



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2016 00735**

(22) Data de depozit: **18/10/2016**

(41) Data publicării cererii:
27/04/2018 BOPI nr. **4/2018**

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

(72) Inventatori:
• **PROFIRE LENUȚA, STR. EMIL HONORIU
NR. 12, IAȘI, IS, RO;**
• **DRAGOSTIN OANA MARIA,
STR. RÂMNICU SĂRAT NR. 102, CAZASU,
BR, RO;**
• **VASILE CORNELIA, STR.PANTELIMON
NR.29, BL.308, SC.A, ET.3, AP.12, IAȘI, IS,
RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE ȘI COMPOZIȚIA UNOR DERIVAȚI
DE CHITOSAN CU POTENȚIAL BIOLOGIC ÎMBUNĂȚĂȚIT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor derivați de chitosan cu potențial biologic îmbunătățit. Procedeu, conform invenției, constă în activarea chitosanului sub formă de O-carboximetil chitosan, după care acesta se tratează cu acid ascorbic, respectiv α -tocofenol, în mediu de acetonă și în prezența acidului sulfuric drept catalizator, din care

rezultă, după purificare prin dializă, derivați chitosan-acid ascorbic și chitosan- α -tocofenol care prezintă activitate antioxidantă și antimicrobiană îmbunătățită.

Revendicări: 2



PROCEDEU DE OBTINERE ȘI COMPOZIȚIA UNOR DERIVAȚI DE CHITOSAN CU POTENȚIAL BIOLOGIC ÎMBUNĂȚIT

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la procedeul de obținere, compoziția și activitatea biologică a unor derivați de chitosan. Chitosanul cu greutate moleculă medie s-a funcționalizat prin reacția cu acidul ascorbic (vitamina C) sau α -tocoferolul (vitamina E) în vederea intensificării efectelor biologice antimicrobiene, ținta fiind imprimarea efectului antioxidant noilor derivați obținuți. Structura chimică a derivaților noi sintetizați a fost confirmată prin spectroscopie IR. În urma evaluării biologice s-a evidențiat faptul că derivații chitosanului rezultați prezintă un efect antiradicalic față de radicalii DPPH și ABTS, efectul fiind comparabil cu cel al acidului ascorbic și net superior α -tocoferolului, utilizat ca antioxidant de referință și totodată activitatea antimicrobiană este îmbunătățită semnificativ.

Chitosanul, poli- $\alpha(1,4)$ -2-amino-2-deoxi- β -D-glucan, este o polizaharidă naturală, hidrofilă, nontoxică, biocompatibilă și biodegradabilă, ce se obține prin *N*-deacețilarea α -chitinei (1). Este caracterizat chimic ca fiind un polimer policationic, constituit din unități de glucozamină și *N*-acetil-glucozamină, legate glicozidic în poziția 1-4, conținând grupări amino și hidroxil libere, ceea ce îl face susceptibil la o serie de modulări structurale (2). De-a lungul timpului chitosanul a devenit un material cu multiple și importante aplicații biomedicale, interesul cercetătorilor pentru acest biopolimer datorându-se proprietăților sale și anume: biocompatibilitate, biodegradabilitate și toxicitatea scăzută (3). Datorită acestor caracteristici, chitosanului i s-au atribuit o serie de aplicații, fie utilizat ca atare, fie prin asociere cu alți polimeri naturali în: industria alimentară, industria farmaceutică, industria textilă, agricultura, industria produselor cosmetice (4). Cel mai cunoscut efect biologic al chitosanului este cel antimicrobian, fiind activ pe o serie de specii de bacterii dar și de fungi (5). Activitatea antimicrobiană este explicată prin interacțiunile ionice care au loc între peptidopolizaharidă, ce funcționează ca și polication, și peretele celulei bacteriene ce prezintă sarcină negativă. Complexul format va afecta cationi precum Ca^{+2} , Mg^{+2} prezenți în peretele celulei bacteriene, va crește permeabilitatea acestuia diminuându-i astfel funcțiile (6). Totodată este dovedit faptul că chitosanul stimulează creșterea fibroblastelor, afectând totodată activitatea macrofagelor, ceea ce are efect benefic în procesul de cicatrizare a rănilor. Acest efect poate fi îmbunătățit prin includerea în structura membranelor polimerice pe bază

de chitosan a unor agenți antibacterieni de tipul ciprofloxacina, norfloxacina, sulfonamide (7). Un alt efect al chitosanului studiat intens în decursul timpului este cel antioxidant. Acest efect s-a dovedit a fi dependent de gradul de deacetilare și de concentrația polimerului. Grupările amino primare din structura chitosanului joacă un rol important, prin aceea că interacționează cu radicalii liberi formând grupări NH_3^+ (8). Dintre cele patru forme de grupări amino: grupări imino, grupări amino primare, grupări amino secundare și grupări amino cuaternare, cele din urmă au demonstrat o activitate antioxidantă importantă față de radicalii hidroxil. Pentru acest polimer s-au evidențiat și alte efecte terapeutice printre care se numără efectul hipocolesterolemiant, antiacid și antiulceros, efecte antiinflamatoare, antidiabetice și neuroprotectoare (9, 10).

