



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45)Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2023**

BOPI nr. **5/2023**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**TIAN X. L. ȘI COALB., "SYNTHESIS AND
EVALUATION OF CHITOSAN- VITAMIN C
COMPLEX", INDIAN PHARM. SCI., VOL.
71(4), PP. 371-376, 2009; LIAN H. ȘI
COLAB., "SUPRAMOLECULAR MICELLAR
NANOAGGREGATES BASED ON A NOVEL
CHITOSAN/VITAMIN E SUCCINATE
COPOLYMER FOR PACLITAXEL
SELECTIVE DELIVERY", INT. J.
NANOMEDICINE, VOL. 6, PP. 3323-3334,
2011; YAN LI ȘI COLAB., "PREPARATION,
CHARACTERIZATION AND INSECTICIDAL
ACTIVITY OF AVERMECTIN-
GRAFED-CARBOXYMETHYL CHITOSAN",
BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL,
P. 3, 2016**

(54) **DERIVAȚI DE CHITOSAN CU POTENȚIAL BIOLOGIC
ÎMBUNĂȚĂȚIT ȘI PROCEDU DE OBȚINERE**

Examinator: ing. MIHĂILESCU CĂTĂLINA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat,
la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în
termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de
acordare a acesteia

1 Invenția se referă la derivați de chitosan și procedeul de obținere al acestora, având
activitate biologică îmbunătățită. Chitosanul cu greutate moleculă medie a fost funcționalizat
3 prin reacția cu acidul ascorbic (vitamina C) sau α -tocoferolul (vitamina E) în vederea
intensificării efectelor biologice antimicrobiene, ținta fiind imprimarea efectului antioxidant
5 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
7 rezultați prezintă un efect antiradicalic față de radicalii DPPH și ABTS, efectul fiind com-
parabil cu cel al acidului ascorbic și net superior α -tocoferolului, utilizat ca antioxidant de
9 referință și totodată activitatea antimicrobiană este îmbunătățită semnificativ.

Chitosanul, poli- α (1,4)-2-amino-2-deoxi- β -D-glucan, este o polizaharidă naturală
11 hidrofilă, nontoxică, biocompatibilă și biodegradabilă, ce se obține prin *N*-deacetilarea α -
chitinei (Charles E., Carraher Jr., *Polymer Chemistry*, 7th ed. Florida, 2008, p. 41). Este
13 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,
15 ceea ce îl face susceptibil la o serie de modificări structurale (Batista M.K.S., Pinto L.F.,
Gomes C.A.R., Gomes P., *Novel highly-soluble peptide-chitosan polymers: Chemical*
17 *synthesis and spectral characterization. Carbohydrate Polymers*, 2006; 64: 299-305).
De-a lungul timpului chitosanul a devenit un material cu multiple și importante aplicații bio-
19 medicale, interesul cercetătorilor pentru acest biopolimer datorându-se proprietăților sale și
anume: biocompatibilitate, biodegradabilitate și toxicitatea scăzută (Feng Y., Xia W.,
21 *Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-*
chitosan, Carbohydrate Polymers, 2011; 83: 1169-3173). Datorită acestor caracteristici,
23 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, agricultură,
25 industria produselor cosmetice (Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., *Antimicrobial*
properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, International
27 *Journal of Food Microbiology*, 2010, 144: 51-63). Cel mai cunoscut efect biologic al
chitosanului este cel antimicrobian, fiind activ pe o serie de specii de bacterii dar și de fungi
29 (Guiping M., Dongzhi Y., Yingshan Z., et al. *Preparation and characterization of water-*
soluble N-alkylated chitosan, Carbohydrate Polymers, 2008, 74: 121-126). Activitatea
31 antimicrobiană este explicată prin interacțiunile ionice care au loc între peptidopolizaharidă,
ce funcționează ca și polication, și peretele celulei bacteriene ce prezintă sarcină negativă.
33 Complexul format va afecta cationi precum Ca^{+2} , Mg^{+2} prezenți în peretele celulei bacteriene,
va crește permeabilitatea acestuia diminuându-i astfel funcțiile (Li P., Zhou C., Rayatpisheh
35 S., et al., *Cationic peptidopolysaccharides show excellent broad-spectrum*
antimicrobial activities and high selectivity, Advanced Materials, 2012; 24: 4130-4137).
37 Totodată este dovedit faptul că chitosanul stimulează creșterea fibroblastelor, afectând
totodată activitatea macrofagelor, ceea ce are efect benefic în procesul de cicatrizare a
39 rănilor. Acest efect poate fi îmbunătățit prin includerea în structura membranelor polimerice
pe bază de chitosan a unor agenți antibacterieni de tipul ciprofloxacina, norfloxacina, sulfo-
41 namide (Öztürk E., Agalar C., Keceli K., Denkbas E.B., *Preparation and*
characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as wound dressing
43 *material. Journal of Applied Polymer Science*, 2006; 101:1602-1609). Un alt efect al
chitosanului studiat intens în decursul timpului este cel antioxidant. Acest efect s-a dovedit,
45 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
47 radicalii liberi formând grupări NH_3^+ (Xie W., Xu P., Liu Q., *Antioxidant activity of water-*

