



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2022** BOPI nr. **5/2022**

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

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
JPH 0629281 B2

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



RO 132848 B1

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

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

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

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

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

 După cum se observă în fig. 2, singura diferență între chitosan și celuloză este
21 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:
23 o grupare amino și două grupări hidroxil. Dintre acestea cea mai importantă este gruparea
25 amino, care este responsabilă de natura cationică a biopolimerului și care-i imprimă acestuia
anumite caracteristici fizico-chimice, cum ar fi solubilitatea ($pH = 6-6,5$) și proprietățile sale
27 biologice.

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

 Solubilitatea chitosanului în solvenți acizi anorganici este însă foarte limitată. Astfel,
31 chitosanul este solubil în soluție de 1% HCl, dar insolubil în acid sulfuric și acid fosforic.
33 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
35 legătura glucozidică ale lanțurilor principale de chitină și chitosan, micșorându-le masa
37 molară.

 Chitosanul este considerat a fi un material suport atât în organismele marine, cât și
39 în insecte, în crustaceele terestre, în ciuperci sau în anumite fungi. Valorificarea prin proce-
sare la scară largă a organismelor marine în special în industria alimentară a condus la obți-
41 nerea 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
43 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,
45 întrucât acestea fiind perisabile trebuie conservate în anumite condiții de temperatură, iar în
47 procesele de extracție a chitosanului se folosesc solvenți acizi și alcalini de diferite
concentrații, la temperaturi de procesare destul de ridicate (tabelul 1, tabelul 2).

RO 132848 B1

Reactivi chimici utilizați pentru extracția chimică a chitosanului

Tabelul 1

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

Etapele extracției chimice a chitosanului din deșeurile de crustacee

Tabelul 2

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.

Tehnicele pentru obținerea chitinei și a chitosanului din diversele deșeuri de crustacee stau la baza proceselor chimice utilizate pentru obținerea la scară industrială a chitinei și a derivatelor sale, fig. 3.

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 compoziții ce alcătuiesc deșeurile de crustacee. Aceste metode generează mari cantități de deșeuri chimice periculoase și pot iniția ca reacții secundare fie hidroliza 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.

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.

RO 132848 B1

1 În depolimerizarea chimică sunt utilizați solvenți reducători de tip HCl, HNO₂ sau
2 H₂O₂, depolimerizarea enzimatică utilizează enzime de tip chitinaze sau chitosanaze, iar cea
3 fizică utilizează cu randamente scăzute radiațiile gamma, de tip Co-60.

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

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

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

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

23 Procedeu conform invenției prezintă ca avantaje:

24 - folosirea organismelor marine ca materie primă pentru obținerea chitosanului;
25 - utilizarea unei noi surse marine de extracție, nepoluantă, care poate fi obținută fie
26 prin pescuit, odată cu capturarea melcilor de *R. venosa*, fie prin acvacultură, această sursă
27 neafectând mediul prin perisabilitatea ei;

28 - reactivii folosiți în timpul procesului sunt mai puțini și de concentrații mici, cu timpi
29 de procesare reduși;

30 - obținerea unui randament bun în chitosan, prin înlocuirea filtrării cu centrifugarea
31 în procesul de separare al chitosanului prin deproteinizare;

32 - chitosanul obținut este cu masă molară mică, cunoscut în literatura de specialitate
33 cu o activitate mărită antimicrobiană, des utilizat în aplicațiile medicale și ale bioingineriei.

34 Un interes deosebit din punct de vedere al sursei marine de chitosan, neexploatăată
35 până acum, îl reprezintă capsulele de ouă ale melcului de *R. venosa*, un gasteropod inva-
36 dator, introdus accidental, în secolul trecut, în apele bazinului Mării Negre, și care în timp,
37 adaptându-se la noile condiții a devenit indizirabil pentru populațiile de midii, din bazinul
38 pontic.

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

43 Se dă în continuare un exemplu de realizare a procedurii, conform invenției, în
44 legătură cu fig. 5, care reprezintă schema procedurii de obținere a chitosanului.

