



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2022 00749**

(22) Data de depozit: **21/11/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2024 BOPI nr. **5/2024**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" DIN
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ
NR.41 A, IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **MARIN LUMINIȚA,
STR.SARMISEGETUZA, NR.13, BL.J1,
SC.A, ET.1, AP.3, IAȘI, IS, RO;**

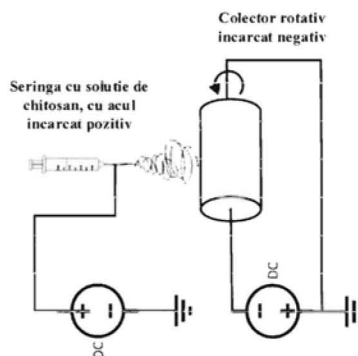
• **ANISIEI ALEXANDRU, STR.SERGEANT
GRIGORE IOAN, NR.7, BL.A3, ET.11,
AP.48, IAȘI, IS, RO;**
• **ANDREICA BIANCA, ȘOS.ȘTEFAN CEL
MARE ȘI SFÂNT, NR.4, BL.A19, ET.4,
AP.47, IAȘI, IS, RO;**
• **TARTAU MITITELU LILIANA, NR.346,
SAT DOROBANȚI, COMUNA ARONEANU,
IS, RO**

(54) **PROCEDEU DE ELECTROFILARE DE NANOFIBRE
DE CHITOSAN ȘI CHITOSAN/CHITOSAN CUATERNIZAT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de electrofilare pentru obținerea nanofibrelor de chitosan și amestecuri de chitosan/chitosan cuaternizat. Procedeu, conform invenției, cuprinde prepararea unei soluții de chitosan în acid acetic 90% și încărcarea sa într-o seringă a unui dispozitiv de electrofilare, cu acul conectat la electrodul pozitiv al sursei de tensiune, soluția fiind apoi împinsă prin ac la un debit constant, distanța dintre ac și un colector rotativ fiind fixată la 10 cm, la ieșirea din ac, datorită încărcării, soluția formând un con Taylor, care este atras sub formă de jet fin spre colectorul încărcat negativ, în timpul injectării jetul uscându-se și depunându-se sub forma unui strat de fibre.

Revendicări: 5
Figuri: 3



Schema 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cererea de brevet de invenție	
Nr.	2022 / 20749
Data depozit	21-11-2022

24

PROCEDEU DE ELECTROFILARE DE NANOFIBRE DE CHITOSAN SI CHITOSAN/CHITOSAN CUATERNIZAT

Prezenta invenție se refera la o metoda de electrofilare de fibre din polimeri policationici, cu referire la chitosan (Cs) si amestecuri de chitosan/chitosan cuaternizat, cand gruparile cuaternare de amoniu sunt fie grefate direct pe catena principala (TMC), fie prin intermediul unui lant flexibil (HTCC).

Chitosanul este un biopolimer obtinut prin hidroliza bazica a chitinei, un polimer natural prezent in cochiliile de melci, scoici, si in unele insecte, considerat un material regenerabil (*Polymers* 2022, 14(12), 2335). Proprietatile sale deosebite pe de o parte, si originea sa naturala pe de alta parte, a incurajat multe cercetari pe directia obtinerii de biomateriale pe baza de chitosan si derivati de chitosan, pentru aplicatii diverse, de la dispozitive biomedicale la optoelectronice. (Nano)fibrele pe baza de chitosan au dovedit un potential de aplicare ridicat datorita suprafetii specifice mari care ii amplifica proprietatile intrinseci si confera materialului proprietati mecanice bune, flexibilitate, porozitate, permeabilitate la lichide si gaze, etc. Cu toate acestea, natura policationica a chitosanului face dificila obtinerea de nanofibre, in special prin metoda electrofilarii, o metoda preferata datorita costurilor mici pe care le implica. Obtinerea fibrelor pe baza de chitosan prin electrofilare se face de obicei din amestecuri cu un polimer sintetic cu masa mare ca agent de co-filare (*Reviews in Chemical Engineering*, <https://doi.org/10.1515/revce-2021-0003>). Acest fapt limiteaza aplicarea in domeniul biomedical, datorita lipsei de biodegradabilitate a polimerului sintetic care introduce riscul unei eliminari lente prin rinichi, sau chiar stocarea sa in diverse organe (*Drug Discov Today*. 19 (2014) 1623–1631; *Int J Environ Res Public Health*. 18 (2021) 6027).

