



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00588**

(22) Data de depozit: **28/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2023 BOPI nr. **3/2023**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
BD.REGINA ELISABETA NR.4-12,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **CINTEZA OTILIA-LUDMILA,** *STR.SIBIU*
NR.15, BL.Z8, SC.1, AP.15, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **STANCULESCU IOANA-RODICA,**
ALEEA DOLINA, NR.8, BL.137, SC.2, AP.25,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

• **GAIDAU CARMEN,** *STR.ALEXANDRU*
PAPIU ILARIAN NR.6, BL.42, SC.2, ET.6,
AP.53, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **STANCA MARIA,** *STR. SERG. MAJ. CARA*
ANGHEL, NR.9, BL.C56, SC.2, ET.7, AP.99,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CUTRUBINIS MIHALIS,** *BD. FERDINAND I*
NR.101, BL.P31, SC.1, ET.9, AP.39,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CONSTANTIN MIHAI,** *ȘOS.VIRTUȚII,*
NR.22D, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ALEXE COSMIN-ANDREI,**
STR.DEZROBIRII NR.18-38, BL.33, SC.4,
AP.148, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU INTEGRAT DE TRATARE A PIEILOR
CU CHITOSAN, NANOARGINT ȘI RADIAȚIE GAMMA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de tratare integrală a pieilor naturale în vederea obținerii proprietăților antimicrobiene prin formarea în situ a nanoparticulelor de Ag în prezența chitosanului și sub influența radiației ionizante gamma, pieile astfel tratate fiind utilizate pentru realizarea căptușelilor de încălțăminte sau pentru confecționarea sortimentelor velurate ca de exemplu haine de piele, genți, marochinărie și altele asemenea. Procedeu conform invenției constă în imersarea pieilor prin agitare cu 100 rot/min., timp de 5 min., într-o soluție compusă din AgNO₃ de concentrație 0,1 M, neutralizată cu 0,1 ml soluție de NaOH de concentrație 1M, peste care a fost dozată în picătură, sub agitare cu

300 rot/min., soluția de chitosan de concentrație 0,2%, obținută prin dizolvarea pudrei de polimer în 1% acid acetic, sub agitare magnetică la temperatura camerei, timp de 12 ore, urmată de scurgerea excesului de soluție pe hârtie de filtru, urmată de ambalare în pungă de polietilenă și expunere la doza de 5 kGy radiație gamma, iar dacă se dorește obținerea rezistenței la bacterii gram - negative, pielea crust se tratează prin expunerea la 25 kGy radiație gamma.

Revendicări: 2

Figuri: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2021 0588
Data depozit	28 -09- 2021

DESCRIEREA INVENTIEI

**PROCEDEU INTEGRAT DE TRATARE A PIEILOR CU CHITOSAN,
NANO ARGINT SI RADIATIE GAMMA**

Inventia se refera la un procedeu de tratare integrata a pieilor naturale in vederea obtinerii proprietatilor antimicrobiene prin formarea in situ a nanoparticulelor de argint in prezenta chitosanului, sub influenta radiatiei ionizante gamma.

Inventia se adreseaza industriei de pielarie in vederea realizarii unor sortimente cu proprietati antimicrobiene pentru partea interioara a incaltamintei (captuseli de incaltaminte), sortimente velurate (haine din piele, genti, marochinarie etc).

Se cunoaste faptul ca radiatia gamma genereaza nanoparticule de argint in cazul in care solutia de azotat de argint in prezenta caolinului este tratata cu doze de 7,13,20,40,65 si 80 kGy, cand se formeaza nanoparticule de argint cu marime de particula de 2,44-19 nm, sub forma sferica, eficiente impotriva bacteriilor gram- pozitive (*Enterococcus faecalis*) si gram-negative (*Escherichia coli* si *Proteus vulgaris*). Dozele de 7, 13 si 20 kGy au fost cele mai eficiente, generand radioliza apei, cu formarea nanoparticulelor de argint zerovalent cu eficienta mai mare comparativ cu nanoparticulele sintetizate chimic [1].