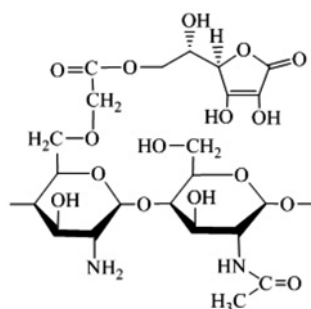
soluble chitosan derivatives *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2001; 11: 1699-1701). Dintre cele patru forme de grupări amino: grupări imino, grupări amino primare, grupări amino secundare și grupări amino cuaternare, cele din urmă au demonstrat o activitate antioxidantă importantă față de radicalii hidroxil. Pentru acest polimer s-au evidențiat și alte efecte terapeutice printre care se numără efectul hipocolesterolemiat, antiacid și antiulceros, efecte antiinflamatoare, antidiabetice și neuroprotectoare (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; 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).

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 (Cristea A.N. (editor), *Tratat de farmacologie*, ediția 1, Editura Medicală, București, 2005, p. 813, 843). 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. (Cristea A.N. (editor), *Tratat de farmacologie*, ediția 1, Editura Medicală, București, 2005, p. 813, 843; 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). 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 tio-enzime. În organism împiedică peroxidarea acizilor grași ceea ce are drept rezultat protejarea fosfolipidelor membranare (Cristea A.N. (editor), *Tratat de farmacologie*, ediția 1, Editura Medicală, București, 2005, p. 813, 843; Atkinson J., Epanand R.F., Epanand R.M., *Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review*, *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 44(5): 739-764).

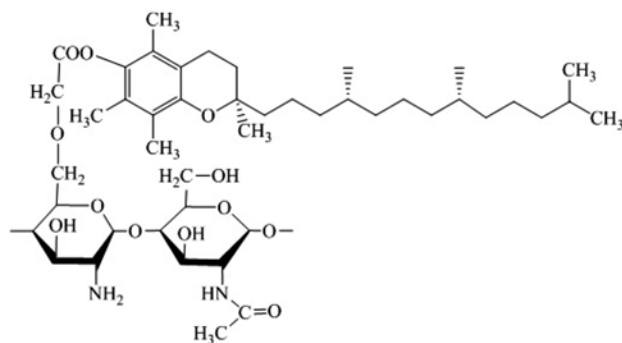
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în îmbunătățirea proprietăților antioxidante și antimicrobiene ale chitosanului.

Derivații de chitosan conform invenției înlătură dezavantajele stadiului tehnicii prin aceea că sunt reprezentați prin formulele structurale generale (4), O-carboximetil chitosan-acid ascorbic



și (6), O-carboximetil chitosan- α -tocoferol

RO 132470 B1



și benzile de absorbție caracteristice chitosanului la 1565-1665 cm⁻¹, unității glucozaminice la 1395-1450 cm⁻¹ și componentei vitaminice, acid ascorbic, respectiv, α-tocoferol, la 3320-3400 cm⁻¹.