In literatura de specialitate sunt putine studii care raporteaza obtinerea de fibre din chitosan prin electrofilare. Electrofilarea chitosanului s-a reusit doar din acid trifluoracetic, un solvent coroziv si deosebit de toxic (*Macromolecular Rapid Communications* 25(18).1600–1605), sau dintr-un amestec al acestuia cu diclor metan (*Macromolecular Research* 19(4).345–350). Chiar si asa, articolele nu mentioneaza randamentul de obtinere a fibrelor, iar incercarile noastre de a reproduce metoda au



Chirilă
Anisie
MUT
N. Niceraba

aratat randamente deosebit de mici, cea mai mare parte a solutiei de electrofilare fiind pierduta sub forma de picaturi. Incercari de imbunatatire a metodei de obtinere, prin adaugarea unui surfactant in solutia de electrofilare (*International Journal of Biological Macromolecules* 106. 768–774) sau utilizarea unui inel de cupru pentru uniformizarea campului electric aplicat si obtinerea de fibre cu un grad mare de aliniere (*Journal of Polymer Research* 20(4).105), nu au condus la imbunatatirea randamentului de obtinere, fapt indicat si de lipsa unor studii mai aprofundate, care ar necesita bucati mai mari de fibre. Cauza dificultatii de electrofilare a chitosanului este caracterul sau policationic care induce interactiuni de respingere intre lanturile de chitosan, nepermitand astfel un grad de incalcire suficient al lanturilor, parametru critic pentru electrofilare (*Reviews in Chemical Engineering*, <https://doi.org/10.1515/revce-2021-0003>).

Prin derivatizarea chitosanului cu grupari cuaternare de amoniu se imbunatatesc considerabil o serie de proprietati, cum ar fi activitatea antimicrobiana, bio si muco-adezivitatea, capacitatea de a intermedia patrunderea medicamentelor in celule (*European Polymer Journal* 39, 2020, 110016). Pe de alta parte, prezenta sarcinilor pozitive localizate creste si mai mult caracterul policationic al chitosanului facand si mai dificila electrofilarea sa. Datele de literatura arata ca obtinerea de fibre pe baza de chitosan cuaternizat a fost realizata doar din amestecuri cu continut mare de polimeri sintetici, ca alcoolul polivinilic (PVA) (*Carbohydrate Research* 341, 2006, 2098-2107; *Journal of Materials Science* 54, 2019, 12522-12532), polivinilpirolidona (PVP) (*European Polymer Journal* 43, 2007, 1112-1122) sau acid polilactic (PLA) (*Macromol. Biosci.* 2009, 9, 102–111), limitand aplicarea acestora *in vivo*.

O analiza a patentelor publicate pana acum arata interes pentru protejarea metodelor de obtinere a fibrelor de chitosan si a celor pe baza de chitosan cuaternizat, dar asa cum si literatura de specialitate o indica, foarte putine sunt dedicate obtinerii de fibre de chitosan prin electrofilare.

Cateva patente descriu obtinerea de fibre de chitosan din solutie de acid trifluoroacetic, sau electrofilare de chitosan protejat la gruparile amino responsabile pentru caracterul sau policationic. Astfel, patentul JP2008308780A descrie obtinerea de fibre de chitosan din acid trifluoroacetic, patentul US20160367722A1 descrie electrofilarea de chitosan din solutie de acid trifluoroacetic, si extinde metoda la utilizarea de amestecuri ale acidului trifluoroacetic cu solventi organici (TEA sau



Handwritten signatures and initials, including a large signature and several smaller ones below it.

