



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00178**

(22) Data de depozit: **22/03/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/10/2018 BOPI nr. **10/2018**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **RĂU ILEANA, STR. POIANA CU ALUNI,
NR.3, BL.10, SC.1, AP.22, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **APETROAEI MANUELA ROSSEMARY,
STR. ARTILERIEI, NR.10A, CONSTANȚA,
CT, RO;**
• **SCHRODER VERGINICA,
ALEEA GAROFIȚEI, NR.18, BL.L75B, SC.B,
AP.32, CONSTANȚA, CT, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A CHITOSANULUI CU MASĂ
MOLARĂ MICĂ DIN SURSE MARINE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a chitosanului cu masă molară joasă, utilizat ca agent antimicrobian și antibacterian. Procedeu conform invenției constă în recoltarea capsulelor de ouă ale melcului *R. Venosa*, spălarea pentru îndepărtarea impurităților, urmată de uscare, după care se suspendă capsulele uscate și mărunțite într-o soluție alcalină de NaOH, într-un raport de masă:volum de 1:40, și se menține suspensia sub agitare la o viteză de 500 rpm și la o temperatură de 65...75°C, până la dizolvarea completă a capsulelor, se separă chitosanul prin

centrifugări și spălări succesive cu apă distilată, la temperatura de 64...66°C, până la un pH neutru al supernatantului apei de spălare, precipitatul de chitosan rezultat este supus purificării prin spălare cu un amestec de alcool etilic:acetona și uscării la o temperatură de 60°C, timp de 8...12 h, rezultând chitosan pudră cu o masă molară de 1500...3000 Da și un grad de deacetilare de 73...76%.

Revendicări: 2



Procedeu de obținere a chitosanului cu masă molară mică dintr-o sursă marină

Manuela Rossemary Apetroaei, Ileana Rău, Verginica Schroder

Invenția se referă la procedeu de obținere a unui chitosan de masă molară mică, destinat a fi utilizat ca agent antifouling, cu acțiuni antimicrobiene, dintr-o sursă marină și anume, capsulele de ouă ale melcului *Rapana venosa* (*R. venosa*).

Chitosanul prezintă proprietăți deosebite chimice și biologice, care-l fac utilizabil într-o varietate largă de aplicații industriale și medicale. Aceste caracteristici, cum ar fi: biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, non-toxicitatea și bio aderența îl clasifică ca un produs valoros cu aplicații farmaceutice, medicale, alimentare, textile, tratamentul apelor reziduale și în agricultură.

Chitosanul este un biopolimer care constă din unități de D-glucozamină (80%) și unități de acetyl glucozamină (20%), obținute prin deacetilarea chitinei în prezența soluțiilor concentrate de alcalii.

Termenul de „chitosan” în general corespunde polimerilor cu un conținut în grupări acetyl mai mic de 25%. Produsul deacetyl complet (fig. 1a) este obținut destul de rar, datorită riscurilor apariției reacțiilor secundare și a reacțiilor de rupere a catenei polimerului în timpul procesului de deacetylare. În schimb, sunt disponibili copolimeri cu grade diferite de deacetylare, cunoscuți ca și „chitosani comerciali” (fig. 1b)

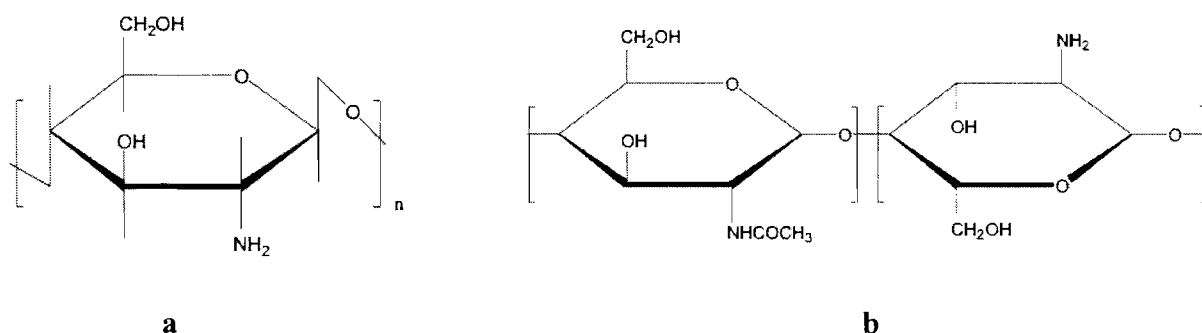


Fig. 1 Structura chimică a chitosanului (a) și a chitosanului comercial (b)

Ca și chitina, chitosanul este un glucan de β (1-4) și a fost descris ca cel mai versatil biomaterial natural, este un polimer biodegradabil, nontoxic cu masă molară mare și asemănător celulozei (fig.2).