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

RO 132848 B1

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.	1 3
Pentru o mai bună separare a chitosanului, se îndepărtează supernatantul, prin centrifugări repetate și spălări succesive ale turtei de chitosan cu apă distilată până la obținerea unui pH neutru al supernatantului suspensiei de spălare.	5
Precipitatul de chitosan obținut după îndepărtarea supernatantului apos cu pH neutru, este supus spălării și centrifugării cu un amestec de acetonă: alcool etilic, în raport volumetric = 1:1, în vederea purificării, a îndepărtării urmelor de lipide "agățate" de chitosanul extras.	7 9
Precipitatul umed de chitosan este uscat în etuvă, timp de 8-12 h, la temperatura de 65°C.	11
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.	13 15
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.	17
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.	19 21
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.	23 25
Caracterizarea chitosanului obținut prin procedeul conform invenției s-a realizat prin:	
- determinarea masei molare, cu ajutorul unui vâscozimetru capilar, de tip Ubbelohde, prin determinarea vâscozității intrinseci a soluțiilor slab acide de chitosan;	27
- determinarea gradului de deacetilare (DDA), utilizând un pH metru ORION STAR 215, prin titrarea potențiomtrică a soluțiilor slab acide de chitosan cu soluții de NaOH, de concentrații scăzute;	29 31
- 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).	33
Se recoltează capsulele de oua ale <i>R. venosa</i> , se spală cu apă de pH = 7, până la îndepărtarea impurităților (nisip, cochilii de scoici și balanus) și uscarea în etuvă la 45-50°C, timp de 12 h.	35 37
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.	39
Se deproteinizează capsule pe o plită electrică, la temperatura de 75 ± 1°C, sub agitare continuă a suspensiei (500 rpm), timp de 6 h, până la dizolvarea completă a capsulelor.	41 43
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 ± 1°C până la obținerea unui pH neutru al supernatantului de spălare.	45 47

RO 132848 B1

1 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
3 masă:volum = 1:10, centrifugat la viteze de 7000÷11000 rpm, supernatantul este îndepărtat,
iar precipitatul de chitosan este uscat în etuvă la 65°C, timp de 8÷12 h.

5 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%
7 față de cantitatea de capsule supuse procesării.

Pentru prelucrare, chitosanul este dizolvat fie în soluție de acid acetic 2% (cu
9 0,1 M KCl), fie în soluții foarte diluate de HCl, sub agitare continuă (300 rpm), timp de 24 h,
la 45 ± 5°C. Soluțiile obținute, de diferite concentrații sunt filtrate pentru îndepărtarea
11 eventualelor impurități insolubile și stocate pentru diverse aplicații

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

13 *Analiza biologică*

Chitosanul pudră obținut prin extracție chimică din capsulele de ouă *R. venosa* în
15 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), carac-
17 teristice emisiilor de fluorescență ale chitosanului.

19 *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
21 din spectrele înregistrate.

23 *Analiza spectrală de tip FTIR-ATR*

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

25 *Distribuția semnalelor FTIR*

27 *Tabelul 3*

Nr. crt.	Număr 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 amidă)
7	1428	-OH a grupării alcoolice primare
8	1370	vibrațiile O-H și C-H din inelul glucozidic
9	1316	
10	1161	-C-O-C din legătura glucozidică
11	1028	-CH ₂ -OH (gruparea alcoolică primară)

RO 132848 B1

Chitosanul obținut prin această invenție se caracterizează prin:	1
- masă molară cuprinsă între 1500 și 3000 Da;	
- grad de deacetilare (DDA) cuprins între 74 și 76%;	3
- vâscozitate;	
- cenușă 1%;	5
- grad de absorbție a grăsimii > 320%;	
- grad de absorbție a apei > 500%.	7
Compusul obținut prin această invenție prezintă activitate antimicrobiană și antibacteriană cu utilizări în acvacultură, în agricultură, în tratarea apelor de balast din industria maritimă - navală, fiind biocompatibil, biodegradabil și nepoluant mediului înconjurător.	9

RO 132848 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu 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:acetonă în raport volumetric 1:1 și se usucă în etuvă.

5

7

9

11

13

2. Chitosan obținut prin procedeul conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, are o masă molară cuprinsă între 1500 și 3000 Da și un grad de deacetilare cuprins între 74 și 76%.