TEA/acetona), pentru chitosan sau chitosan protejat la gruparea amina cu ester carbonat sau di-tert-butil dicarbonat. Un alt patent protejeaza obtinerea de fibre de chitosan umplute cu o proteina anionica prin metoda electrofilarii coaxiale (US20140242145A1). Si in acest caz solutia de chitosan pentru electrofilare a fost obtinuta prin dizolvare in acid trifluoroacetic in amestec cu un solvent organic, diclormetan, si metoda a fost extinsa la derivati de chitosan acilati, tiolati si fosforilati. Similar, utilizand acidul trifluoroacetic ca agent de dizolvare, un alt patent protejeaza metoda de electrofilare a unor fibre de chitosan mineralizate cu hidroxiapatita si reticulate ulterior cu genipina (US20130274892A1).

Multe patente sunt dedicate obtinerii de fibre de chitosan sau derivati de chitosan prin metoda coagularii/extruderii/filarii umede, constand in principiu in precipitarea unei solutii de chitosan intr-o baie de solutie bazica (CN105233327A; CN102199810B; WO2012136082A1; AU613706B2; US2014/0044758A1), sau electrofilarii de nanofibre hibride din amestecuri de chitosan cu un polimer usor electrofilabil, ex. PEO (US9101508B2, RU2468129C2; CN110496247B; CN103394114B; RU2487701C2), sau PVA (US9163338B2).

In ceea ce priveste obtinerea de nanofibre de chitosan cuaternizat, exista foarte putine patente publicate pana acum.

Astfel, patentul CN105233327A protejeaza un procedeu de obtinere de fibre de chitosan cuaternizat (clorura de trimetil chitosan (TMC)) prin reactia de cuaternizare in sistem heterogen a unor fibre de chitosan obtinute in prealabil. Un alt patent, CN115154648A, descrie o metoda similara de obtinere de fibre de chitosan cuaternizat (HTCC) ca parte a unui procedeu mai complex de obtinere de bureti cu efect hemostatic. Patentul CN112442759A descrie obtinerea de fibre hibride pectina/chitosan cuaternizat (clorura de hidroxi propil trimetilamoniu chitosan (HACC)) prin metoda filarii umede, si in mod similar, patentul CN112410931A protejeaza metoda de obtinere de fibre hibride din alginat de sodiu/ chitosan cuaternizat (HACC).

Analiza datelor de literatura si a patentelor descrise indica potentialul crescut al fibrelor pe baza de chitosan, si al celor pe baza de chitosan cuaternizat pentru aplicarea ca biomateriale, ex. matrici pentru regenerare tisulara, bandaje pentru vindecarea ranilor, filtre pentru purificarea aerului si apei, matrici pentru vaccinuri antivirale, justificand necesitatea obtinerii de astfel de fibre printr-o metoda simpla, reproductibila, si cu costuri reduse.

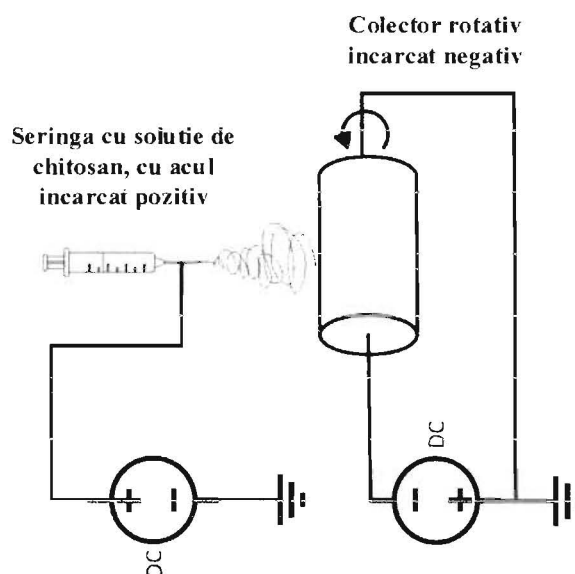


Leaciu
An
M. Karadag

Problema tehnica a metodei coagularii/extruderii/filarii umede descrisa in multe patente este lipsa de control si reproductibilitate a dimensiunii fibrelor si dificultatea de a obtine materiale cu integritate si proprietati mecanice bune care sa permita manipularea usoara si sa asigure un timp de viata suficient in decursul aplicarii. Mai mult, procedeul este laborios, cu multe etape, implicand si spalarea fibrelor obtinute. Pe de alta parte, obtinerea de fibre de chitosan prin metoda electrofilarii descrisa in literatura si in patentele de mai sus, utilizeaza acidul trifluoroacetic ca dizolvant, un solvent coroziv si toxic care ridica probleme de protectie a mediului, iar randamentul de obtinere este mic, fapt ce creste mult pretul de productie.