În vederea imprimării și unei activități antioxidante chitosanului s-a recurs la derivatizarea acestuia utilizând doi antioxidanți – acidul ascorbic (vitamina C) și α -tocoferolul (vitamina E).

Acidul ascorbic (vitamina C) este un reprezentant important al vitaminelor hidrosolubile cu importante efecte biologice, intervenind totodată ca și coenzimă și agent reducător într-o multitudine de procese biochimice (11). Astfel, intervine în biosinteza colagenului, a unor neurotransmițători (adrenalină, noradrenalină, serotonină), în metabolismul glucozei, al acidului folic și al unor aminoacizi, în îndepărtarea radicalilor liberi de oxigen, în regenerarea vitaminei E la nivel membranar, etc. (11, 12). La rândul ei vitamina E, aparține grupei de vitamine liposolubile, sub această denumire reunindu-se o familie de tocoferoli, cel mai activ fiind α -tocoferolul. Cel mai important efect al vitaminei E este cel antioxidant, împiedicând oxidarea acizilor grași nesaturați, a vitaminei A, a carotenoidelor și a unor tioenzime. În organism împiedică peroxidarea acizilor grași ceea ce are drept rezultat protejarea fosfolipidelor membranare (11, 13).

Scopul invenției de față este sinteza unor noi derivați de chitosan cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene îmbunătățite. Pentru obținerea derivaților descriși în invenția de față s-au utilizat următoarele materiale:

- Chitosan cu greutate moleculară medie (CHM), achiziționat de la firma Sigma Aldrich, cu $M_w = 190,000-300,000$ g/mol, grad de deacetilare de 75-85 % și vâscozitate 200-800 cP;
- vitamina C (acid ascorbic), achiziționat de la firma Sigma Aldrich, formulă moleculară $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_6$, masă moleculară 176.12, reactiv ACS cu puritate $\geq 99\%$;

- vitamina E (α -tocoferol), achiziționat de la firma Sigma Aldrich, formulă moleculară $C_{29}H_{50}O_2$, masa moleculară 430.71, reactiv ACS, puritate $\geq 95.5\%$, densitate la $20^\circ C$ de 0.950 g/mL;
- acid monocloracetic, achiziționat de la firma Sigma Aldrich, formulă moleculară $ClCH_2COOH$, masă moleculară 94.50, reactiv ACS cu puritate $\geq 99.0\%$.

Procedeele de obținere a unor noi derivați de chitosan cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene îmbunătățite, conform invenției, constă într-o primă etapă de activarea chitosanului sub formă de O-carboximetil chitosan după care acesta reacționează cu cei doi compuși bioactivi Vitamina C sau Vitamina E în prezența acidului sulfuric care are rol de catalizator.

Pentru obținerea O-carboximetil chitosanului, chitosanul în concentrație de 10% (m/v) s-a adus într-o soluție de hidroxid de sodiu 40% și s-a menținut la frigider pentru 24 h. Ulterior chitosanul a fost supus reacției cu acidul monocloracetic, raportul dintre acidul monocloracetic și chitosan fiind de 1:6. Reacția a avut loc în mediu de etanol, la temperatura camerei, timp de 24 h (Fig. 1). Din amestecul rezultat produsul de reacție s-a precipitat cu acetonă, după care s-a purificat prin dializă (14).

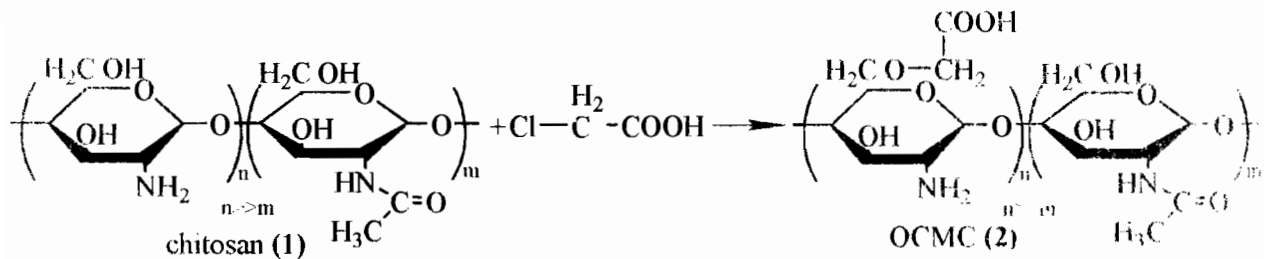


Fig.1. Reacția de sinteză a O-carboximetilchitosanului (OCMC)

În continuare se dau detalii privind procedeele de obținere a celor doi derivați la care face referire invenția, chitosan-acid ascorbic și chitosan- α -tocoferol.

