



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00072**

(22) Data de depozit: **16/02/2022**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2022** BOPI nr. **6/2022**

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

(72) Inventatori:  
• **RĂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI, NR.3,  
BL.52, SC.1, PARTER, AP.2, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **POPA ELISABETA ELENA,  
ȘOS. VERGULUI NR. 19, BL. H4, SC. 1,  
ET. 3, AP. 13, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **BERBECARU ANDREI CONSTANTIN,  
STR.GLĂDIȚEI NR.42, BL.T7, SC.1, ET.1,  
AP.105, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MATEI ECATERINA,  
BD.CONSTRUCTORILOR NR.3, BL.G3,  
SC.B, ET.2, AP.30, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PREDEȘCU ANDRA MIHAELA,  
STR.GLĂDIȚEI NR.42, BL.T7, ET.13,  
AP.1304, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PREDEȘCU CRISTIAN, STR. DR. PETRE  
GĂDESCU NR. 24A, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **POPESCU PAUL ALEXANDRU,  
STR.SERGEANT MAJOR CARA ANGHEL,  
NR.15, BL.C49, SC.A, ET.3, AP.24,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **MITELUT AMALIA CARMEN, STR.1848,  
NR.14C, AP.1, SAT DOBROEȘTI,  
COMUNA DOBROEȘTI, IF, RO;**  
• **POPA MONA ELENA, ȘOS. VERGULUI  
NR. 19, BL. H4, SC. 1, ET. 3, AP. 13,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE PHBV/PCL ȘI NANOEMULSIE  
DE NIZINĂ ȘI ULEI ESENȚIAL DE MĂRAR ȘI PROCEDEU  
DE OBTINERE A ACESTEIA**

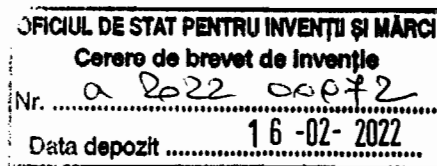
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție pe bază de nanoemulsie de nizină și ulei esențial de mărar înglobată în soluție APV pentru acoperirea unui film de PHBV/PCL utilizată pentru realizarea ambalajelor alimentare biodegradabile, antimicrobiene și antifungice, și la un procedeu pentru realizarea acesteia. Compoziția conform invenției este un amestec din următoarele elemente exprimate în procente în greutate: 0,082% nizină, 82,07% H<sub>2</sub>O distilată, 1,78% Tween 80, 1,78% Tween 20 și 14,27% ulei esențial de mărar de concentrație 6 mg/mL. Procedeu conform invenției începe cu obținerea filmului suport de tip PHBV/PCL prin dizolvarea componentelor în diclorometan pe o plită electrică prevăzută cu agitator magnetic timp de 30 min., la temperatura de 60°C și viteza de 400 rot/min., cu raportul între soluții de 1: 1, urmată de turnarea amestecului în cutii Petri la temperatura camerei cu menținere timp de 48, apoi se prepară soluția de 10% APV prin dizolvare în apă distilată, pe o plită electrică cu agitare

la 400 rot/min., timp de 30 min. la o temperatură de 120°C, urmată de prepararea nanoemulsiei de nizină și ulei esențial de mărar prin amestecarea componentelor pe o plită electrică la temperatura camerei, cu viteza de 2000 rot/min., timp de 30 min., după care are loc acoperirea filmului suport de tip PHBV/PCL prin electrofilare coaxială cu nanoemulsia de nizină și ulei esențial de mărar încapsulată în soluția de 10% APV, în următoarele condiții: debitul soluției de APV cuprins între 4...5 mL/h, debitul nanoemulsiei de nizină și ulei esențial de mărar cuprins între 0,8...1,0 mL/h, tensiunea cuprinsă între + 21,63...22,64 kV, distanța dintre vârful de ac și colector de 14 cm, la o temperatură cuprinsă între 27...30,2°C și o umiditate relativă cuprinsă între 27...28%.

Revendicări: 2  
Figuri: 1





## COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE PHBV/PCL ȘI NANOEMULSIE DE NIZINĂ ȘI ULEI ESEȚIAL DE MĂRAR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

### DESCRIEREA INVENTIEI

Piața ambalajelor alimentare este constituită din caserole, filme de acoperire, etc. realizate din polimeri convenționali (de exemplu polietilena, polistiren, polipropilena, polietilentereftalat). Deși aceste materiale plastice tradiționale prezintă proprietăți fizico-mecanice și de barieră adecvate ambalajelor alimentare, acestea nu sunt biodegradabile, prezintă emisii toxice, și, în plus, pot constitui o sursă pentru dezvoltarea bacteriilor, punând în pericol sănătatea consumatorilor.