Problema tehnica pe care o rezolva aceasta inventie este de a obtine prin electrofilare fibre de chitosan sub forma de netesuta, cu randament 100%, dintr-un solvent mai prietenos mediului, acidul acetic. Fibrele, obtinute din doi biopolimeri, sunt biocompatibile si pot fi aplicate ca biomateriale in aplicatii care implica contactul cu tesaturile vii.

Inventatorii au gasit ca modificarea polaritatii campului electric a unei instalatii de electrofilare prin aplicarea unui voltaj pozitiv pe ac si a unui voltaj negativ pe colector, confera capacitate de electrofilare chitosanului policationic, permitand electrofilarea sa din solutie de acid acetic (*Schema 1*). Metoda a fost extinsa la solutii de chitosan/chitosan cuaternizat, si a furnizat fibre cu diametrul mediu sub 50 nm. Metoda nu implica pierderi de solutie si are reproductibilitate buna in ceea ce priveste diametrul fibrelor.



Schema 1. Reprezentarea grafica a electrofilarii fibrelor de chitosan

Procedeul general al obtinerii nanofibrelor de chitosan este prezentat in continuare. Se prepara o solutie de chitosan in acid acetic 90% si se incarca intr-o seringa a unui dispozitiv de electrofilare TONG LI TECH TL-PRO-BM (Shenzhen, China), cu acul conectat la electrodul pozitiv al sursei de tensiune. Parametrii echipamentului de electrofilare se seteaza dupa cum urmeaza: punctul de plecare: 100 mm; lungimea de scanare: 80 mm; punctul de pornire in crestere: 220 mm; lungimea de clatire: 75 mm; timp de clatire: 15 minute; viteza de scanare: 30 mm/s; viteza de clatire 20 mm/s; ciclu de clatire: 2 cicluri; viteza de reglare a rolei: 800 rpm; timp acc: 30 s; viteza maxima a rolei: 3000 rpm; Temp.: 26-28 °C. Solutia este impinsa prin acul seringii cu un diametru intern de 0.8 nm, la un debit constant de 0.4 mL/h, la un voltaj de -8 kV pe colector si +18 kV pe ac. Distanta dintre ac si colector se fixeaza la 10 cm. Colectorul rotativ (800 rpm) se acopera cu folie de aluminiu. Datorita incarcarii, la iesirea din ac solutia formeaza conul Taylor, care este atras sub forma de jet fin spre colectorul incarcat negativ. In timpul "zborului", jetul se usuca si se depune sub forma de strat de fibre. Nu exista pierderi de solutie.

In continuare se prezintă exemple de aplicare a procedurii care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplul 1. Intr-un vas Erlenmyer de 500 mL cu dop rotat, prevazut cu magnet, se introduc 10 g chitosan (Mw=126 kDa, DD=97%) si 190 mL solutie de acid acetic 90% pentru a forma 200 mL solutie de chitosan 5%. Amestecul se agita usor (500 rot/min) la temperatura camerei, timp de 12 ore, dupa care se incarca in cele 4 seringi (50 mL) ale sistemului de electrofilare, se seteaza parametrii mentionati mai sus in prezentarea generala a metodei, se porneste instalatia si se lasa sa functioneze pana se termina solutia din seringi. Folia de aluminiu pe care s-a depus stratul de fibre se desprinde de pe colector, si se lasa la uscat in vid timp de 24 de ore pentru a indeparta acidul acetic rezidual, dupa care stratul de fibre se desprinde usor. Stratul de fibre se prezinta sub forma unei netesute cu proprietati mecanice bune care permit manipularea usoara (Figura 1). Imaginile SEM au indicat fibre incalcite cu diametru mediu de 41.3 ± 11.4 nm, si picaturi sferice rare (Figura 2). La implantarea subcutanata in sobolani Wilstar fibrele nu au provocat modificari ale formulei leucocitare, activitatii enzimatiche in ficat, indicatorilor activitatii renale si a sistemului imunitar, la 24 ore si 7 zile de la administrare, demonstrand faptul ca materialele sunt biocompatibile si pot fi administrate intern. Dupa 7 zile, netesuta nu a mai fost gasita la locul implantarii,



Handwritten signatures and initials, including 'Jocu' and 'M.T. Hancu'.

sugerand ca s-a biodegradat, iar tesutul nu a prezentat semne de inflamare, sugerand ca netesuta poate fi utilizata in contact cu tesuturile vii.