Exemplul 1: Procedeele de obținere a derivatului chitosan-acid ascorbic (Vitamina C)

O-carboximetil chitosanul (OCMC) (1 g, 0,01 moli) s-a amestecat cu 20 mL acetonă, după care în suspensia rezultată s-a adăugat acidul ascorbic (3.53 g, 0.02 moli) și 3-4 picături de acid sulfuric concentrat cu rol de catalizator (Fig. 2). Amestecul rezultat s-a agitat mecanic la $40^\circ C$ timp de 24 h, după care compusul rezultat s-a separat din amestecul de reacție prin filtrare. Purificarea s-a realizat prin dializă.

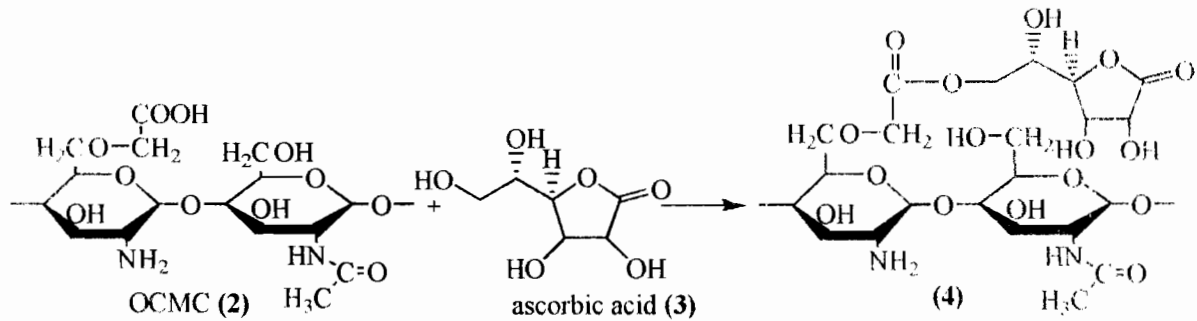


Fig.2. Sinteza derivatului chitosan-acid ascorbic.

Exemplul 2: Procedeu de obținere a derivatului chitosan- α -tocoferol (Vitamina E)

O-carboximetil chitosanul (OCMC) (1 g, 0,01 moli) s-a amestecat cu 20 mL. acetona, după care în suspensia rezultată s-a adăugat α -tocoferol (4,31 g, 0.02 moli) și 3-4 pic. de acid sulfuric concentrat cu rol de catalizator (Fig. 3). Amestecul rezultat s-a încălzit pe baie de apă sub reflux timp de 10 h, după care compusul rezultat s-a separat din amestecul de reacție prin precipitare cu acetona. Purificarea s-a realizat prin dializă.

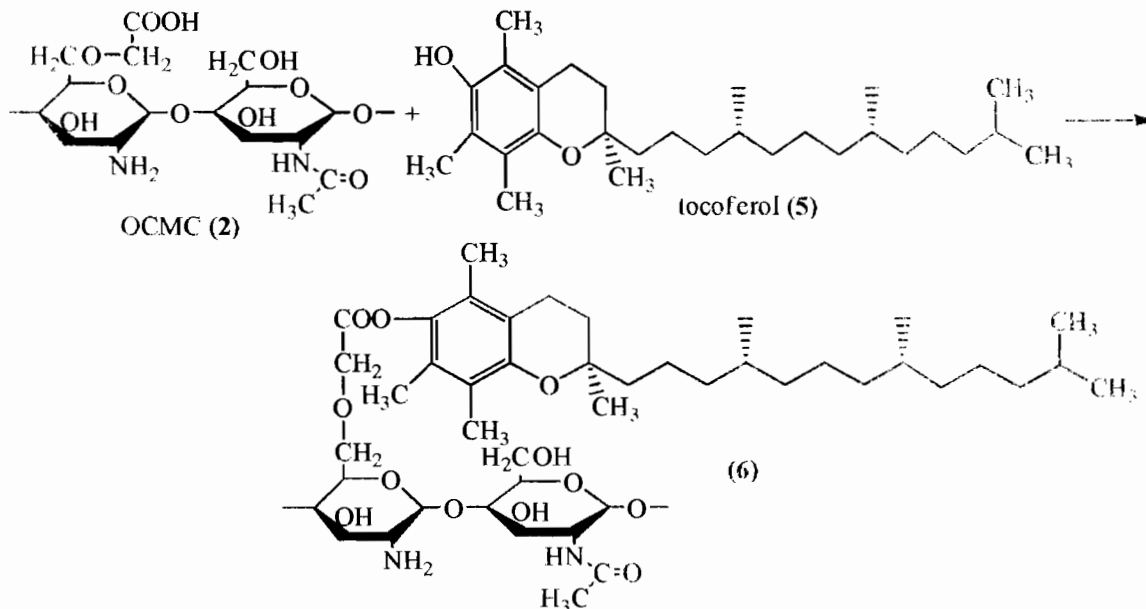


Fig. 3. Sinteza derivatului chitosan- α -tocoferol.