În prezent, piața ambalajelor alimentare este într-o continuă creștere ținând cont de cerințele mediului înconjurător și ale consumatorilor privind sustenabilitatea și creșterea duratei de viață a alimentelor depozitate. Dezvoltarea ambalajelor alimentare biodegradabile va conduce la beneficii substanțiale pentru mediul înconjurător în ceea ce privește nivelul de CO<sub>2</sub> și reducerea cantității ambalajelor depozitate. Aceste cerințe se pot îndeplini prin dezvoltarea materialelor biodegradabile și antimicrobiene și a tehnologiilor noi, emergente.

Biopolimerii obținuți din diferite resurse naturale sunt considerați o alternativă atractivă pentru materiale plastice nebiodegradabile pe baza de petrol. Biopolimerii pot fi utilizați ca bariere la gaz pentru obținerea unor tipuri de ambalaje alimentare care să prezinte o extindere a termenului de valabilitate.

Polihidroxicanoații (PHAs) sunt polieșteri alifatici produși de bacterii precum *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Halobacterium*, *Rhizobium* având aplicații asemănătoare polimerilor termoplastici (Ivankovic, A.; Zeljko, K.; Talic, S.; Martinovic' Bevanda, A.; Lasic, M. (2017). *Biodegradable packaging in the food industry*, Arch Lebensmittelhyg **68**, 26–38.). Polihidroxi-butirat-co-valerianat (PHBV) este în reprezentant al PHAs. Se cunoaște faptul că PHBV este un poliester fragil iar pentru a înlătura acest inconvenient se preferă amestecuri cu policaprolactona (PCL) în diferite proporții (Dalgic, A. D., Atila, D., Karatas, A., Tezcaner, A., & Keskin, D. (2019). *Diatom shell incorporated PHBV/PCL-pullulan co-electrospun scaffold for bone tissue engineering*. Materials Science and Engineering: C, 100, 735–746. doi:10.1016/j.msec.2019.03.046.).

Biopolimerii sunt excelente matrici polimerice care pot încorpora o mare varietate de aditivi, cum ar fi antioxidanți, agenți antifungici, agenți antimicrobieni, coloranți și alți nutrienți. Adăugarea unui agent antibacterian (conservant natural, uleiuri esențiale) la un materialul de ambalare alimentară poate preveni eficient creșterea microorganismelor pe suprafața alimentelor. Dezvoltarea de materiale active cu proprietăți de îmbunătățire a duratei de valabilitate și a siguranței alimentelor ambalate este în prezent una dintre cele mai provocatoare activități de cercetare. Deteriorarea alimentelor poate fi cauzată de creșterea microbiană pe suprafața produselor alimentare. Filmele de ambalare care posedă proprietăți antimicrobiene pot preveni sau întârzia desfășurarea unor astfel de fenomene. O abordare a problemei aderenței microbiene implică pretratarea suprafeței sensibile cu un agent antimicrobian. Unele materiale, când sunt impregnate cu biocide sau antibiotice, pot rezista la colonizarea bacteriană atâta timp cât sunt eliberați agenții antibacterieni de pe suprafețele lor (Bower, C.K., McGuire, J., & Daeschel, M. . (1996). *The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces*. Trends in Food Science & Technology, 7(5), 152–157. doi:10.1016/0924-2244(96)81255-6). În mod tradițional, agenții antimicrobieni sunt amestecați direct în formulările alimentare inițiale. Adăugarea directă poate conduce la utilizarea unor cantități excesive de agent antimicrobian care poate schimba gustul alimentelor (Uz, M. and Altinkaya, S.A. *Development of mono and multilayer antimicrobial food packaging materials for controlled release of potassium sorbate*. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY 44(10), 2302-2309, 2011). Prin urmare, activitatea antimicrobiană poate fi pierdută rapid din cauza inactivării agenților antimicrobieni de către componentele alimentare sau a diluției sub concentrația activă. Motivul pentru încorporarea agenților antimicrobieni în ambalaj constă în prevenirea alterării și a contaminării alimentelor. Această abordare poate reduce adăugarea de cantități mai mari de agenți antimicrobieni care sunt de obicei încorporați în cea mai mare parte a alimentelor.

O gamă de conservanți chimici a fost utilizată pentru eliberarea agenților antimicrobieni, printre care bacteriocinele și în special nizina sunt cele mai frecvent încorporate în filme (Correa, J.P., Molina, V., Sanchez, M., Kainz, C., Eisenberg, P., Massani, M.B. *Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin*. FOOD PACKAGING AND SHELF LIFE 2017, 11, 31-39). Nizina este o peptidă cationică compusă din 34 de resturi de aminoacizi, având formula chimică  $C_{143}H_{228}N_{42}O_{37}S_7$ . Se folosește în industria alimentară ca bioconservant de mai bine de 50 de ani, este recunoscută ca agent bacteriocid sigur

(ca aditiv alimentar, nisina are numărul E234) pentru a inhiba creșterea unei game largi de bacterii Gram-pozitive. Nizina prezintă dezavantajele unei stabilități slabe și a unei durate scurte a activității antibacteriene (Feng Gong, Junqing Qian, Yan Chen, Shen Yao, Jun Tong, Hui Guo, *Preparation and properties of gum arabic cross-link binding nisin microparticles*, Carbohydrate Polymers, Volume 197, **2018**, Pages 608-613, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.080>).