Exemplul 2. Se lucreaza ca in exemplul 1, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan 6%. Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 32.4 ± 17.3 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

Exemplul 3. Se lucreaza ca in exemplul 1, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan 7%. Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 39.2 ± 21.1 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

Exemplul 4. Se lucreaza ca in exemplul 1, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan/ chitosan cuaternizat (HTCC, 197kDa, DQ=54.4%) cu un raport masic de 19/1. Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 29.7 ± 22.5 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

Exemplul 5. Se lucreaza ca in exemplul 4, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan/ chitosan cuaternizat (TMC, DQ=61.33%, DM=17.3%) . Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 28.5 ± 19.2 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

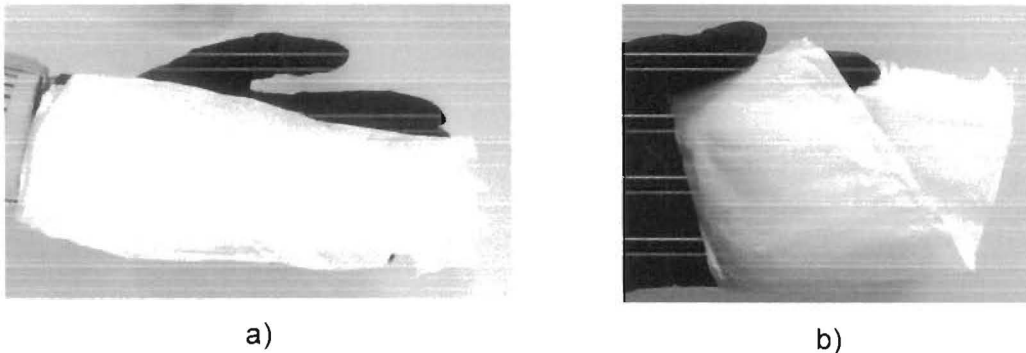


Figura 1. Imaginea unei fibre de chitosan obtinuta din solutia 6%

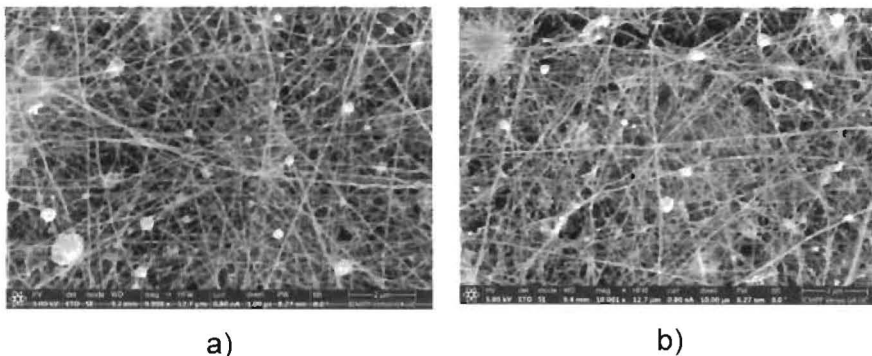
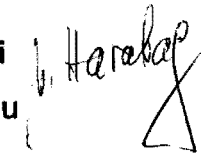


Figura 2. Imagini SEM ale fibrelor de chitosan obtinute din solutie 6% si 7%

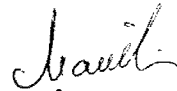
Revendicari

1. Procedeu de obtinere de nanofibre de chitosan prin electrofilare din solutie de acid acetic
2. Procedeu de obtinere de nanofibre hibride de chitosan/chitosan cuaternizat din solutie de acid acetic
3. Netesuta pe baza de chitosan conform revendicarii 1, caracterizata prin diametru mediu al fibrelor mai mic de 50 nm, biocompatibilitate si biodegradabilitate *in vitro*.
4. Netesuta pe baza de chitosan/chitosan cuaternizat HTCC conform revendicarii 2, caracterizata prin diametru mediu al fibrelor mai mic de 50 nm, biocompatibilitate si biodegradabilitate *in vitro*.
5. Netesuta pe baza de chitosan/chitosan cuaternizat TMC conform revendicarii 2, caracterizata prin diametru mediu al fibrelor mai mic de 50 nm, biocompatibilitate si biodegradabilitate *in vitro*.