Metode de caracterizare a derivaților de chitosan

Spectroscopia FTIR

Spectrele în infraroșu ale derivaților de chitosan sintetizați au fost înregistrate utilizând un spectrometru FT-IR ABB Bohmem MB-3000 (Canada), după 32 scanări pe o scară de la 4000-500 cm⁻¹, cu o rezoluție spectrală de 4 cm⁻¹. Interpretarea spectrelor s-a realizat folosind

6

programul Horizon MBTM FTIR Software și GRAMS 32 Software (Galactic Industry Corporation, Salem, NH), Version 6.00.

Funcționalizarea chitosanului în urma reacției cu acidul ascorbic (Vitamina S) și α -tocoferolul (Vitamina E) este confirmată prin apariția în spectru atât a benzilor de absorbție caracteristice chitosanului, respectiv unității glucozaminice, cât și componenteii vitaminice (Fig. 4, 5 și 6).

Astfel, în spectrul chitosanului și derivaților săi funcționalizați (chitosan-acid ascorbic, chitosan- α -tocopherol) au fost identificate benzile caracteristice grupării amidice, datorate vibrațiilor $\delta C=O$ (amida I) în domeniul $1565-1665\text{ cm}^{-1}$ și δNH (amida II) în domeniul $1395-1450\text{ cm}^{-1}$. Totodată în regiunea $3320-3400\text{ cm}^{-1}$ s-a identificat o bandă largă atribuită vibrației de valență a grupărilor OH alcoolice atât din structura chitosanului cât și din cea a vitaminei C.

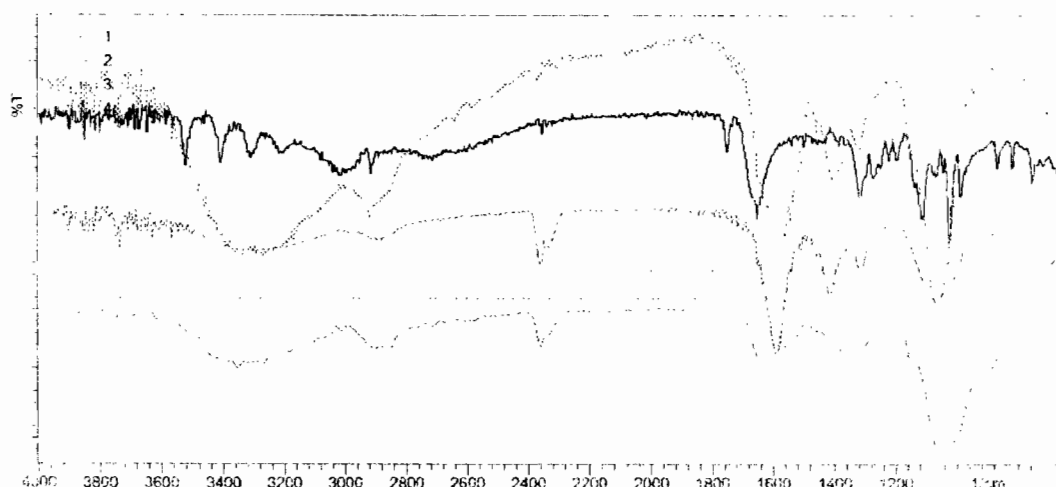


Fig.4. Spectrul IR al chitosanului (1), OCMC (2), acid ascorbic (3), chitosan-acid ascorbic (4).