Procedeul de obținere a derivaților de chitosan conform invenției constă în aceea că într-o primă etapă are loc activarea chitosanului la O-carboximetil chitosan, după care, în a doua etapă, o cantitate de 5% O-carboximetil chitosan s-a suspendat în acetonă, iar în suspensia rezultată s-au adăugat 18% acid ascorbic, respectiv, 22% α-tocoferol și s-a picurat 1% acid sulfuric concentrat cu rol de catalizator, amestecul rezultat s-a agitat mecanic, la 40°C timp de 24 h, rezultând compusul O-carboximetilchitosanului cu acid ascorbic (4) sau amestecul conținând α-tocoferol s-a încălzit pe baie de apă sub reflux timp de 10 h rezultând compusul O-carboximetilchitosanului cu α-tocoferol (6), compușii rezultați fiind separați din amestecul de reacție prin filtrare și purificați prin dializă.

Prin aplicarea invenției s-a constatat o îmbunătățire semnificativă a activității antioxidante pentru compușii conform invenției comparativ cu cea a precursorilor acestora și o acțiune antimicrobiană mult intensificată comparativ cu a chitosanului.

Se prezintă în continuare 2 exemple nelimitative de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...5 care reprezintă:

- fig. 1, reprezintă spectrul IR al chitosanului (1), OCMC (2), acidului ascorbic (3), O-carboximetil chitosan - acidului ascorbic (4);

- fig. 2, reprezintă spectrul IR al chitosanului (1), OCMC (2), O-carboximetil chitosan - α-tocoferolului (6);

- fig. 3, reprezintă spectrul IR al O-carboximetil chitosanului (2), O-carboximetil chitosan - acidului ascorbic (4) și O-carboximetil chitosan - α-tocoferolului (6)

- fig. 4, reprezintă activitatea de captare a radicalilor DPPH (%) (1: chitosan, 2: OCMC, 3: acid ascorbic, 4: OCMC- acid ascorbic, 5: α-tocoferol, 6: OCMC - α-tocoferol);

- fig. 5, reprezintă efectul antiradicalic față de radicalul cation ABTS^{•+} (%) pentru chitosan (1), OCMC (2), acid ascorbic (3), OCMC-acid ascorbic (4), α-tocoferol (5), chitosan-α-tocoferol (6).

Exemplul 1

Pentru obținerea derivaților conform invenției s-au utilizat următoarele materiale:

- chitosan cu greutate moleculară medie (CHM), achiziționat de la firma Sigma Aldrich, cu Mw = 190000-300000 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 C₈H₈O₆, masă moleculară 176,12, reactiv ACS cu puritate > 99%;

- vitamina E (α-tocoferol), achiziționat de la firma Sigma Aldrich, formulă moleculară C₂₉H₅₀O₂, masa moleculară 430,71, reactiv ACS, puritate > 95,5%, densitate la 20°C de 0,950 g/mL;

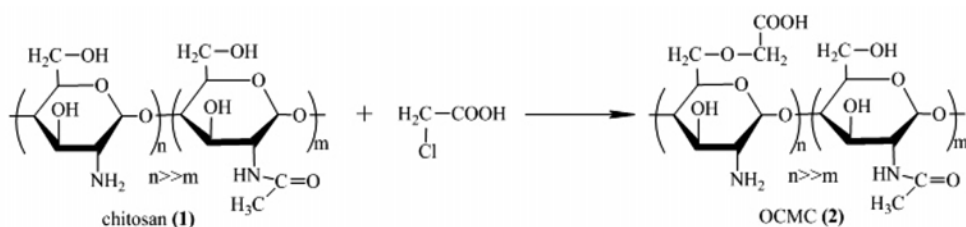
RO 132470 B1

- acid monocloracetic, achiziționat de la firma Sigma Aldrich, formulă moleculară ClCH_2COOH , masă moleculară 94,50, reactiv ACS cu puritate > 99,0%. 1