Handwritten signature

Handwritten signature

Handwritten signature

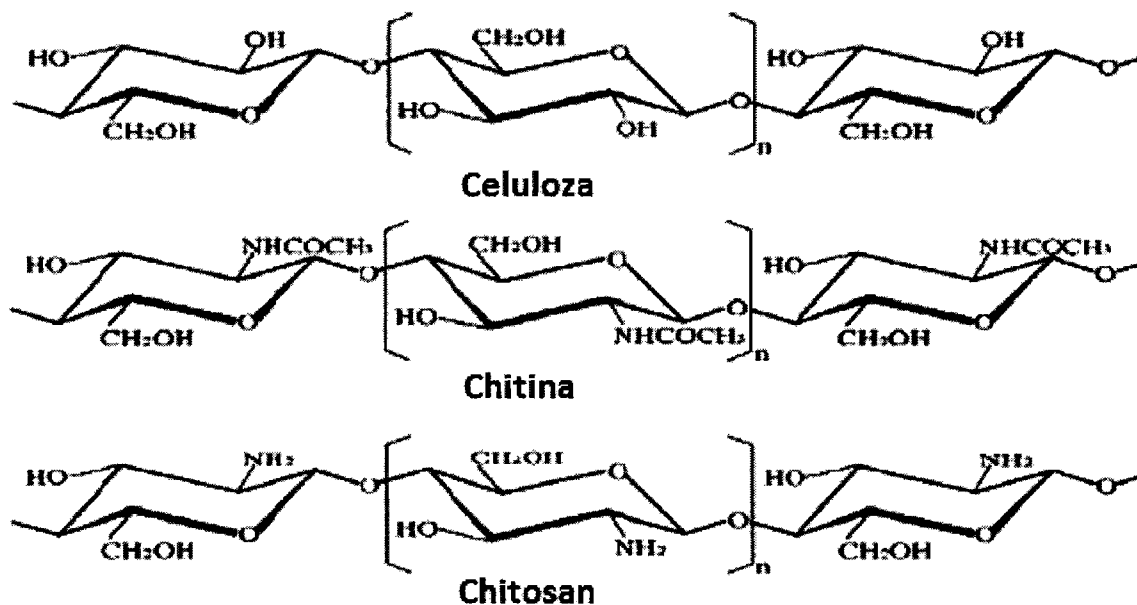


Fig.2 Structura celulozei, chitinei și chitosanului

După cum se observă în figura 2, singura diferență între chitosan și celuloză este gruparea amino ($-NH_2$) din poziția C-2 din formula chitosanului, în locul grupării hidroxil ($-OH$), găsită în formula celulozei.

Chitosanul are trei grupări reactive în fiecare unitate glicozidică a lanțului polimeric: o grupare amino și două grupări hidroxil. Dintre acestea cea mai importantă este gruparea amino, care este responsabilă de natură cationică a biopolimerului și care-i imprimă acestuia anumite caracteristici fizico-chimice, cum ar fi solubilitatea ($pH = 6-6,5$) și proprietățile sale biologice.

Din această cauză, chitosanul prezintă interes ca sursă materială importantă datorită proprietăților sale excelente privind biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, adsorbția, capacitatea de a forma filme, etc.

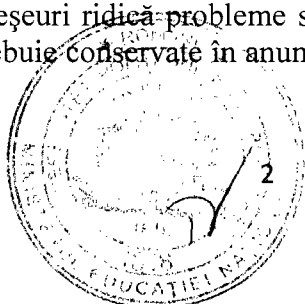
Solubilitatea chitosanului în solvenți acizi anorganici este însă foarte limitată. Astfel, chitosanul este solubil în soluție de 1% HCl, dar insolubil în acid sulfuric și acid fosforic. Solubilitatea soluțiilor de chitosan este slabă la un pH mai mare de 7, datorită precipitării sau gelifierii.

Hidroliza acidă la temperatura camerei sau temperaturi scăzute scindează efectiv legătura glucozidică ale lanțurilor principale de chitină și chitosan, micșorându-le masa molară.