Alcoolul polivinilic (PVA) a fost folosit de la începutul anilor 1930 la aplicații comerciale și alimentare, fiind un biodegradabil polimer. Fileurile de peste acoperite cu nanofibre pe bază de PVA și nizină au avut o calitate senzorială mai bună decât proba de control (Oner, B., Meral, R., & Ceylan, Z. (2021). *Determination of some quality indices of rainbow trout fillets treated with nisin-loaded polyvinylalcohol-based nanofiber and packed with polyethylene package*. LWT, 149, 111854. doi:10.1016/j.lwt.2021.111854).

Plantele aromatice au capatat un interes larg în industria alimentară datorită componentelor lor active care se găsesc în mod obișnuit în extractele/uleiurile esențiale (EO). Uleiurile esențiale (EO) prezintă un spectru larg al activității antimicrobiene, acționând asupra agenților patogeni și a bacteriilor care alterează alimentele (Gavril, G.L., Wrona, M., Bertella, A., Świeca, M., Râpă, M., Salafranca, J., Nerín, C. *Influence of medicinal and aromatic plants into risk assessment of a new bioactive packaging based on polylactic acid (PLA)*. Food Chem Toxicol, **2019**, 110662.; Ebadi, M.-T., Sefidkon, F., Azizi, M., Ahmadi, N. *Packaging methods and storage duration affect essential oil content and composition of lemon verbena (Lippia citriodora Kunth.)*. Food Science & Nutrition, **2016**, 5(3), 588–595. Doi:10.1002/fsn3.434.; Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Sanches-Silva, A. *Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging*. Current opinion in food science, **2017**, 14, 78-84. Doi: 10.1016/j.cofs.2017.01.012.).

Principalele dezavantaje ale uleiurilor esențiale la interacțiunea cu alimentele sunt legate de volatilitatea lor, degradarea la temperatura de procesare a alimentelor și impactul asupra proprietăților organoleptice ale alimentelor, datorită variabilității compoziției lor. Aceste deficiențe pot fi depășite prin utilizarea nanoemulsiilor (Jin, W., Xu, W., Liang, H., Li, Y., Liu, S., and Li, B. *Nanoemulsions for food: properties, production, characterization, and applications*. Emulsions **2016**, 3, 1–36.; Ahari, H., Naeimabadi, M. *Employing Nanoemulsions in Food Packaging: Shelf Life Enhancement*. Food Eng Rev, **2021**. Doi:10.1007/s12393-021-09282-z.; Espitia, P.J.P., Fuenmayor, C.A., Otoni, C.G. *Nanoemulsions: Synthesis, Characterization, and Application in Bio-Based Active Food Packaging*. Compr Rev Food Sci F., **2019**, 18, 1, 264-285.)

și încapsularea compușilor bioactivi într-o fază uleioasă sau emulgator. Astfel se previne degradarea alimentelor pentru o perioadă lungă de timp din cauza temperaturii, luminii, pH-ului și a condițiilor oxidative în timpul depozitării. Prin urmare, pentru a evita aceste deficiențe în dezvoltarea ambalajelor alimentare, încorporarea sau încapsularea EO în matrici polimerice prin tehnologia de electrofilare este o strategie bună.

Din brevetul **RO125305 (B1)** se cunoaste obtinerea unui nanocompozit polimeric constituit din copolimer etilenă-acetat de vinil, silicat stratificat funcționalizat, agent de compatibilizare și stabilizator și extrudarea acestuia pentru fabricarea unor ambalaje alimentare. Dezavantajul acestui ambalaj consta în faptul că nu se folosesc polimeri biodegradabili și agenți antimicrobieni pentru creșterea duratei de viață a alimentului ambalat.

Se cunosc biocompozite pentru ambalaje alimentare care prezintă activitate antimicrobiană datorită nanoparticulelor de ZnO (Mohsin Abbas, Mieke Buntinx, Wim Deferme and Roos Peeters. *(Bio)polymer/ZnO Nanocomposites for Packaging Applications: A Review of Gas Barrier and Mechanical Properties*. *Nanomaterials* **2019**, 9, 1494; doi:10.3390/nano9101494; C. Vasile, M. Râpă, M. Ștefan, M. Stan, S. Macavei, R. N. Darie-Niță, L. Barbu-Tudoran, D. C. Vodnar, E. E. Popa, R. Ștefan, G. Borodi, M. Brebu, *New PLA/ZnO:Cu/Ag bionanocomposites for food packaging*, *eXPRESS Polymer Letters* Vol.11, No.7, **2017**, 531–544, DOI: 10.3144/expresspolymlett.2017.51). S-au raportat bionanocompozite obținute prin dispersarea nanoparticulelor de ZnO în PHBV prin metoda casting, fără ajutorul agenților de cuplare (Ana M. Díez-Pascual, Angel L. Díez-Vicente. *ZnO-Reinforced Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Bionanocomposites with Antimicrobial Function for Food Packaging*. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 12, 9822-9834, <https://doi.org/10.1021/am502261e>). S-a constatat că nanoparticulele de ZnO acționează eficient ca agenți de nucleare, conducând la creșterea temperaturii de cristalizare și a gradului de cristalinitate al matricii polimerice, reducând în același timp dimensiunea cristalitei. De asemenea, creșterea concentrației de ZnO are ca efect creșterea stabilității termice a formulărilor de uz alimentar deoarece nanofilerul blochează difuzia volativilor generate în timpul procesului de descompunere.