15

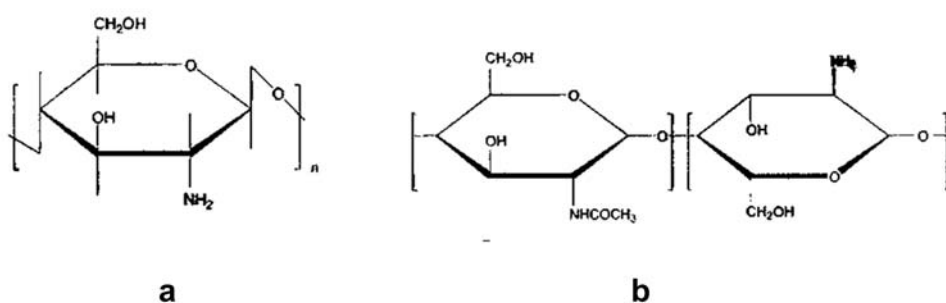


Fig. 1

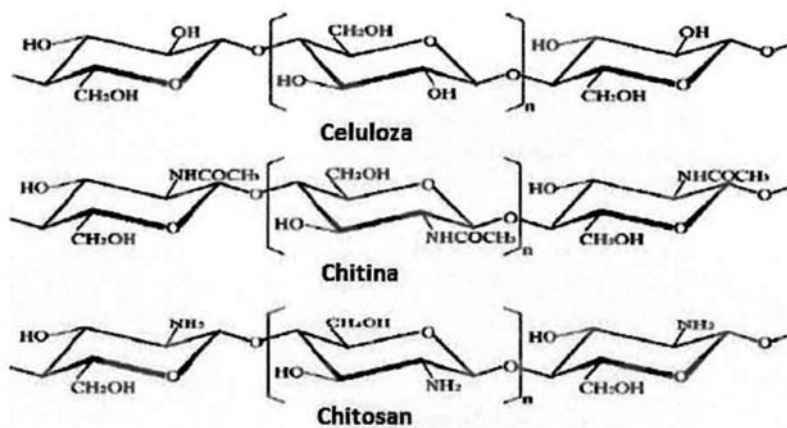


Fig. 2

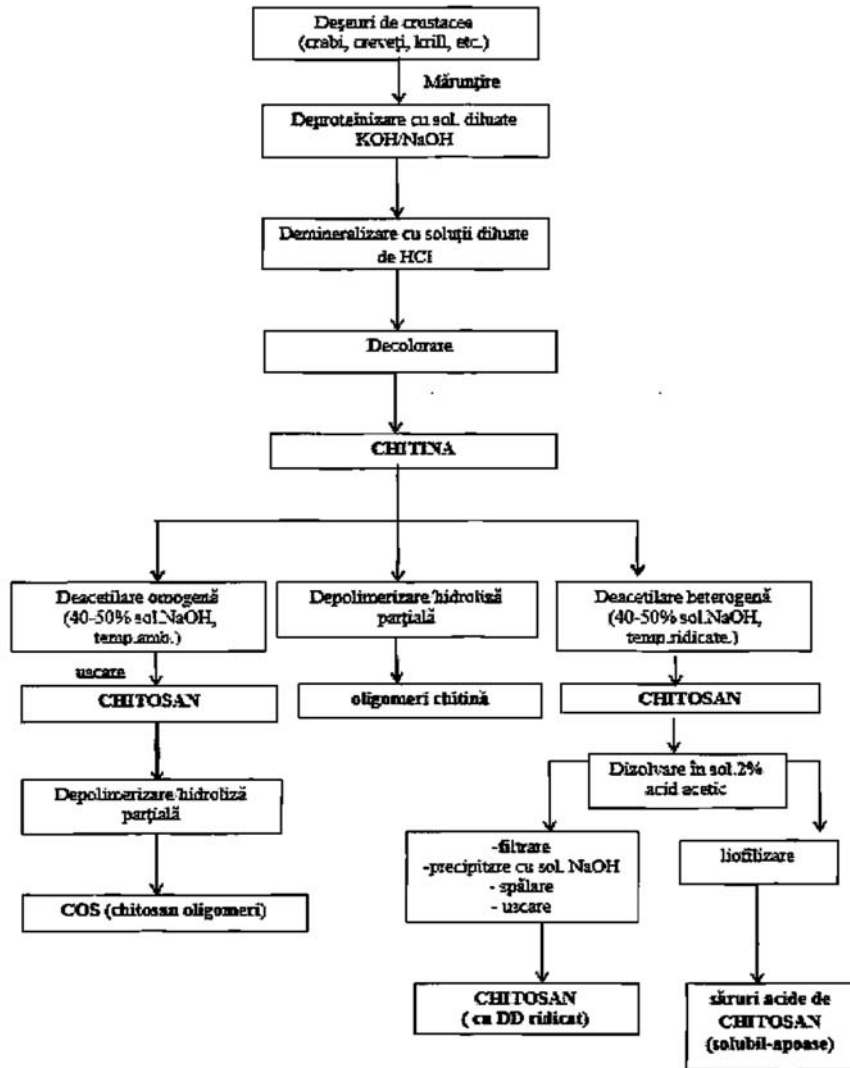