Chitosanul este considerat a fi un material suport atât în organismele marine, cât și în insecte, în crustaceele terestre, în ciuperci sau în anumiți fungi. Valorificarea prin procesare la scară largă a organismelor marine în special în industria alimentară a condus la obținerea unor cantități mari de deșeuri obținute din captura procesată de tip crustacee și midii.

Cercetările efectuate în ultimii patruzeci de ani au arătat că deșeurile de crustacee constituie o sursă bogată de produse cu valoare adăugată, cum ar fi: chitosan, proteine, pigmenți, a căror bioconversie a atras un interes deosebit.

Însă procesarea acestor deșeuri ridică probleme serioase privind protecția mediului, întrucât acestea fiind perisabile trebuie conservate în anumite condiții de temperatură, iar în procesele



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

de extracție a chitosanului se folosesc solvenți acizi și alcalini de diferite concentrații, la temperaturi de procesare destul de ridicate (tabel 1, tabel 2).

Tabel 1 Reactivi chimici utilizați pentru extracția chimică a chitosanului

Nr. crt	Etapa	Reactivii chimici utilizați
1	Demineralizare	HCl, HNO ₃ , CH ₃ COOH, HCOOH
2	Deproteinizare	NaOH, KOH, NaHCO ₃
3	Decolorare	C ₂ H ₅ OH, Acetona, DMSO, H ₂ O ₂ ; NaClO
4	Deacetilare	NaOH, KOH

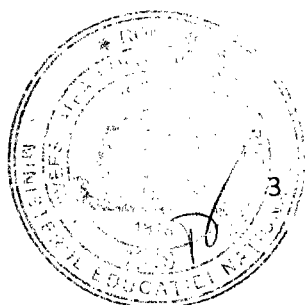
Tabel 2 Etapele extracției chimice a chitosanului din deșeurile de crustacee

Nr. crt	Etapa	Reactivi	Concentrații	Temperatura (°C)	Timp (h)
1	Demineralizare	HCl	0,69-2 M	15-30	0,5-48
2	Deproteinizare	NaOH sau KOH	0,1-3,8 M	25-100	0,5-72
3	Decolorare	C ₂ H ₅ OH, Acetona, NaClO	-	20-30	1-12
4	Deacetilare	NaOH sau KOH	30-60%	60-150	0,5-144

De – a lungul anilor au fost dezvoltate o multitudine de tehnici de extracție a chitosanului extras din deșeurile de crustacee, de tipul crabilor, creveților, lobsterilor, homarilor și a langustelor. Exoscheletul artropodelor conține aproximativ 30-40% proteine, 30-50% carbonat de calciu și 20-30% chitină per masa uscată de probă.

Aceste procente variază cu tipul speciei de crustacee și sezonul de recoltare.

Tehnicile pentru obținerea chitinei și a chitosanului din diversele deșeuri de crustacee stau la baza proceselor chimice utilizate pentru obținerea la scara industrială a chitinei și a derivatelor sale. Fig. 3.