Complexul chitosan polietilenglicoxilat –nanoargint cu diverse concentratii de argint au fost utilizate pentru tratarea pielii de ovine. Suprafata pielii este mai intai carboxilata prin tratare cu plasma si apoi pieile se imerseaza in 25 mg.mL⁻¹ complex chitosan polietilenglicoxilat-nanoargint pentru 30 minute, prin agitare, urmata de uscare. Pieile au demonstrat proprietati antimicrobiene la expunerea la *Escherichia coli* si *Staphylococcus aureus*, comparativ cu chitosanul polietilenglicoxilat [2]. In alt articol se arata ca, chitosanul iradiat cu o doza de 100 kGy radiatie gamma, in conditii lipsite de umiditate conduce la formarea de fractii cu mase moleculare de 10-30000, cu activitate antimicrobiana ridicata fata de *Escherichia coli* care poate fi distrusa complet la o concentratie de chitosan de 3 mg.L⁻¹ [3]. Iradierea chitosanului in amestec cu azotat de argint cu doze de 10-25 kGy radiatie gamma conduce la formarea nanoparticulelor sferice de argint cu marimena de aproximativ 7-30 nm si cu eficienta antibacteriana fata

de *Escherichia coli* si *Staphylococcus aureus*, ceea ce creaza premiza pentru aplicatii in industria alimentara si medicina. Dispersia nanoparticulelor de argint in solutie apoasa de acid acetic de chitosan de concentratie 0,5% (% greutate/volum) conduce la rezultate mai bune decat in cazul solutiilor mai diluate [4]. Prepararea nanoargintului in prezenta chitosanului ca agent de stabilizare si iradiere cu doze de 100 kGy radiatie gamma este prezentata in literatura ca o posibilitate mai simpla, comparativ cu metoda chimica [5].

Comparativ cu procedeele descrise mai sus, prezenta inventie propune o metoda simpla, ecologica, de generare a nanoparticulelor de argint si a chitosanului cu activitate antimicrobiana avansata, prin imersarea pieilor in amestecul de solutie de chitosan si azotat de argint, tratare cu radiatie gamma de 5 si 25 kGy si uscare libera. In acest mod, pieile devin antimicrobiene dezvoltand zona de inhibitie la expunerea la *Staphylococcus aureus* sau *Pseudomonas aeruginosa*.

Avantajele metodei propuse constau in:

- simplitate; nu necesita modificarea majora a tehnologiilor existente;
- se poate aplica ca tratament final de prelucrare a pieilor;
- tratamentul cu radiatie gamma nu este de natura sa distruga colagenul sau pielea, cum se poate intampla in cazul dozelor de 100 kGy;
- tratamentul cu radiatie gamma este de tip multifunctional: reactiveaza colagenul, scindeaza molecula de chitosan, reduce ionul de argint la atom de argint, mult mai reactiv.

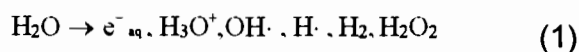
In continuare se prezinta un exemplu de procedeu integrat de tratare a pieilor in vederea obtinerii proprietatilor antimicrobiene.

EXEMPLU:

Se prepara o solutie apoasa de chitosan de concentratie 0,2 % prin dizolvarea pudrei de polimer in 1% acid acetic, sub agitare magnetica, la temperatura camerei, timp de 12 ore. Chitosanul utilizat a fost un produs cu viscozitate medie, masa moleculară = 300 kDa si 82% grad de deacetilare, (Sigma-Aldrich). Se prepara o solutie de AgNO_3 de concentratie 0.1M si de utilizeaza 0,1 mL solutie de NaOH de concentratie 1M, pentru reglarea pH-ului și grabirea reactiei de reducere. Solutia de chitosan se adauga in picatura la fiecare 3 secunde, cu agitare magnetica de 300 rot/min peste solutia de AgNO_3 . Imediat se imerseaza probele de



piele bovina tabacite ecologic (sintan/tara), sub agitare magnetica cu viteza de 100 rot/min, timp de 5 minute. Se extrag probele de piele pe hartie de filtru, se indeparteaza excesul de lichid prin absorbtie si se ambaleaza probele in folie de polietilena, care se sigileaza. O parte din probe se expun la 5 kGy si o parte la 10 kGy, pastrand suficiente probe Martor, neexpuse la radiatie gamma. Reactiile de baza care au loc in cazul expunerii la radiatie gamma sunt de radioliza a apei si formare a speciilor reactive si ionice, electronilor liberi, care conduc la reducerea ionului de argint la nanoparticule de argint si sunt prezentate in ecuatiile 1 si 2.



In plus, pot avea loc reactii de reactivare a colagenului, de scindare a polimerului de chitosan, cu efecte de interactiune de tip coordinativ cu atomii de argint. Probele si martorii de piele au fost uscate liber si analizate microbiologic utilizand metoda difuzimetrica Kirky-Bauer la actiunea bacteriilor gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*) si gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*). Aceste microorganisme sunt implicate in majoritatea cazurilor de infectii nosocomiale intalnite in mediul spitalicesc. Zonele de inhibitie (ZOI) inregistrate sunt prezentate in Tabelele 1 si 2 si in Figurile 1 si 2 si demonstreaza faptul ca probele tratate cu chitosan, ioni de argint si radiatie gamma prezinta activitate antimicrobiana, comparativ cu probele tratate cu chitosan si ioni de argint, ceea ce demonstreaza indirect formarea nanoparticulelor de argint, mult mai active microbiologic. Doza de radiatie de 5 kGy este eficienta pentru inhibarea dezvoltarii bacteriei *Staphylococcus aureus* si doza de 25 kGy pentru inhibarea dezvoltarii bacteriei *Pseudomonas aeruginosa*.