Procedeul de obținere a derivaților de chitosan cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene îmbunătățite, conform invenției, constă într-o primă etapă de activare a chitosanului sub formă de O-carboximetil chitosan, după care, în etapa a II-a, acesta reacționează cu cei doi compuși bioactivi Vitamina C sau Vitamina E în prezența acidului sulfuric care are rol de catalizator. 3
5
7

Obținerea O-carboximetil chitosanului

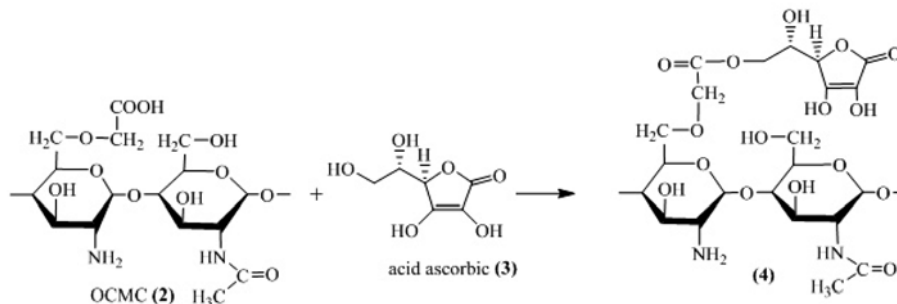
Pentru obținerea O-carboximetil chitosanului, chitosanul în concentrație de 30% (m/v) s-a adus într-o soluție de hidroxid de sodiu 40% și s-a menținut la frigider pentru 24 h. Ulterior chitosanul a fost supus reacției cu acidul monocloracetic, raportul dintre acidul monocloracetic și chitosan fiind de 1:6. Reacția a avut loc în mediu de etanol, la temperatura camerei, timp de 24 h, conform schemei de reacție de mai jos. Din amestecul rezultat produsul de reacție s-a precipitat cu acetonă, după care s-a purificat prin dializă (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*). 9
11
13
15



în care $n = \geq 50\%$, $m = \leq 50\%$. 25

Obținerea derivatului (4) O-carboximetil chitosan-acid ascorbic

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, conform schemei de mai jos. Amestecul rezultat s-a agitat mecanic la 40°C timp de 24 h, după care compusul rezultat s-a separat din amestecul de reacție prin filtrare. Purificarea s-a realizat prin dializă. 27
29