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

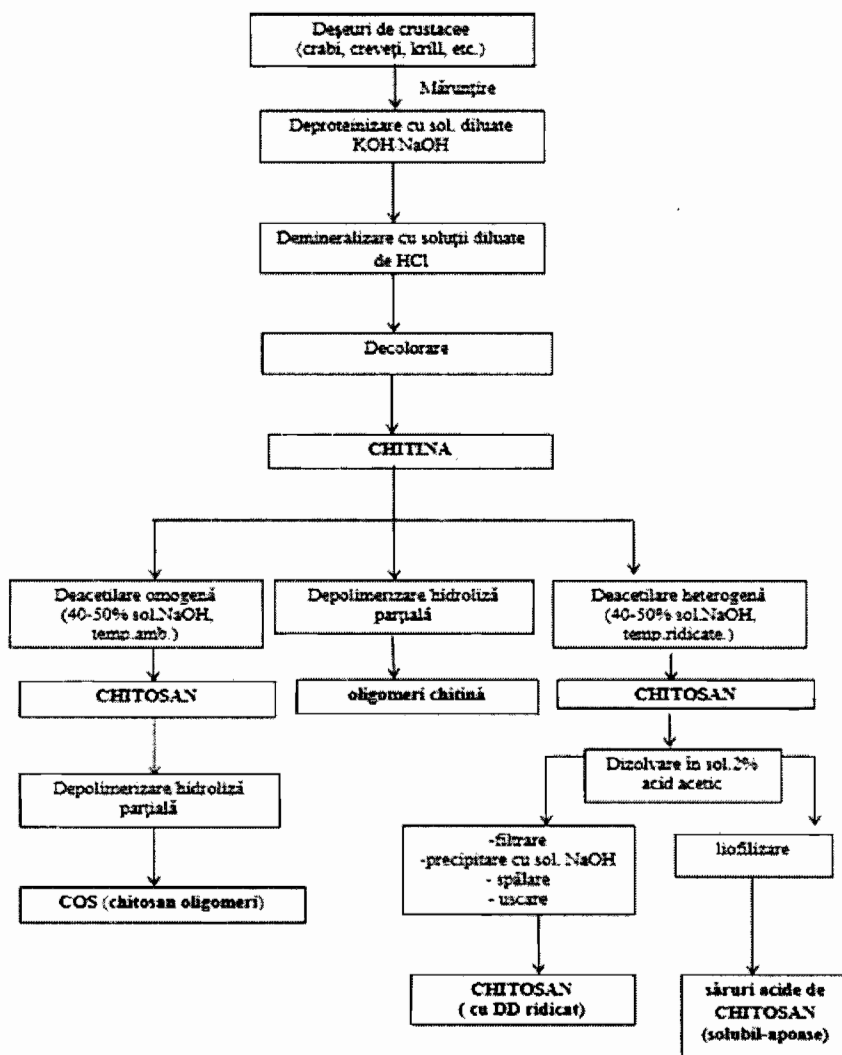
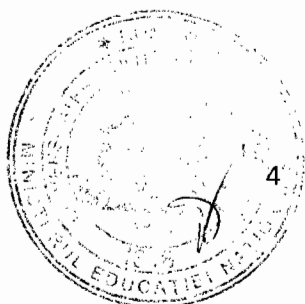


Fig.3 Procedul de prelucrare chimică a chitinei, chitosanului și oligomerilor de chitosan

Este de asemenea cunoscut că procedeul industrial pentru extracția chitinei și a chitosanului din diferitele deșeuri de crustacee, are la baza procese chimice severe datorate existenței legăturilor covalente în compuşii ce alcatuiesc deșeurile de crustacee. Aceste metode generează mari cantități de deșeuri chimice periculoase și pot iniția ca reacții secundare fie hidroliză polimerului, fie o deacetilare parțială a acestuia, conducând spre produși finali cu proprietăți fiziologice necorespunzătoare.

Se cunoaște faptul că procesele chimice de extracție pentru chitină din deșeurile de crustacee efectuate între 1954 și 1993 au fost îmbunătățite și cuprind patru etape (fig.4): demineralizarea, deproteinizarea, decolorarea și deacetilarea.



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

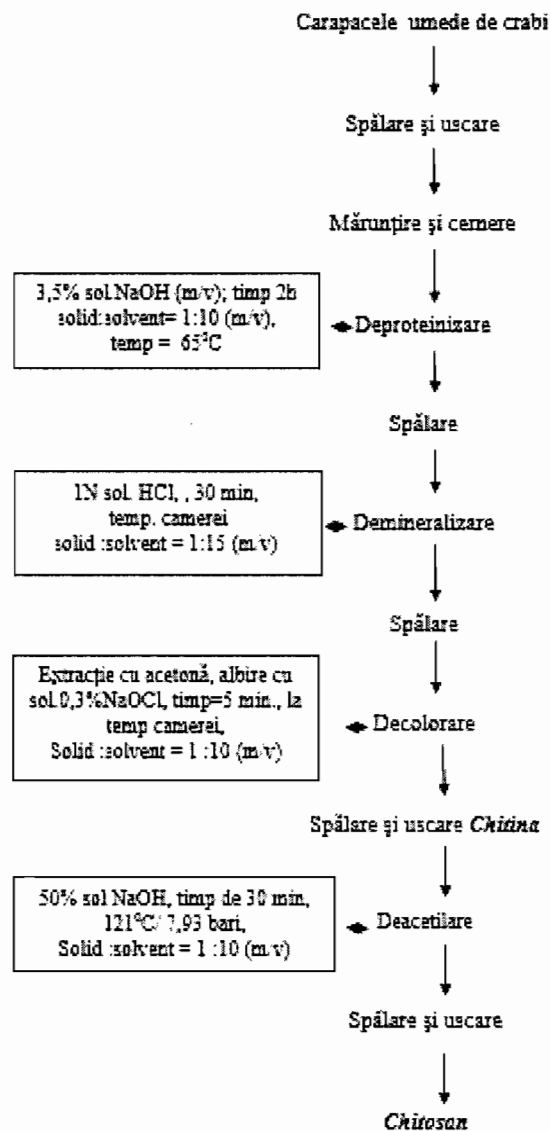
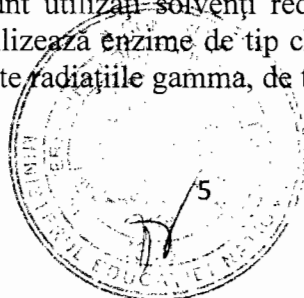