Revendicari

1. Metoda integrata de tratarea a pieilor **caracterizata prin aceea ca**, pentru obtinerea rezistentei la bacterii gram-pozitive, pielea crust se imerseaza prin agitare cu 100 rot/min, timp de 5 minute, intr-o solutie compusa din AgNO_3 de concentratie 0.1M, neutralizata cu 0,1 mL solutie de NaOH de concentratie 1M, peste care a fost dozata in picatura, sub agitare cu 300 rot/min, solutia de chitosan de concentratie 0,2 %, obtinuta prin dizolvarea pudrei de polimer in 1% acid acetic, sub agitare magnetica, la temperatura camerei, timp de 12 ore, urmata de scurgerea excesului de solutie pe hartie de filtru, ambalare in punga de polietilena si expunere la doza de 5 kGy radiatie gamma.
2. Metoda integrata de tratare a pieilor **caracterizata prin aceea ca**, pentru obtinerea rezistentei la bacterii gram-negative, pielea crust se trateaza conform metodei descrise la revendicarea 1, cu deosebirea ca se expune la 25 kGy radiatie gamma.

Tabel 1-ZOI pentru 5 probe paralele expuse la 5kGy si 25 kGy si Martori testati la *Staphylococcus aureus*

repl	<i>Staphylococcus aureus</i> 100.1		
	M	5 kGy	25 kGy
1	5.4	6.1	4.3
2	4.8	6	3.8
3	5	6.1	3.9
4	4.9	5.6	4.1
5	4.3	3.6	4.2
Medie	3.82	4.42	3
abaterea	0.39623	1.07098	0.20736

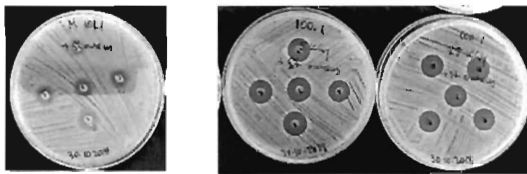


Fig. 1. ZOI la actiunea *Staphylococcus aureus*
Martor, Probe expuse la 5 kGy si la 25 kGy

Tabel 2-ZOI pentru 5 probe paralele expuse la 5kGy si 25 kGy si Martori testati la *Pseudomonas aeruginosa*

repl	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 100.2		
	M	5 kGy	25 kGy
1	4.2	3.1	4
2	3.1	3.3	4.5
3	3.3	3.4	4.6
4	3.1	3.2	4
5	3.5	3.5	3.7
Medie	3.44	3.3	4.16
abaterea	0.45607	0.15811	0.37815

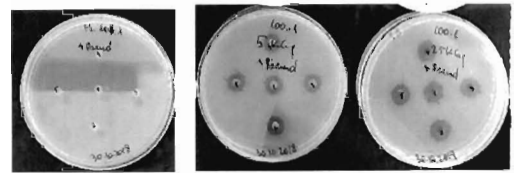


Fig. 2. ZOI la actiunea *Pseudomonas aeruginosa*
Martor, Probe expuse la 5 kGy si la 25 kGy

Referinte

1. Salmah Moosa, Anis Nadia Mohd Faisal Mahadeven si Kamyar Shameli, A comparative study of chemical and gamma-ray irradiation method for synthesis of silver nanoparticles in kaolinite, International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT), Volume 08, Issue 08 (August 2019), IJERTV8IS080065, DOI: 10.17577/IJERTV8IS080065
2. S Matsuhashi, T Kume, Enhancement of Antimicrobial Activity of Chitosan by Irradiation, *J Sci Food Agric* 1997, 73,237-241.
3. Gongyan Liu, Kaijun Li, Quanqing Luo, Haibo Wang, Zongcai Zhang, PEGylated chitosan protected silver nanoparticles as water borne coating for leather with antibacterial property, *Journal of Colloid and Interface Science* 490 (2017) 642–651.
4. Rangrong Yoksan, Suwabun Chirachanchai, Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: Preparation by γ -ray irradiation and their antimicrobial activities, *Materials Chemistry and Physics* 115 (2009) 296–302, doi:10.1016/j.matchemphys.208.12.001.
5. Peng Chen, Linyong Song, Yankuan Liu, Yue-e Fang, Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic watersolution containing chitosan, *Radiation Physics and Chemistry* 76 (2007) 1165–1168, doi:10.1016/j.radphyschem.2006.11.012.