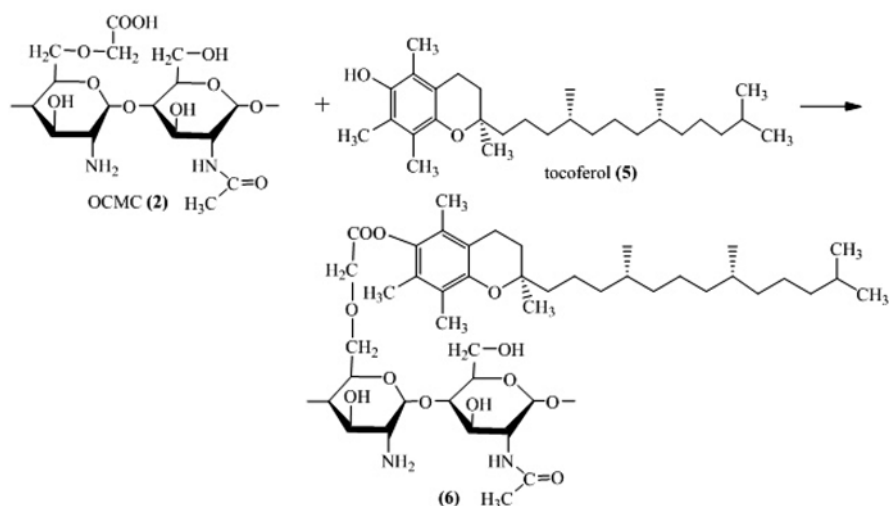


Exemplul 2

Obținerea derivatului (6) O-carboximetil chitosan- α -tocoferol

O-carboximetil chitosanul (OCMC) (1 g, 0,01 moli) obținut așa cum s-a arătat în exemplul 1 s-a amestecat cu 20 mL, acetonă, după care în suspensia rezultată s-a adăugat α -tocoferol (4,31 g, 0,02 moli) și 3-4 picături de acid sulfuric concentrat cu rol de catalizator, conform schemei de mai jos. 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 acetonă. Purificarea s-a realizat prin dializă. 41
43
45
47

RO 132470 B1



Metode de caracterizare a derivaților de chitosan

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

Funcționalizarea chitosanului în urma reacției cu acidul ascorbic (Vitamina C) și α -tocoferolul (Vitamina E) este confirmată prin apariția în spectru atât a benzilor de absorbție caracteristice chitosanului, respectiv unității glucozaminice, cât și componentei vitaminice (fig. 1, 2 și 3). Astfel, în spectrul chitosanului și derivaților săi funcționaliizați (chitosan-acid ascorbic, chitosan- α -tocopherol) au fost identificate benzile caracteristice grupării amidice, datorate vibrațiilor $\delta\text{C}=\text{O}$ (amida I) în domeniul 1565-1665 cm^{-1} și δNH (amida II) în domeniul 1395-1450 cm^{-1} . Totodată în regiunea 3320-3400 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.

2. 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 (Dragostin O.M, Lupașcu F., Vasile C., Mareș 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). 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 μL , 100 μL și 200 μL la care s-au adăugat diferite volume din soluția metanolică de DPPH 0,1 mM (2950 μL , 2900 μL , 2800 μL). Amestecul obținut: a fost menținut la întuneric timp de 30 min 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 următoarelor formule:

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

în care: AM = absorbanta martorului la 517 nm;

AP - absorbanta probei la 517 nm.

Rezultatele obținute (fig. 4) au evidențiat faptul că prin funcționalizarea realizată s-a imprimat chitosanului (1) o activitate antioxidantă foarte bună, derivații rezultați, O-carboximetil chitosan-acid ascorbic (4) și O-carboximetil chitosan- α -tocoferol (6), prezentând un efect antiradicalic față de DPPH foarte intens comparativ cu chitosanul (1) și respectiv O-carboximetil-chitosanul (2), utilizat ca intermediar în sinteza celor doi compuși. 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.

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 h 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 μ L) (Lupașcu F.G., Dragostin O.M., Foia L., Lupașcu 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). Amestecul rezultat s-a lăsat în repaus 6 min, 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 (1%) 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 min 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. 5) au evidențiat faptul că activitatea antiradicalică față de ABTS^{•+} a derivaților de O-carboximeil chitosan (O-carboximetil chitosan-acid ascorbic, O-carboximetil 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 O-carboximetil chitosan obținuți conform invenției au valori ale activității antiradicalice față de ABTS^{•+} foarte mari.

Pentru derivatul O-carboximetil chitosan-acid ascorbic (4) procentul de inhibiție a radicalilor ABTS^{•+} a variat între 66,06% și 99,07% în timp ce pentru O-carboximetil 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 (4) 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.

RO 132470 B1

1 3. Teste antimicrobiene

3 Testele antimicrobiene au fost efectuate în conformitate cu metodele standard ISO
16649-2 SR/2007 - Microbiologia produselor alimentare și animale. Protocolul experimental
5 pentru testarea eficienței antimicrobiene și antifungice utilizând, culturi bacteriene tip ATCC
de *Escherichia coli* 25922; *Salmonella typhimurium* 14028; *Listeria monocytogenes* 7644; și
fungice, cu *Candida albicans* 90028 utilizând metoda difuzimetrică (17).