Fig. 4. Schema de obținere a chitosanului din deșeurile de crabi

Totuși, în mod specific, extracția chitinei, constă din numai două etape: demineralizarea și deproteinizarea, care implică dizolvarea carbonatului de calciu cu soluții de HCl, iar îndepărtarea proteinelor se realizează cu soluții de NaOH, ordinea etapelor de demineralizare și de deproteinizare putând fi inversată.

Chitosanul obținut din deșeurile de crustacee este un chitosan cu masă molară medie și mare ($M \sim 250\div 5000$ KDa), cu aplicații limitate. Ca urmare, pentru a-i îmbunătăți acțiunea se recomandă a fi prelucrat pentru obținerea unui chitosan cu masă molară mică sau oligomeri, utilizând una din cele trei depolimerizări: chimică, enzimatică sau fizică.

În depolimerizarea chimică sunt utilizați solvenți reducători de tip HCl, HNO_2 sau H_2O_2 , depolimerizarea enzimatică utilizează enzime de tip chitinaze sau chitosanaze, iar cea fizică utilizează cu randamente scăzute, radiațiile gamma, de tip Co-60.



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Există diverse brevete de invenție, ca de exemplu, US 2040879, US 4833237 în care sunt descrise tehnicile de obținere a chitosanului prin extracție chimică din deșeurile de crustacee marine prin folosirea reactivilor chimici de diferite concentrații și cu timpi îndelungați de procesare.

Brevetul de invenție japonez JP 184002 descrie metoda de obținere a chitosanului solubil apos, cu masă molară mică prin suspendarea pudrei de chitosan în apă, adăugarea de nitrit de sodiu și apoi de acid acetic suspensiei pentru a - i scădea pH ul la 5, printr-un tratament termic variat (5-70°C).

Problema tehnică pe care o rezolva această invenție este găsirea unei noi surse marine de chitosan, nepoluantă, a cărei prelucrare să nu necesite tratamente chimice dăunătoare mediului, cu timpi de procesare scăzuți, iar chitosanul obținut prin acest nou procedeu să se încadreze prin morfologia și structura sa chimică în categoria chitosanului cu masă molară mică, cu aplicații medicale și industriale.

Prezenta invenție propune un procedeu nou de extracție chimică a chitosanului, utilizând o sursă marină, neexploată, și anume capsulele de ouă ale gasteropodului *R. venosa*. Acest procedeu constă într-o singură etapă, și anume, eliminarea proteinelor și lipidelor ce alcătuiesc pereții capsulari ai ouălelor, prin utilizarea unor soluții diluate de alcalii (NaOH sau KOH) cu timpi reduși de extracție, iar separarea chitosanului din suspensia alcalină se realizează prin centrifugare, înlocuind filtrarea din metodele cunoscute.

Procedeul conform invenției prezintă ca avantaje:

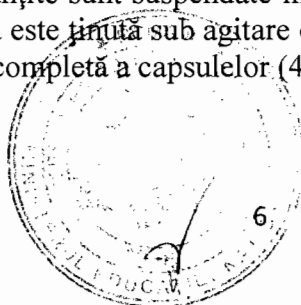
- folosirea organismelor marine ca materie primă pentru obținerea chitosanului,
- utilizarea unei noi surse marine de extracție, nepoluantă, care poate fi obținută fie prin pescuit, odată cu capturarea melcilor de *R. venosa*, fie prin acvacultură, această sursă neafecând mediul prin perisabilitatea ei.
- reactivii folosiți în timpul procesului sunt mai puțini și de concentrații mici, cu timpi de procesare reduși,
- obținerea unui randament bun în chitosan, prin înlocuirea filtrării cu centrifugarea în procesul de separare al chitosanului prin deproteinizare,
- chitosanul obținut este cu masă molară mică, cunoscut în literatura de specialitate cu o activitate mărită animicrobiană, des utilizat în aplicațiile medicale și ale bioingenieriei.