Fig. 3

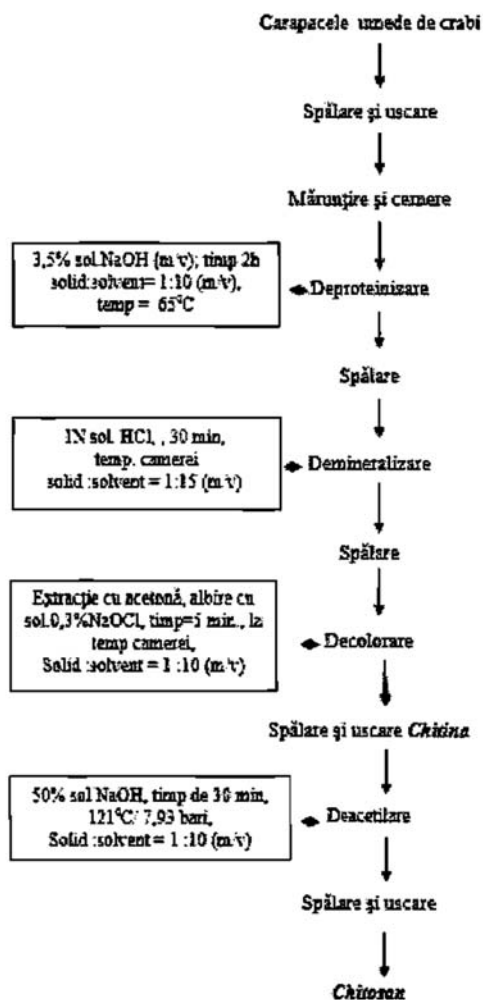


Fig. 4

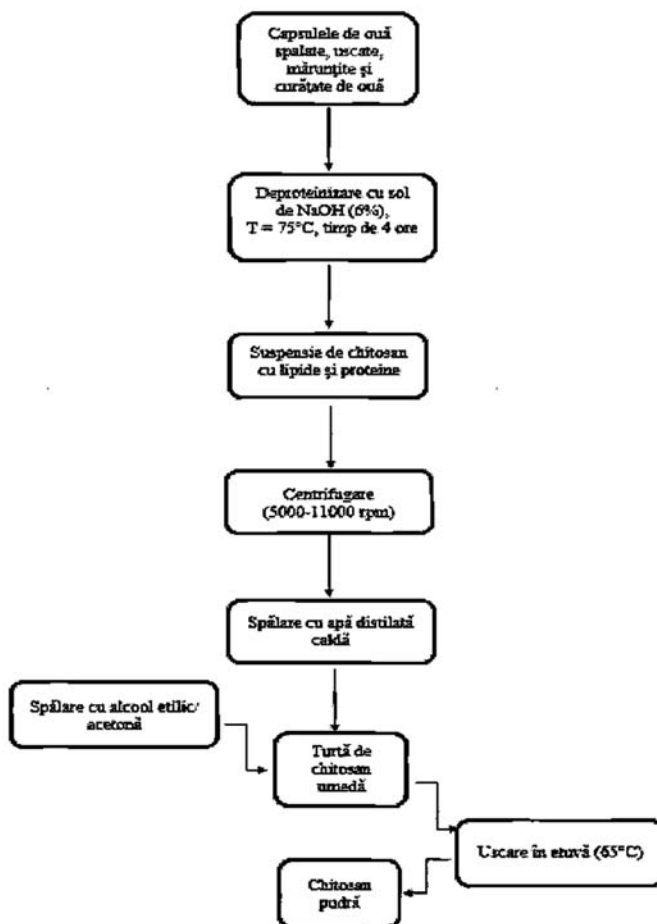


Fig. 5