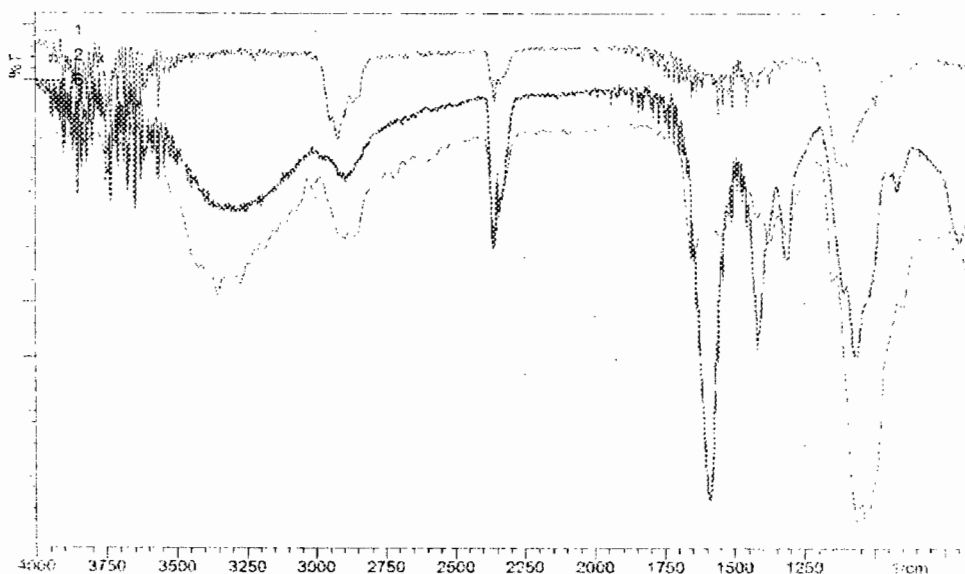


Fig.5. Spectrul IR al chitosanului (1), OCMC (2), α -tocoferol (6).

BM
Sclerito

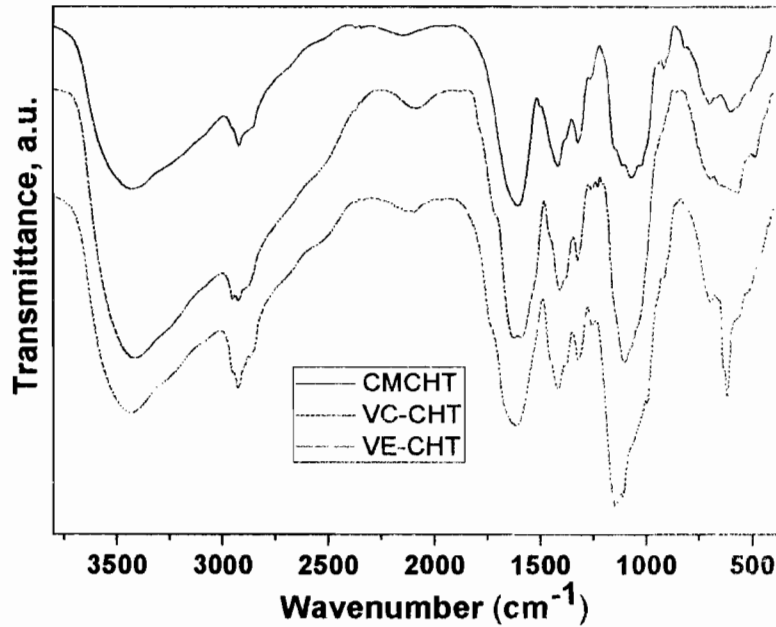


Fig. 6. Spectrul IR al chitosanului (CMCHT), chitosan-acid ascorbic (VC-CHT), chitosan- α -tocoferol (VE-CHT).

Evaluarea activității antioxidante

Activitatea antioxidantă al derivaților de chitosan, a fost evaluată utilizând două teste *in vitro* și anume capacitatea de inhibare a radicalilor liberi DPPH și ABTS.

Capacitatea de inhibare a radicalilor liberi DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a fost evaluată conform metodei descrise în literatură (15). Probele au fost dizolvate în acid acetic 2% pentru a se obține o soluție de concentrație 10 mg/mL. Din această soluție stoc s-au măsurat 50 μ L, 100 μ L și 200 μ L la care s-au adăugat diferite volume din soluția metanolică de DPPH 0,1 mM (2950 μ L, 2900 μ L, 2800 μ L). Amestecul obținut a fost menținut la întuneric timp de 30 de minute după care s-a citit absorbanta la 517 nm. Ca antioxidant standard s-au utilizat acidul ascorbic și α -tocoferolul în aceeași concentrație cu cea a probelor. Determinările au fost făcute utilizând o probă martor, respectiv soluția metanolică de DPPH. Toate determinările s-au realizat în triplicat. Capacitatea de inhibare a radicalilor liberi a fost calculată conform următoarei formule:

$$\text{Inhibiție \%} = \left[\frac{AM - AP}{AM} \right] \times 100 \quad (6)$$

în care: AM = absorbanta martorului la 517 nm;

AP = absorbața probei la 517 nm.

Rezultatele obținute (Fig. 7) au evidențiat faptul că prin funcționalizarea realizată s-a imprimat chitosanului (1) o activitate foarte bună antioxidantă, derivații rezultați, chitosan-

acid ascorbic (4) și chitosan- α -tocoferol (6), prezentând un efect antiradicalic față de DPPH foarte intens față de chitosan (1) și respectiv O-carboximetil-chitosan (2), utilizat ca intermediar în sinteza celor doi derivați. În condiții experimentale identice valorile procentelor de inhibiție înregistrate pentru chitosan au variat între 0,99-3,63%.