De asemenea, se cunoaste din brevetul **RO132659 (A2)** obținerea de biocompozite polimerice prin amestecarea în topitura, utilizate pentru realizarea unor ambalaje alimentare antimicrobiene rigide sau flexibile, pe baza de acid polilactic, plastifianți, chitosan modificat prin încapsularea uleiului de măceș și aditivi cu efect de îmbunătățire a prelucrabilității, a activității antimicrobiene și a

proprietăților de barieră. Dezavantajul acestor compozitii consta în utilizarea de forțe de forfecare care pot reduce activitatea antimicrobiană a agenților antimicrobieni utilizați. În plus, tehnologia de amestecare în topitura poate duce la aglomerarea nanoparticulelor și în final la deteriorarea proprietăților ambalajelor alimentare. Un alt dezavantaj consta în necesitatea încorporării unor cantități mari de agenți antimicrobieni pentru a-și exercita activitatea antimicrobiană, ceea ce conduce la creșterea migrației în simulanti alimentari.

Electrofilarea este o tehnică nouă, aplicată polimerilor pentru obținerea nano și micro fibrelor. Principiul de funcționare constă în crearea unui câmp electric de înaltă tensiune între soluția de polimer și colectorul metalic pe care aceasta se depune sub formă de fibre. Nanofibrele obținute cu ajutorul electrospinning-ului prezintă proprietăți fizico-chimice îmbunătățite în comparație cu fibrele la nivel macro și, prin urmare, sunt cercetate din ce în ce mai mult pentru utilizarea în noi sisteme de ambalare a alimentelor. Avantajele nanofibrelor constă în raportul mare între suprafață și volum, de 1-3 ordine de mărime mai mare în comparație cu peliculele subțiri realizate din același material (Petropoulou A., Christodoulou K., Polydorou C., et al. (2017). *Cost-effective polymethacrylate-based electrospun fluorescent fibers toward ammonia sensing*. *Macromol Mater Eng*; 302. Doi: 10.1002/mame.201600453.), ceea ce permite o flexibilitate mărită pentru modificarea suprafeței și în faptul că acestea nu conțin solvent. Procesul de electrofilare nu este invaziv și nu necesită utilizarea substanțelor chimice sau a temperaturilor ridicate pentru obținerea de fibre. Prin tehnologia de electrofilare se pot utiliza soluții de polimeri sintetici sau naturali, amestecuri de polimeri, nanoparticule, agenți antimicrobieni, etc. care prezintă o vâscozitate în soluție adecvată pentru obținerea nanofibrelor. Metoda co-electrospinning permite electrofilarea a două distincte soluții polimerice într-o singură structură fibroasă care creează aleatoriu fibre distribuite cu două caracteristici distincte. În acest fel, avantajele care depind de morfologia fiecărei fibre polimerice sunt păstrate, oferind în același timp caracteristici diferite de suprafață. Problema tehnică pe care o rezolva invenția consta în încorporarea agenților antimicrobieni în nanofibre polimerice cu proprietăți de biodegradabilitate și biocompatibilitate, prin tehnologia de electrofilare/electrosprayere.

Din brevetul **RO131883 (B1)** se cunoaște încapsularea uleiurilor esențiale sau uleiuri vegetale de presă, având activitate antibacteriană, antifungică și antioxidantă îmbunătățită în nanofibre de chitosan prin electrodepunere coaxială pe un substrat de poliesteri biodegradabili pretratați în plasmă, pentru obținerea ambalajelor alimentare.

Prezenta invenție înlătură dezavantajele datorate utilizării utilajelor conventionale pentru prelucrarea materialelor plastice, consum mare de agenți antimicrobieni, migrarea agenților antimicrobieni în aliment, soluția tehnică constând în obținerea de acoperiri ale filmului PHBV/PCL obținut prin metoda casting cu nanofibre constituite din înglobarea nizinii în soluție de APV obținute prin electrofilare co-axială.