Un interes deosebit din punct de vedere al sursei marine de chitosan, neexploată până acum, îl reprezintă capsulele de ouă ale melcului de *R. venosa*, un gasteropod invadator, introdus accidental, în secolul trecut, în apele bazinului Marii Negre. și care în timp, adaptându-se la noile condiții a devenit indezirabil pentru populațiile de midii, din bazinul pontic.

Procedeul propus pentru obținerea unui chitosan cu masă molară joasă, constă în curățarea capsulelor de ouă ale *R. venosa* de impurități (praf, nisip, cochilii de balanus, cochilii scoici) prin spălare, uscare și mărunțire. Foarte importantă în pregătirea materiei prime este curățarea capsulelor de conținutul de ouă din interior.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a procedurii, conform invenției, în legătură cu figura 5, care reprezintă schema procedurii de obținere a chitosanului:

Capsulele curățate și mărunțite sunt suspendate într-o soluție diluată (4 - 6 %) de NaOH, iar suspensia alcalină obținută este ținută sub agitare continuă (300-600 rpm) la temperatura (65-75 °C) până la dizolvarea completă a capsulelor (4-10 ore).



Suspensia obținută este centrifugată la rotații cuprinse între 5000-11000 rpm, în vederea separării chitosanului sub formă de precipitat de supernatantul alcalin încărcat cu lipidele și proteinele ce au alcătuit pereții capsulari.

Pentru o mai bună separare a chitosanului, se îndepărtează supernatantul, prin centrifugări repetate și spălări successive ale turtei de chitosan cu apă distilată până la obținerea unui pH neutru al supernatantului suspensiei de spălare

Precipitatul de chitosan obținut după îndepărtarea supernatantului apos cu pH neutru, este supus spălării și centrifugării cu un amestec de acetona: alcool etilic, în raport volumetric = 1: 1, în vederea purificării, a îndepărtării urmelor de lipide “agățate” de chitosanul extras.

Precipitatul umed de chitosan este uscat în etuvă, timp de 8-12 ore, la temperatura de 60°C.

Identificarea și caracterizarea chitosanului extras chimic din capsulele de ouă s-au realizat prin microscopie cu epifluorescență și metode spectrale, de tip UV – VIS – NIR și FTIR – ATR.

Rezultatele obținute prin analizele spectrale de microscopie cu epifluorescență confirmă structura chitosanului, conform invenției. Observațiile de microscopie s-au efectuat cu microscopul OPTIKA B 350.

Analizele spectrale de tip UV – VIS – NIR au fost efectuate cu spectrofotometrul JASCO, model V 670, spectrele UV – VIS au fost înregistrate în domeniul 200-2000 nm, cu o rezoluție de 0,5 nm.

Pentru analizele spectrale în IR s-a utilizat un spectrofotometru Perkin-Elmer 100 FT/IR echipat cu ATR, spectrele IR ale probelor solide analizate au fost înregistrate în domeniul 4000 cm^{-1} și 600 cm^{-1} , cu o rezoluție de 4 cm^{-1} și acumulare de 32 de scanări, la temperatura camerei.

Caracterizarea chitosanului obținut prin procedeul conform invenției s-a realizat prin:

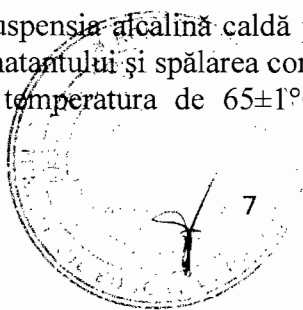
- determinarea masei molare, cu ajutorul unui viscosimetru capilar, de tip Ubbelohde, prin determinarea viscozității intrinseci a soluțiilor slab acide de chitosan;
- determinarea gradului de deacetilare (DDA), utilizând un pH metru ORION STAR 215, prin titrarea potențiometrică a soluțiilor slab acide de chitosan cu soluții de NaOH, de concentrații scăzute;
- cenușa,
- gradul de absorbție al grăsimii și gradul de absorbție al apei, utilizând Vortex VELP TX 4 (800 – 3000 rpm) și microcentrifuga Nahita (4000-7000-11000 rpm)

Se recoltează capsulele de oua ale *R. venosa*, se spală cu apa de pH= 7, până la îndepărtarea impurităților (nisip, cochilii de scoici și balanus) și uscarea în etuvă la 45-50 °C, timp de 12 ore.