7 Tehnica de lucru constă în următoarele etape: sterilizarea mostrelor; contaminare cu
bacterii de cultură ATCC; inoculare și incubare efectuată 24 și 48 h la 44°C; identificarea
9 germenilor țintă. Sterilizarea probelor a fost realizată în autoclavă la 110°C, 0,5 bari timp de
20 mm. S-au preparat suspensii din tulpinile ATCC în ser fiziologic peptonat, cu o turbiditate
11 de 0,5 Mc Farland. Plăcile cu mediu Müller Hinton s-au însămânțat prin dispersie cu
tamponul steril din fiecare suspensie ATCC. S-au lăsat plăcile să se usuce întredeschise timp
13 de 3-5 min, până când lichidul inoculat s-a absorbit în mediu, pentru ca suprafața mediului să
fie uscată. Discurile din hârtie de filtru Whatman no. 4, cu diametrul de 5 mm s-au umectat
15 în ser fiziologic peptonat apoi s-au impregnat cu câte 0,005 g din probele de analizat; ca
martor negativ s-a folosit discul de hârtie de filtru umectat în ser fiziologic peptonat. Cu
17 ajutorul unor pense sterilizate, discurile cu probe și martorul s-au așezat pe suprafața
mediului inoculat cu tulpinile ATCC pe diagonale, respectiv centrul plăcii. S-au incubat la
19 termostat plăcile la $37 \pm 1^\circ\text{C}$ timp de 24 h. S-au măsurat diametrele zonelor de inhibiție totală
21 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.

23

Diametrul zonei de inhibiție a dezvoltării bacteriilor și fungilor de către chitosan (1)
25 *și a derivații sintetizați, O-carboximetil chitosan-acid ascorbic (4)*
și O-carboximetil chitosan- α -tocoferol (6)

27

Tabelul 1

Nr. Crt.	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	compus (2)	9	10	12	10
2	compus (4)	16	20	25	18
3	compus (6)	20	14	16	15
4	martor	0	0	0	0

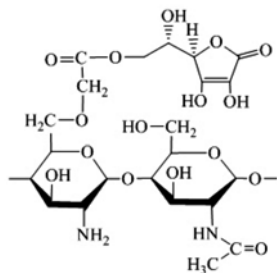
39

41 Din datele obținute se poate remarca o intensificare semnificativă a activității anti
microbiene a chitosanului prin modificarea lui cu cele două vitamine activitatea cea mai
intensă fiind manifestată de derivatul cu acid ascorbic (4) a cărui activitate antimicrobiană este
43 dublă față de cea a chitosanului.

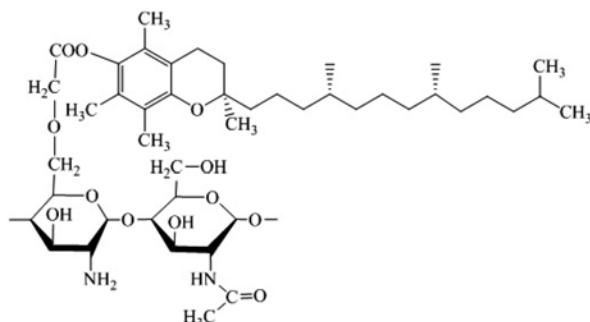
RO 132470 B1

Revendicări

1. Derivați de chitosan cu acid ascorbic sau α -tocoferol, **caracterizați prin aceea că**, sunt reprezentați prin formulele structurale generale (4), O-carboximetil chitosan-acid ascorbic



și (6), O-carboximetil chitosan- α -tocoferol



și benzile de absorbție caracteristice chitosanului la $1565-1665\text{ cm}^{-1}$, unității glucozaminice la $1395-1450\text{ cm}^{-1}$ și componentei vitaminice, acid ascorbic, respectiv, α -tocoferol, la $3320-3400\text{ cm}^{-1}$.