Compoziția pentru realizarea nanofibrelor antimicrobiene și biodegradabile cu aplicații în ambalarea produselor alimentare, conform invenției, este formată dintr-o nanoemulsie pe baza de nizină și ulei esențial de mărar dintr-un amestec care conține 0,082% nizină, 82,07% H<sub>2</sub>O distilată, 1,78% Tween 80, 1,78% Tween 20 și 14,27% ulei esențial de mărar de concentrație 6 mg/mL, încapsulată în soluție 10% APV și depusă pe un film suport de tip PHBV/PCL constituit din 8% PHBV și respectiv 10% PCL în diclorometan.

Procedul de realizare conform invenției, constă în următoarele etape:

- Obținerea filmului suport de PHBV/PCL prin metoda turnare în cutii Petri (casting), cu dimensiuni de 10 cm x 6 cm, astfel încât raportul volumetric între soluții este de 1:1, în următoarele condiții tehnologice: încălzire pe o plită electrică prevăzută cu agitator magnetic, prin agitare la temperatura de 60 °C, timp de 30 minute și 400 rpm
- Obținerea soluției 10% APV prin dizolvare în apă distilată, prin încălzire pe o plită electrică prevăzută cu agitator magnetic, prin agitare la temperatura de 120°C, timp de 30 minute și 400 rpm
- Obținerea nanoemulsiei de nizină și ulei esențial de mărar prin amestecarea componentelor la temperatura camerei, viteza de 2000 rpm, timp de aproximativ 30 minute
- Depunerea nanofibrelor încapsulate în soluție de APV 10% pe suportul polimeric (colector) PHBV/PCL prin procedul de electrofilare co-axială, cu ajutorul unei spinarete prevăzute cu două ace de inox cu dimensiunile G15 la exterior și G21 în interior, care este legată la o sursă de înaltă tensiune de 21,63...22,64 kV și alimentată cu o soluție 10% APV având un debit de 4...5 mL/h și respectiv o nanoemulsie de nizină și ulei esențial de mărar având un debit de 0,8...1,0 mL/h, astfel încât distanța dintre capatul spinaretei și colector să fie de 14 cm, utilizând un echipament de electrospinning, într-un mediu ambiant cu temperatura 27...30,2°C și umiditatea relativă 27...28%.

Compoziția și procedul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- a. Se obțin acoperiri ale filmelor de PHBV/PCL cu nanofibre obținute prin încapsularea nizinii și a uleiului esențial de mărar în soluție de alcool polivinilic, ceea ce le recomandă pentru realizarea de ambalaje alimentare antimicrobiene, antifungice și biodegradabile;
- b. Procedul de obținere a nanofibrelor antimicrobiene este simplu, versatil, reproductibil, are loc prin electrofilarea co-axială a nanoemulsiei de nizină și ulei esențial de mărar în alcool polivinilic la temperatura camerei, fără un consum energetic mare și fără solvenți cu potențial toxic;
- c. Utilizarea nanoemulsiei de nizină și ulei esențial de mărar pentru realizarea ambalajelor alimentare biodegradabile va asigura eliberarea controlată de compuși bioactivi. Impactul va fi creșterea termenului de valabilitate al alimentelor, îmbunătățirea nivelului de conștientizare a consumatorilor și a capacității acestora de a face alegeri sănătoase și la prevenirea bolilor cronice și, în sfârșit, dar nu cu o importanță mai mică, la reducerea generării de deșeurile de ambalaje alimentare și poluarea mediului înconjurător;
- d. Se utilizează cantități reduse de nizină și respectiv de ulei esențial de mărar pentru acoperirea filmului de PHBV/PCL prin electrofilare;
- e. Filmele acoperite cu nanofibre de nizină și ulei esențial de mărar prezintă activitate antifungică și activitate antimicrobiană adecvată pentru domeniul ambalajelor alimentare.

S-au utilizat următoarele materii prime:

- Polihidroxibutirat-co-valerianat (PHBV) conținând 12% polihidroxicvalerianat (PHV) (GoodFellow, UK), granule; prezintă proprietăți similare cu poliolefinele, densitate 1,25 g/cm<sup>3</sup> alungire la rupere 35 %, rezistența la tracțiune la rupere 23 MPa.
- Policaprolactonă (PCL) (masă moleculară 80000 g/mol).
- Nizina (900 I.U./mg) achiziționată de la Alfa Aesar by Thermo Fisher Scientific
- Solvenți (diclorometan, etanol) de puritate analitică.
- Ulei esențial de mărar (*Anethum graveolens L.*) procurat de la SOLARIS PLANT SRL, București, România. Este caracterizat de 0,48 mg GAE/g conținut total de polifenoli, 13,21% DPPH și 36,10% ABTS (Râpă, M. Gaidau; C., Mititelu-Tartau; L., Berechet, M.-D.; Berbecaru, A. C.; Rosca, I.; Chiriac, A. P.; Matei, E.; Predescu, A.-M.; Predescu, C. *Bioactive Collagen Hydrolysate-Chitosan/Essential Oil Electrospun Nanofibers Designed for Medical Wound Dressings*. *Pharmaceutics* **2021**, *13*(11), 1939; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111939>).