Pentru derivatul chitosan-acid ascorbic (4) procentul de inhibiție a radicalilor DPPH a variat între 96,60% și 99,47% în timp de pentru chitosan- α -tocoferol (6). aceste valori s-au situat în intervalul 17,31-49,78%, depinzând de concentrația din proba testată. Totodată valorile obținute în cazul derivatului chitosan-acid ascorbic au fost comparabile cu cele obținute în cazul acidului ascorbic (97,81-99,82%) și superioare α -tocoferolului (86,80-97,62%) folosite ca și substanțe de referință.

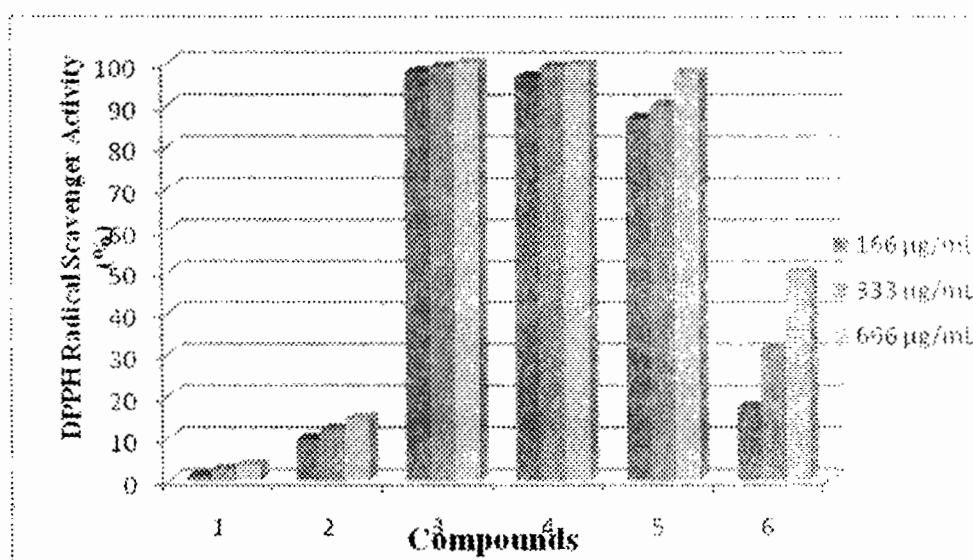


Fig.7. Efectul antiradicalic față de radicalul DPPH (%) pentru chitosan (1), O-carboximetil-chitosan (2), acid ascorbic (3), chitosan-ascorbic (4), α -tocoferol (5), chitosan- α -tocoferol (6).

Capacitatea de inhibare a radicalului cation $ABTS^{+}$. Generarea radicalului cation $ABTS^{+}$ s-a realizat prin tratarea soluției apoase de acid 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (7 mM) cu persulfat de amoniu (2,45 mM). Amestecul rezultat a fost păstrat la întuneric timp de 12-16 ore pentru a favoriza formarea radicalilor $ABTS^{+}$, rezultând soluția stoc. Înainte de începerea experimentului soluția stoc de $ABTS^{+}$ se diluează cu alcool etilic concentrat în vederea obținerii unei soluții cu absorbanta de $0,700 \pm 0,020$ la lungimea de undă 734 nm. Probele s-au dizolvat în acid acetic 2% pentru a se obține o soluție stoc de concentrație 10 mg/mL. Din soluția stoc s-au măsurat 10 μ L, 15 μ L, 25 μ L și 50 μ L la care s-au adăugat diferite volume din soluția de $ABTS^{+}$ (1990 μ L, 1985 μ L, 1975 μ L, 1950) (16). Amestecul

rezultat s-a lăsat în repaus 6 minute, după care absorbanta s-a citit la $\lambda = 734$ nm, față de martor (alcool etilic concentrat).

Activitatea antioxidantă a probelor analizate, exprimată ca procent de inhibiție (I%) a radicalului cation $ABTS^{*+}$ a fost exprimată procentual cu ajutorul următoarei formule:

$$I \% = (A_0 - A_t / A_0) \times 100 \quad (8)$$

în care,

A_0 = valoarea absorbantei soluției etanolice de $ABTS^{*+}$;

A_t = valoarea absorbantei probei, citită la 6 minute după adăugarea soluției de $ABTS^{*+}$.

Toate determinările au fost efectuate în triplicat iar acidul ascorbic și vitamina E au fost utilizate ca substanțe de referință (martor pozitiv) și prelucrate în mod similar probelor testate.

Rezultatele obținute (Fig. 8) au evidențiat faptul că activitatea antiradicalică față de $ABTS^{*+}$ a derivaților de chitosan (chitosan-acid ascorbic, chitosan- α -tocoferol) este foarte bună. În condiții experimentale identice valorile procentelor de inhibiție înregistrate pentru chitosan au variat între 9,50-31,56%, valori ce nu îl încadrează în categoria substanțelor cu activitate antioxidantă, în schimb derivații de chitosan obținuți conform invenției au valori ale activității antiradicalice față de $ABTS^{*+}$ foarte mari.