Se cântăresc 10 g de capsule de ouă curățate și uscate, care se mărunțesc prin tăiere la dimensiuni mici, se îndepărtează ouăle din interiorul lor și se suspend într-un volum de 400 mL soluție de NaOH de concentrație $c = 6\%$, pentru deproteinizare.

Se deproteinizează capsule pe o plită electrică, la temperatura de $75 \pm 1^\circ\text{C}$, sub agitare continuă a suspensiei (500 rpm), timp de 6 ore, până la dizolvarea completă a capsulelor.

Se separă chitosanul din suspensia alcalină caldă prin centrifugare, inițial la viteze de 5000 rpm, cu îndepărtarea supernatantului și spălarea continuă a precipitatului obținut (chitosan) cu apă distilată încălzită, la temperatura de $65 \pm 1^\circ\text{C}$ până la obținerea unui pH neutru al supernatantului de spălare;



Chitosanul obținut este curățat de impurități (resturi de lipide) prin spălare cu un amestec de acetonă: alcool etilic, în raport volumetric de = 1: 1 și într-un raport de masă: volum = 1: 10, centrifugat la viteze de 7000÷11.000 rpm, supernatantul este îndepărtat, iar precipitatul de chitosan este uscat în etuvă la 60 °C, timp de 8 ÷ 12 ore.

După uscare, chitosanul obținut este triturat într-un mojar cu pistil, cântărit și depozitat în recipiente adecvate. Au rezultat 1,22 g de chitosan cu un randament de 12,2% față de cantitatea de capsule supuse procesării.

Pentru prelucrare, chitosanul este dizolvat fie în soluție de acid acetic 2 % (cu 0,1 M KCl), fie în soluții foarte diluate de HCl, sub agitare continuă (300 rpm), timp de 24 ore, la 45±5°C. Soluțiile obținute, de diferite concentrații sunt filtrate pentru îndepărtarea eventualelor impurități insolubile și stocate pentru diverse aplicații

Dovedirea structurii chitosanului, conform invenției s-a efectuat prin:

- *Analiza biologică:*

Chitosanul pudră obținut prin extracție chimică din capsulele de ouă *R. venosa* în soluții diluate alcaline a fost analizat cu ajutorul microscopului cu epifluorescență, unde s-au observat că acesta emitea fluorescențe de culoare galben-verzuie (420÷450 nm), caracteristice emisiilor de fluorescență ale chitosanului.

- *Analiza spectrală de tip UV – VIS – NIR*

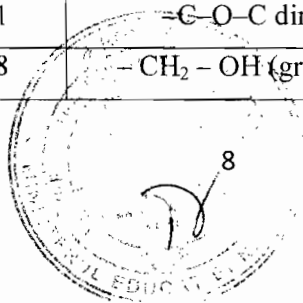
Confirmarea chitosanului s-a bazat prin identificarea grupărilor caracteristice ale acestuia prin cele două vârfuri caracteristice de absorbție de la 218 nm și respectiv, 270 nm din spectrele înregistrate.

- *Analiza spectrală de tip FTIR – ATR:*

Principalele benzi caracteristice ale chitosanului extras chimic prin această invenție sunt redate în tabelul 3

Tabel 3 Distribuția semnalelor FTIR

Nr. crt	Numar de undă (cm ⁻¹)	Distribuțiile
1	3386	Vibrația de întindere a N – H din grupările libere amino (ν _{NH2})
2	3287	
3	2946	(ν _{C-H}) din – CH ₂
4	2884	(ν _{C-H}) din – CH ₃
5	1656	ν _{C=O} a Amidei I
6	-	δ _{N-H} (reziduuri acetilate N-din banda II amida)
7	1428	-OH a grupării alcoolice primare
8	1370	vibrațiile O – H și C – H din inelul gucozidic
9	1316	
10	1161	-C-O-C din legătura glucozidică
11	1028	-CH ₂ -OH (gruparea alcoolică primară)



Handwritten signature.

Handwritten signature: Răi h

Chitosanul obținut prin procedeul care face obiectul acestei invenții se caracterizează prin:

- Masă molară cuprinsa între 1500 și 3000 Da
- Grad de deacetilare (DDA) cuprins între 74 și 76 %
- Cenușă 1%
- Grad de absorbție a grăsimii >320 %
- Grad de absorbție a apei >500%

Compusul obținut prin procedeul care face obiectul acestei invenții este biocompatibil, biodegradabil și nepoluant mediului înconjurător, prezintă activitate antimicrobiană și antibacteriană motiv pentru care poate fi utilizat în tratarea apelor de balast din industria maritimă – navală, iar supernatantul rezultat, prin conținutul ridicat în proteine poate avea utilizări în acvacultură și în agricultură.