Filmul suport de tip PHBV/PCL acoperit cu nanofibre antimicrobiene și antifungice de baza de nizină și ulei esențial de mărar fost caracterizat prin microscopie electronica de baleiaj (SEM)-determinarea morfologiei suprafeței filmului, dimensiunii și a morfologiei nanofirelor, activitatea antimicrobiană și antifungică.

### **Metode de investigare**

**Microscopia electronică de baleiaj (SEM)** s-a realizat cu ajutorul Microscopului Hihachi SU-8230 (Japon) *Sursa de electroni* „Cold Field Emission” (CFEG– Emisie în câmp rece), tensiunea de accelerare 30 kV. Înainte de examinare suprafața filmelor a fost acoperită cu un strat de Au de aproximativ 10 nm obținut prin evaporare în atmosfera de argon (Ar).

### **Caracterizarea activității antimicrobiene**

Pentru determinarea activității antibacteriene a probelor obținute au fost utilizate două bacterii, și anume *Bacillus subtilis* și *Bacillus cereus*. Mediul de cultură folosit în experiment a fost Nutrient Agar realizat prin sterilizare la 121°C, timp de 20 minute și răcire apoi la 45°C. După turnarea mediului de cultură în plăcile Petri și solidificarea acestuia, în fiecare placă a fost etalată cu bagheta Drigalsky o cantitate de 100 μL suspensie bacteriană, iar plăcile au fost lăsate în repaus timp de 30 minute pentru a facilita încorporarea microorganismului în mediul de cultură. Pe mediul astfel pregătit au fost plasate probele de material decupate sub formă de discuri cu  $\Phi = 6\text{mm}$ . Plăcile astfel obținute au fost incubate timp de 24 de ore la temperatura de 35°C. Bacteriile luate în studiu fac parte din colecția Facultății de Biotehnologii.

### **Determinarea aptitudinii la colonizare**

Principiul metodei constă în expunerea probelor de material polimeric la acțiunea microorganismelor pentru o anumită perioadă de timp la o anumită temperatură și umiditate relativă favorabilă. Au fost preparate două medii de cultură (sulfat de amoniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7 g L<sup>-1</sup>, fosfat monopotasic  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g L<sup>-1</sup>, fosfat monopotasic  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g L<sup>-1</sup>, agar 15 g L<sup>-1</sup> și apă distilată), unul cu peptonă ca sursă de carbon (M II) și unul fără peptonă (M I), acestea fiind sterilizate la 121 °C timp de 20 de minute, apoi turnate în plăci Petri. Epruvetele cu dimensiunile de 10 mm x 30 mm au fost pregătite din probele de material polimeric. Probele astfel obținute au fost sterilizate prin expunere la radiații UV pe ambele părți. Înainte de utilizare, funghi luați în studiu (*Aspergillus brasiliensis* și *Aspergillus terreus*) au fost crescuți pe mediu de cultură PDA între 7 și 9 zile, prin incubare la o temperatură de 25°C. Suspensia de spori a fost utilizată la o concentrație de 10<sup>6</sup> spori/mL. Chiar înainte de solidificarea mediului de cultură epruvetele de

material plastic au fost repartizate în plăcile Petri. Proba de testat a fost inoculată la suprafață cu câte 2  $\mu\text{L}$  suspensie de spori în 2 puncte. După inoculare, plăcile Petri au fost izolate cu parafilm, incubate la temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  și monitorizate timp de 70 de zile (evaluare intermediară). Pentru a se evalua gradul de colonizare, numărul de conidii și hife care s-au dezvoltat pe suprafața probelor supuse testării a fost cuantificat periodic (0-Nici un semn de creștere fungică; 1-Creștere vizibilă cu ochiul liber, acoperind până la 25% din suprafața de încercare; 2-Creștere vizibilă cu ochiul liber, acoperind până la 50% din suprafața de încercare; 3-Creștere considerabilă, acoperind până la 75% din suprafața de încercare; 4-Creștere puternică, acoperind toată suprafața de încercare). Pentru evaluarea gradului de biodegradare cu ajutorul microorganismelor probele au fost cântărite inițial la balanța analitică (înainte de a fi inoculate cu suspensiile de spori) și final (la sfârșitul perioadei de incubare), apoi a fost determinată variația masei, calculând gradul de biodegradare procentual (%). Fungii luați în studiu fac parte din colecția Facultății de Biotehnologii.

Rezultatele sunt discutate comparativ cu amestecul de referință și anume film de PHBV/PCL neacoperit cu agenți antimicrobieni.