2. Procedeu de obținere a derivaților de chitosan definiți în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, într-o primă etapă are loc activarea chitosanului la O-carboximetil chitosan, după care, în a doua etapă, o cantitate de 5 % O-carboximetil chitosan s-a suspendat în acetonă, iar în suspensia rezultată s-au adăugat 18 % acid ascorbic, respectiv, 22 % α -tocoferol și s-a picurat 1 % acid sulfuric concentrat cu rol de catalizator, amestecul rezultat s-a agitat mecanic, la 40°C timp de 24 h, rezultând compusul (4), O-carboximetil chitosan-acid ascorbic sau amestecul conținând α -tocoferol s-a încălzit pe baie de apă sub reflux timp de 10 h rezultând compusul (6), O-carboximetilchitosan- α -tocoferol, compușii rezultați fiind separați din amestecul de reacție prin filtrare și purificați prin dializă.

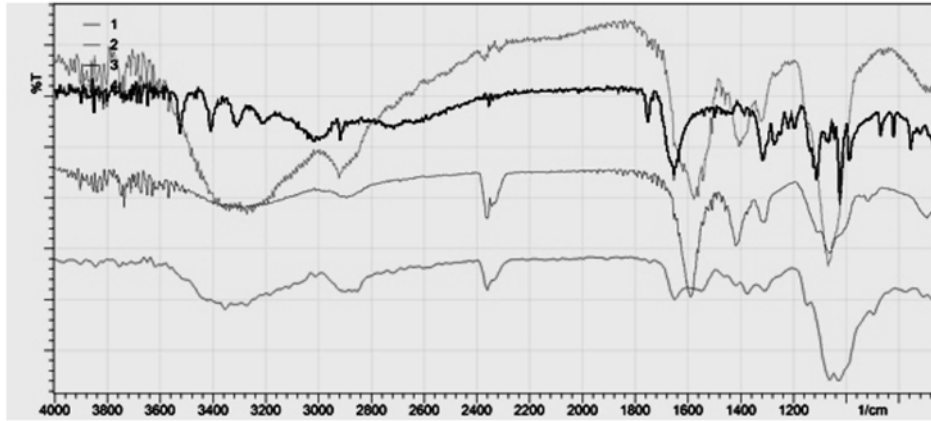


Fig. 1

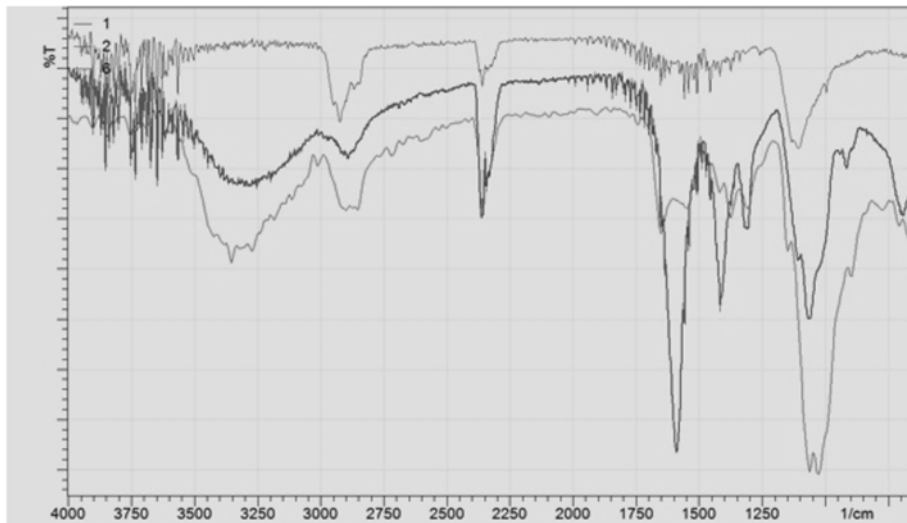


Fig. 2

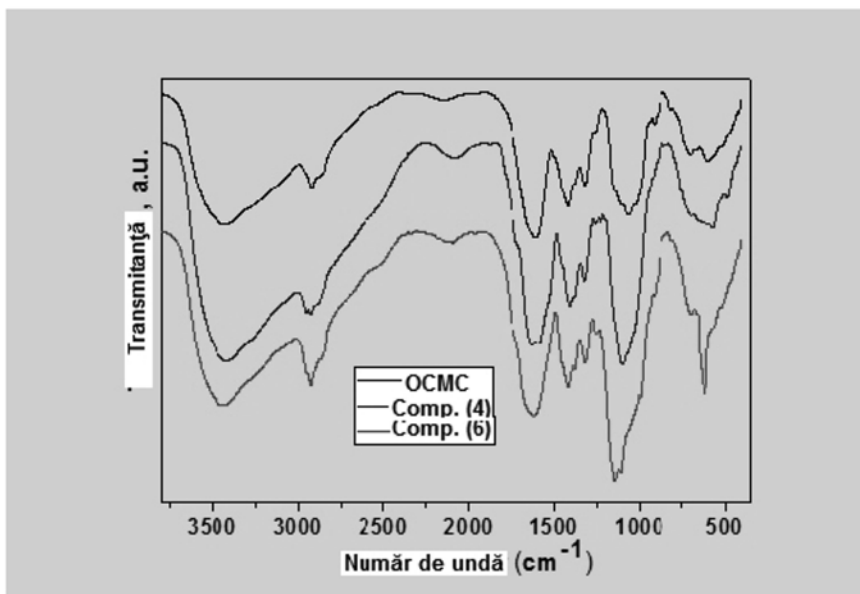


Fig. 3

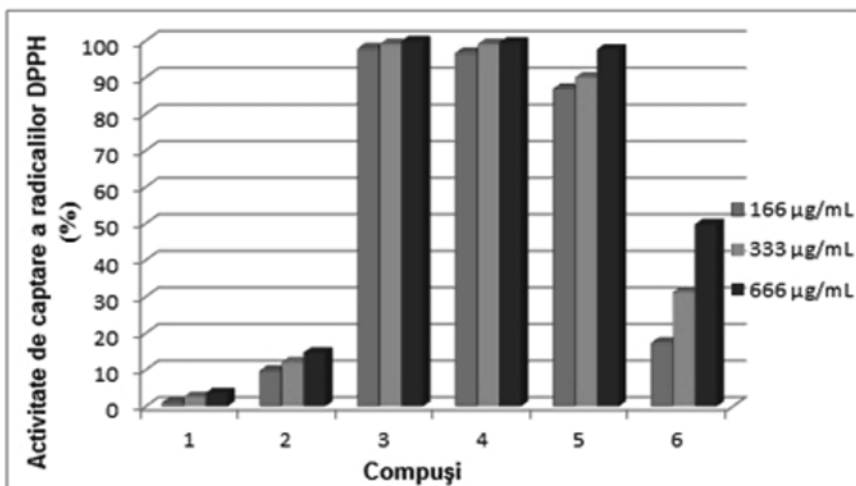


Fig. 4

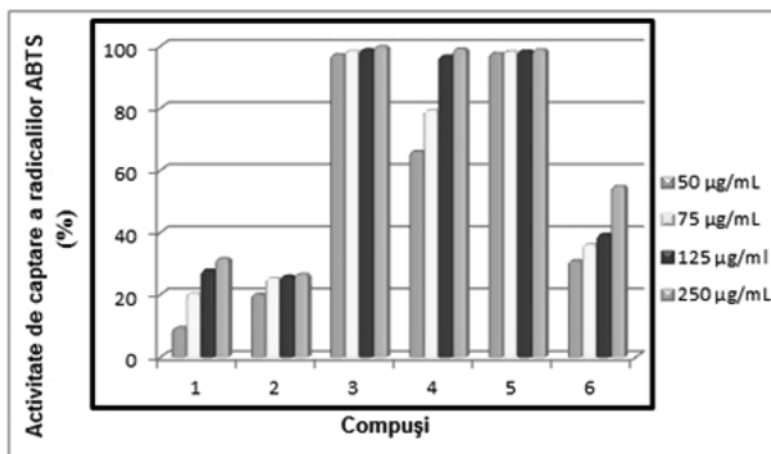


Fig. 5