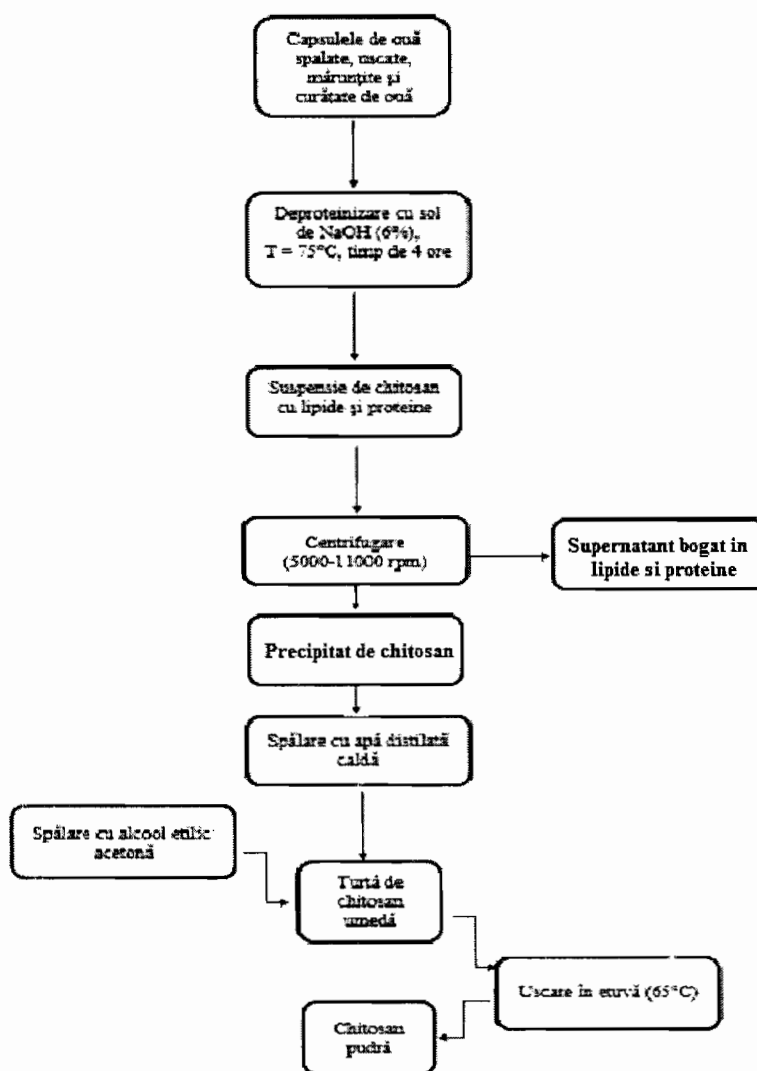
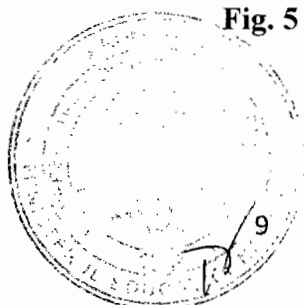


Fig. 5



Răzvan Răzvan

Revendicări

1. Procedeul de obținere a chitosanului sau poli D-glucozaminei cu masă molară mică, caracterizat prin aceea că se recoltează capsulele de ouă ale melcului de *R. Venosa*, se spală cu apă pentru îndepărtarea impurităților și se usucă în etuvă, după care se suspendă capsulele uscate și mărunțite într-o soluție alcalină de NaOH, în raport de masă: volum = 1: 40 și se menține suspensia sub agitare la o viteză de 500 rpm și o temperatură de 65÷75°C, până la dizolvarea completă a capsulelor de ouă, se separă chitosanul din suspensia alcalină prin centrifugări și spălări succesive cu apă distilată încălzită până la obținerea unui pH neutru în supernatantul apei de spălare, chitosanul obținut este supus purificării prin spălare cu un amestec de alcool etilic: acetona în raport volumetric 1: 1 și se usucă în etuvă.
2. Procedeul conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că chitosanul obținut are masă molară cuprinsă între 1500 și 3000 Da și grad de deacetilare cuprins între 74÷76%, cu utilizare ca agent antimicrobian și antibacterian.