Exemplul descris în continuare se bazează pe rezultatele prezentate în figura 1 și în tabelele 1...2:

- Figura 1 reprezintă imagini SEM (a), (b)
- Tabel 1 reprezintă Gradul de dezvoltare al fungilor *Aspergillus brasiliensis* și *Aspergillus terreus* pe suprafața materialelor polimerice supuse testelor de colonizare cu fungi
- Tabel 2 reprezintă gradul de biodegradare al probelor cu ajutorul microorganismelor

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a compoziției și procedurii conform invenției.

### **Exemplu**

Se prepara 20 g soluție constituită din 8% PHBV dizolvat în diclorometan și respectiv 20 g soluție 10% PCL prin dizolvare în diclorometan, prin încălzire pe o plită electrică prevăzută cu agitator magnetic, prin agitare la temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , timp de 30 minute și 400 rpm. Soluțiile obținute se introduc în aparatul de ultrasonare pentru îndepărtarea bulelor de aer. Cele două soluții se amestecă la un raport volumetric 1:1 pentru a se obține o soluție omogenă. Obținerea filmului de tip PHBV/PCL are loc prin turnarea soluției omogene în cutii Petri, cu latura de 12 cm și evaporarea solventului timp de 48 ore la temperatura camerei. Înainte de utilizare, granulele de PHBV se usucă în etuvă, timp de 4 ore la temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ . Se prepară o soluție de 10% APV în apă distilată, prin încălzire pe o plită electrică prevăzută cu agitator magnetic, prin agitare la temperatura de

120°C, timp de 30 minute și 400 rpm. Se prepară o nanoemulsie de nizină/ulei esențial de mărar prin amestecarea a 23 mg nizină în 23 mL apă distilată, adăugarea a 500  $\mu$ L Tween 80, 500  $\mu$ L Tween 20 și 4 mL ulei esențial de mărar de concentrație 60 mg/mL în etanol cu ajutorul unei plite electrice prevazute cu agitator magnetic la temperatura camerei, viteza de 2000 rpm, timp de amestecare 30 minute. Aceasta nanoemulsie se introduce într-o seringă fixată într-o pompă de seringă și este încapsulată într-o soluție de 10% APV în apă distilată, care se află în altă seringă. Se proiectează jetul instabil de soluție pe filmul suport de PHBV/PCL prin utilizarea unei spinarete prevazută cu două ace, care este legată la o sursă de înaltă tensiune de 22,47 și este alimentată cu soluție 10% APV la un debit de 5 mL/H (shell) și soluția de nizină în APV (core) la un debit de 2 mL/h pentru a colecta jetul instabil de soluție pe filmul suport de PHVC/PCL care se afla pe un colector tip disc cilindric, legat la pământ, astfel încât distanța dintre capatul spinaretei și colector este de 14 cm. Proba testată a avut efect diferit asupra celor două bacterii testate. În cazul bacteriei *Bacillus subtilis* s-a observat faptul că bacteria nu se dezvoltă la suprafața de contact cu proba, în timp ce pentru bacteria *Bacillus cereus* s-a observat, în plus, și un halou în jurul probei, demonstrând astfel o activitate antibacteriană a acesteia asupra microorganismelor luate în studiu. Imaginile SEM evidentiază faptul că PHBV nu este miscibil cu PCL, rezultând separarea fazelor (Figura 1a), iar nanofirele de nizină depuse pe suportul colector prezintă o morfologie filiformă, cu dimensiunile medii ale nanofirelor de 365 nm (Figura 1b).

Tabelul 1. Gradul de dezvoltare al fungilor *Aspergillus brasiliensis* și *Aspergillus terreus* pe suprafața materialelor polimerice supuse testelor de colonizare cu fungi

Film	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Aspergillus terreus</i>	
	M I	M II	M I	M II
PHBV/PCL	3	4	4	4
PHBV/PCL/Nanoemulsie de nizină/ulei esențial de mărar	4	4	4	4

Indiferent de conținutul în sursă de carbon al mediului de cultură utilizat, probele au prezentat un grad mare de colonizare în cazul ambilor fungi testați (creștere puternică, acoperind toată suprafața

de încercare), cu excepția probei PHBV/PCL inoculată cu *Aspergillus brasiliensis* pe MI (creștere considerabilă, acoperind până la 75% din suprafața de încercare).

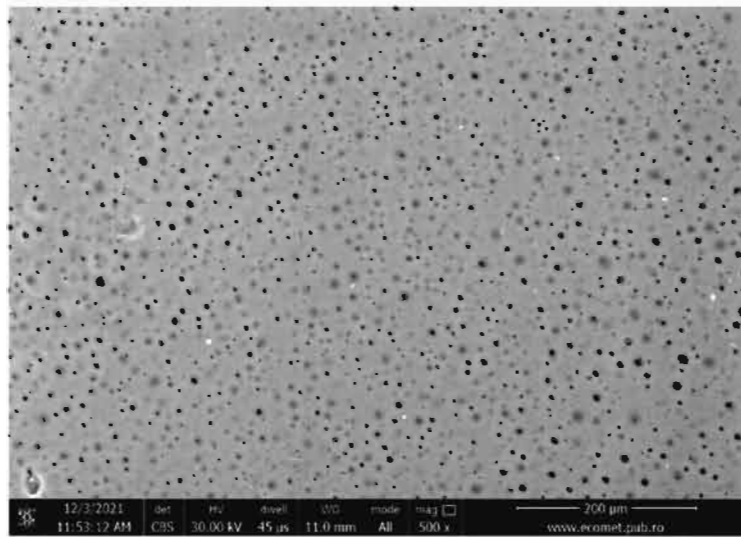
Tabelul 2. Gradul de biodegradare al probelor cu ajutorul microorganismelor (%)

