru probele PLA,	
PLA/CH/N <sub>2</sub> și PLA/CH/Clove/N <sub>2</sub> : $[A_{DPPH}(t) - A_{SAMPLE}(t)]/A_{DPPH}(t)$ în care $A_{DPPH}(t) =$ absorbanta	5
soluției de DPPH (martor) la momentul la care s-a făcut măsurătoarea, $A_{SAMPLE}(t) =$ absor-	
banța probei la momentul la care s-a făcut măsurătoarea.	7
Se constată că activitatea antioxidantă a filmelor acoperite cu amestecul chitosan cu	
masă moleculară mare/cuișoare este mai mare decât activitatea antioxidantă a filmelor	9
acoperite numai cu chitosan cu masă moleculară mare precum și, de asemenea, mai mare	
decât a filmelor neacoperite.	11
Astfel, avantajele formulărilor pe bază de ulei încapsulat în chitosan sunt:	
- îmbunătățirea proprietăților antibacteriene prin utilizarea combinației chitosan/ulei	13
esențial sau obținut prin presare la rece;	
- adăugarea de proprietăți antioxidante/antifungice provenind de la uleiul încapsulat;	15
- de asemenea, este de așteptat o creștere a stabilității în timp a uleiului încapsulat	
împreună cu o eliberare mai lentă a acestuia.	17
<b>Exemplul 2</b>	
<i>PLA/ulei de argan</i>	19
Se efectuează conform exemplului 1, cu deosebirea ca în loc de ulei de cuișoare se	
utilizează ulei de argan dizolvat în cloroform.	21
Filmul de PLA acoperit cu nanostructuri încapsulate de ulei de cuișoare în chitosan	
se investighează prin SEM și TEM și se testează pentru activitatea antioxidantă, antibac-	23
teriană și antifungică.	
Nanofibrele au un diametru mediu de 360 nm, iar particulele, de 220 nm, și formează	25
împreună o meșă relativ poroasă care acoperă uniform suprafața. Testele antifungice indică	
o activitate de peste 95%, iar activitatea antibacteriană de peste 50%. Aceste valori sunt	27
superioare celor imprimate numai de chitosan.	
Și în acest caz, imaginile SEM evidențiază o morfologie de tip fibre/particule pentru	29
probele conținând chitosan cu masă moleculară mare. Aceasta se datorează viscozității mai	
mari a chitosanului ceea ce duce la o mai bună înter pătrundere a lanțurilor moleculare în	31
cazul acestor probe. Imaginile TEM evidențiază o morfologie similară cu cea a probelor con-	
ținând ulei de cuișoare, și anume morfologie de tip "beads-into-fiber/beads-into-string" cu	33
particule de ulei încapsulate din loc în loc în interiorul fibrei de chitosan. Între "nodurile" con-	
ținând particulele de ulei nu există decât chitosan simplu.	35

# RO 131883 B1

1

## Revendicări

3

1. Compozit bioactiv stratificat, antibacterian, antifungic, antioxidant, pe bază de acid polilactic și chitosan, **caracterizat prin aceea că** este constituit din 90...99,9% acid polilactic, 0,05...5% chitosan și 0,05...5% ulei vegetal ales dintre uleiul de argan și uleiul de cuișoare.

5

7

2. Procedeu de obținere de filme pe bază de compozit bioactiv definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, într-o primă etapă, se activează filmul de acid polilactic prin tratare în plasmă de azot la o frecvență de 1,3 MHz, o putere de 100 W și o presiune de lucru de 0,4 mbar, urmată de expunere la aer, iar în a doua etapă, filmul activat se acoperă propriu-zis prin electrofilare/electropulverizare coaxială la o intensitate a câmpului electric de 10 kV/cm cu un debit de 1,2 μl/min, timp de 30 min, cu o soluție de chitosan de concentrație 1,5% în greutate în acid acetic glacial și cu o soluție din elementul activ ne-electrofilabil de ulei vegetal 1,5% în cloroform sau acid acetic, ales dintre uleiul de argan și uleiul de cuișoare, din care se obține un compozit stratificat stabil, cu activitate antimicrobiană, antifungică și antioxidantă.

11

13

15

(51) Int.Cl.

**D04H 1/28** (2012.01);

**B32B 27/00** (2006.01);

**D01F 8/04** (2006.01)

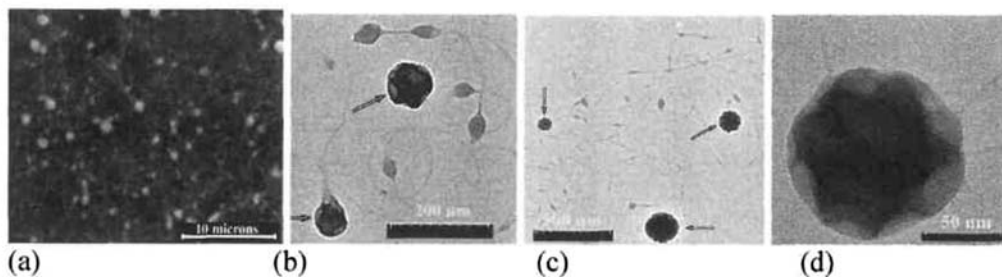


Fig. 1

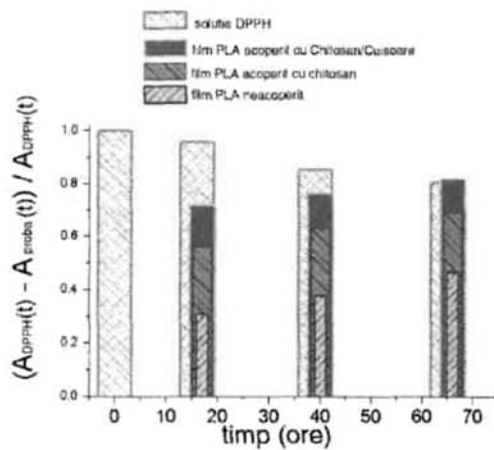


Fig. 2

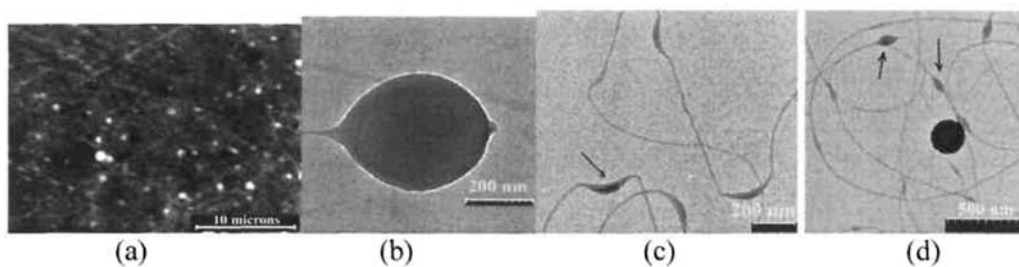


Fig. 3