Pentru derivatul chitosan-acid ascorbic (4) procentul de inhibiție a radicalilor $ABTS^{*+}$ a variat între 66,06% și 99,07% în timp de pentru chitosan- α -tocoferol (6), aceste valori s-au situat în intervalul 30,86-54,90%, depinzând de concentrația din proba testată. Totodată valoarea obținută în cazul derivatului chitosan-acid ascorbic la concentrația de 250 μ g/ml (99,07%) a fost comparabilă cu cea obținută în cazul acidului ascorbic (99,87%) și α -tocoferolului (98,85%) la aceeași concentrație, folosite ca și substanțe de referință

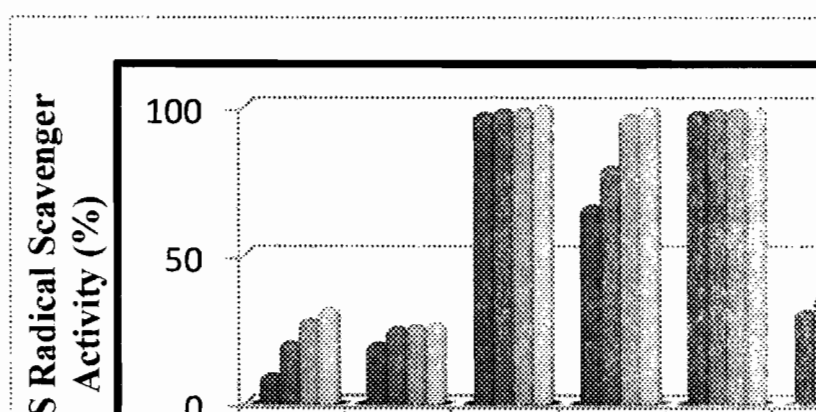


Fig. 8. Efectul antiradicalic față de radicalul cation $ABTS^{*+}$ (%) pentru chitosan (1), O-carboximetil-chitosan (2), acid ascorbic (3), chitosan-acid ascorbic (4), α -tocoferol (5), chitosan- α -tocoferol (6)

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 și antifungice utilizând, culturi bacteriene tip ATCC de *Escherichia coli* 25922; *Salmonella typhimurium* 14028; *Listeria monocytogenes* 7644; și fungice ca *Candida albicans* 90028 utilizând metoda difuzimetrică (17).

Tehnica de lucru constă în următoarele etape: sterilizarea mostrelor; contaminare cu bacterii de cultură ATCC; inoculare și incubare efectuată 24 și 48 de ore la 44°C; identificarea germenilor ținta. Sterilizarea probelor a fost realizată la autoclav la 110°C, 0,5 bari timp de 20 min. S-au preparat suspensii din tulpinile ATCC în ser fiziologic peptonat, cu o turbiditate de 0,5 Mc Farland. Plăcile cu mediu Müller Hinton s-au însămânțat prin dispersie cu tamponul steril din fiecare suspensie ATCC. S-au lasat plăcile să se usuce întredeschise timp de 3-5 min., până când lichidul inoculat s-a absorbit în mediu, pentru ca suprafața mediului să fie uscată. Discurile din hartie de filtru Whatman no.4, cu diametrul de 5 mm s-au umectat în ser fiziologic peptonat apoi s-au impregnat cu cate 0,005 g din probele de analizat; ca martor negativ s-a folosit discul de hartie de filtru umectat în ser fiziologic peptonat. Cu ajutorul unor pense sterilizate, discurile cu probe și martorul s-au asezat pe suprafața mediului inoculat cu tulpinile ATCC pe diagonale, respectiv centrul plăcii; S-au incubat la termostat plăcile la $37 \pm 1^\circ \text{C}$ timp de 24h; S-au măsurat diametrele zonelor de inhibiție totală pentru tulpina de testat, inclusiv diametrul discului, cu ajutorul riglei, pe spatele plăcii cu mediul însămânțat, în lumina reflectată, pe un fond întunecat.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1. Diametrul zonei de inhibiție a dezvoltării bacteriilor și fungului de către chitosan (1) și a derivații sintetizați, chitosan –acid ascorbic (2) și chitosan- α -tocoferol (3).

No.	Proba	Diametrul zonei de inhibiție(mm)			
		<i>Escherichia coli</i> 25922	<i>Salmonella typhimurium</i> 14028	<i>Listeria monocytogenes</i> 7644	<i>Candida albicans</i> 90028
1	CH	9	10	12	10
3	VC-CHT	16	20	25	18
4	VE-CHT	20	14	16	15
5	MARTOR	0	0	0	0

Din datele obținute se poate remarca o intensificare semnificativă a activității antimicrobiene a chitosanului prin modificarea lui cu cele două vitamine, activitatea cea mai intensă fiind manifestată de derivatul cu Vitamina C (VC-CHT) a cărui activitate antimicrobiană este dublă față de cea a chitosanului.