Film	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Aspergillus terraesus</i>	
	M I	M II	M I	M II
PHBV/PCL	10,64 %	7,00 %	100 %	100 %
PHBV/PCL/Nanoemulsie	8,99 %	5,05 %	100 %	100 %

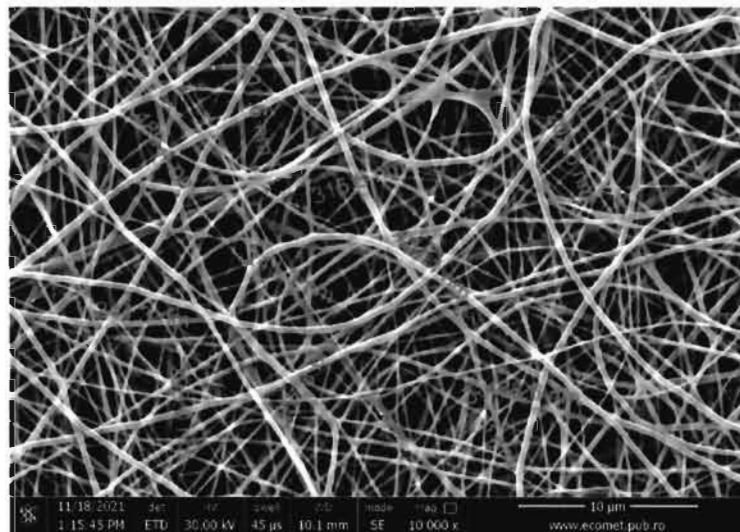
Dupa perioada de incubare, gradul de biodegradare este mai mare pentru probele menținute pe MI (fără sursă de carbon) comparativ cu probele menținute pe MII în ceea ce privește fungul *Aspergillus brasiliensis*. Fungul *Aspergillus terraesus* a degradat probele în proporție de 100%, indiferent de mediul de cultură utilizat. În concluzie, probele pot fi biodegradate de către fungii luați în studiu.

## REVENDICĂRI

1. Compoziție pe baza de PHBV/PCL și nanoemulsie de nizină și ulei esențial de mărar pentru realizarea ambalajelor alimentare antimicrobiene și biodegradabile, **caracterizată prin aceea că**, nanoemulsia de nizină și ulei esențial de mărar este formată dintr-un amestec care conține 0,082% nizină, 82,07% H<sub>2</sub>O distilată, 1,78% Tween 80, 1,78% Tween 20 și 14,27% ulei esențial de mărar de concentrație 6 mg/mL, procentele fiind exprimate în procente în greutate.
2. Procedeu de realizare a unei compoziții pentru ambalaje alimentare definite în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, într-o primă etapă, se obține filmul suport de tip PHBV/PCL prin dizolvarea componentelor în diclorometan pe o plită electrică prevăzută cu agitator magnetic, la temperatura de 60 °C, timp de 30 minute și 400 rpm, astfel încât raportul volumetric între soluții este de 1:1, urmată de turnarea în cutii Petri la temperatura camerei, timp de 48 h, apoi se prepară soluția de 10% APV prin dizolvare în apă distilată, pe o plită electrică prin agitare la temperatura de 120°C, timp de 30 minute și 400 rpm, apoi se prepară nanoemulsia de nizină și ulei esențial de mărar prin amestecarea componentelor pe o plită electrică la temperatura camerei, viteza de 2000 rpm, timp de aproximativ 30 minute, după care are loc acoperirea filmului suport de tip PHBV/PCL prin electrofilare co-axială cu nanoemulsia de nizină și ulei esențial de mărar încapsulată în soluția de 10% APV, în următoarele condiții: debitul soluției de APV cuprins între 4... 5 mL/h, debitul nanoemulsiei de nizină și ulei esențial de mărar cuprins între 0,8...1,0 mL/h, tensiune +21,63...22,64 kV, distanța dintre vârful de ac-colector de 14 cm, într-un mediu ambiant cu temperatura de 27...30,2°C și umiditatea relativă de 27...28%, care prezintă activitate antibacteriană și antifungică.



(a)



(b)

**Figura 1. Imagini microscopice pentru (a) PHBV/PCL; (b) PHBV/PCL/Nizină; (c) PHBV/PCL/Nanoemulsie de nizină/ulei esențial de mărar**