BIBLIOGRAFIE

1. Charles E. Carraher Jr. *Polymer Chemistry*, 7th ed. Florida 2008, p.41.
2. Batista MKS, Pinto LF, Gomes CAR, Gomes P. Novel highly-soluble peptide-chitosan polymers: Chemical synthesis and spectral characterization. *Carbohydrate Polymers*2006; 64: 299-305.
3. Feng Y, Xia W. Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-chitosan. *Carbohydrate Polymers*2011; 83: 1169-1173
4. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*2010; 144: 51-63.
5. Guiping M, Dongzhi Y, Yingshan Z, et al. Preparation and characterization of water-soluble N- alkylated chitosan. *Carbohydrate Polymers*2008; 74: 121-126.
6. Li P, Zhou C, Rayatpisheh S, et al. Cationic peptidopolysaccharides show excellent broad-spectrum antimicrobial activities and high selectivity. *Advanced Materials*2012; 24: 4130-4137.
7. Öztürk E, Agalar C, Keçeci K, Denkbaz EB. Preparation and characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science*2006; 101:1602–1609.
8. Xie W, Xu P, Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*2001; 11: 1699–1701.
9. Lee H.W., Park Y.S.,Choi J-W.,Yi S.,Shin W.-S., Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*2003;26(8):1100-1103
10. Yao H.T., Huang S.Y., Chiang M.T., A comparative study on hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of high and low molecular weight chitosan in streptozotocin-induced diabetic rats, *Food and Chemical Toxicology*2008; 46:1525–1534.
11. Cristea A.N. (editor), *Tratat de farmacologie*, editia I, EdituraMedicinală. București, 2005, p. 813, 843
12. Daud Z.A.M., Ismail A., Sarmadi B., Ascorbic acid: physiology and health effects, *Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health*, 2016, 266-274

13. Atkinson J., Epand R.F., Epand R.M., Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review, *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 44(5): 739-764.
14. Zheng M., Han B., Yang Y. Liu W., Synthesis, characterization and biological safety of O-carboxymethyl chitosan used to treat Sarcoma 180 tumor, *Carbohydrate Polymers* 2011, 86(1): 231–238.
15. Dragostin O.M., Lupascu F., Vasile C., Mares M., Nastasa V., Moraru R.F., Pieptu D., Profire L., Synthesis and Biological Evaluation of New 2-Azetidinones with Sulfonamide Structures, *Molecules* 2013, 18(4), 4140-4157.
16. Lupascu F.G., Dragostin O.M., Foia L., Lupascu D., Profire L., The Synthesis and the Biological Evaluation of New Thiazolidin-4-one Derivatives Containing a Xanthine Moiety, *Molecules* 2013, 18(8): 9684-9703.
17. Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard -- Eleventh Edition. CLSI document M2- A11, 2012; SR EN ISO 7218/2014

PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI COMPOZITIA UNOR DERIVAȚI DE CHITOSAN CU POTENȚIAL BIOLOGIC ÎMBUNĂȚIT

REVENDICĂRI

Revendicarea Nr 1. Procedeu de obținere a derivaților chitosan-acid ascorbic și chitosan- α -tocoferol, **caracterizat ce prin aceea că**, el constă în activarea chitosanului sub forma de O-carboximetil chitosan după care acesta se tratează cu acid ascorbic respectiv cu α -tocoferol, în mediu de acetonă și în prezența acidului sulfuric drept catalizator. După purificare prin dializă rezultă compuși de culoare alb-gălbui, cu activitate antiradicalică-antioxidantă și un efect antimicrobian îmbunătățit comparativ cu chitosanul.

Revendicarea 2. Derivați de chitosan **caracterizați prin aceea că** conțin acid ascorbic sau α -tocoferol și prezintă potențial biologic îmbunătățit și anume activitate antioxidantă și efect antimicrobian îmbunătățit. Chitosan-acid ascorbic prezintă un procent de inhibiție de 96,60%-99,47%, față de DPPH, de 66,06%-99,07% față de ABTS^{•+}, iar diametrul zonei de inhibiție față de tulpinile bacteriene de *Escherichia coli* 25922, *Salmonella typhymurium*, *Listeria monocytogenes* de 16-26 mm și față de *Candida albicans* de 18 mm. Chitosan- α -tocoferol, procent de irihibiție de 17,31-49,78%, față de DPPH, de 30,86-54,90% față de ABTS^{•+}, diametrul zonei de inhibiție față de tulpinile bacteriene de *Escherichia coli* 25922, *Salmonella typhymurium*, *Listeria monocytogenes* de 14-20 mm și față de *Candida albicans* de 15 mm.