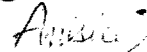
Director ICMPP Iasi
Dr. Valeria Harabagiu



Luminita Marin



Alexandru Anisie



Bianca Andreica



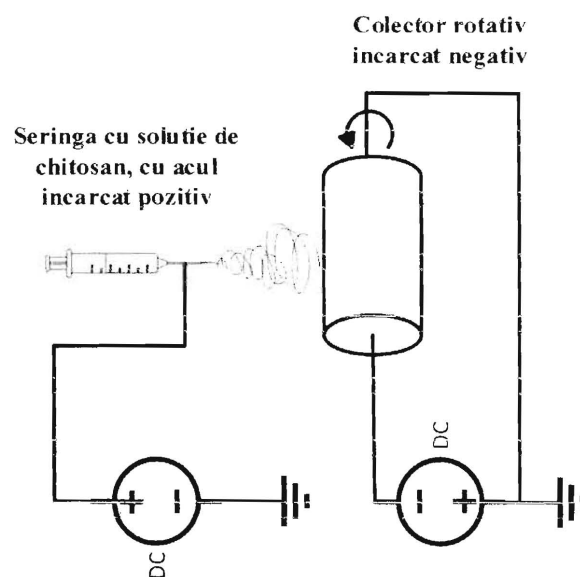
Liliana Mititelu Tartau



Problema tehnica a metodei coagularii/extruderii/filarii umede descrisa in multe patente este lipsa de control si reproductibilitate a dimensiunii fibrelor si dificultatea de a obtine materiale cu integritate si proprietati mecanice bune care sa permita manipularea usoara si sa asigure un timp de viata suficient in decursul aplicarii. Mai mult, procedeul este laborios, cu multe etape, implicand si spalarea fibrelor obtinute. Pe de alta parte, obtinerea de fibre de chitosan prin metoda electrofilarii descrisa in literatura si in patentele de mai sus, utilizeaza acidul trifluoroacetic ca dizolvant, un solvent coroziv si toxic care ridica probleme de protectie a mediului, iar randamentul de obtinere este mic, fapt ce creste mult pretul de productie.

Problema tehnica pe care o rezolva aceasta inventie este de a obtine prin electrofilare fibre de chitosan sub forma de netesuta, cu randament 100%, dintr-un solvent mai prietenos mediului, acidul acetic. Fibrele, obtinute din doi biopolimeri, sunt biocompatibile si pot fi aplicate ca biomateriale in aplicatii care implica contactul cu tesuturile vii.

Inventatorii au gasit ca modificarea polaritatii campului electric a unei instalatii de electrofilare prin aplicarea unui voltaj pozitiv pe ac si a unui voltaj negativ pe colector, confera capacitate de electrofilare chitosanului policationic, permitand electrofilarea sa din solutie de acid acetic (*Schema 1*). Metoda a fost extinsa la solutii de chitosan/chitosan cuaternizat, si a furnizat fibre cu diametrul mediu sub 50 nm. Metoda nu implica pierderi de solutie si are reproductibilitate buna in ceea ce priveste diametrul fibrelor.



Schema 1. Reprezentarea grafica a electrofilarii fibrelor de chitosan

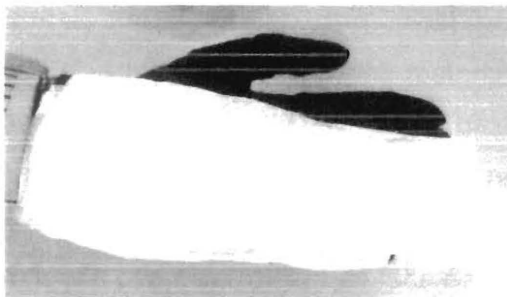
sugerand ca s-a biodegradat, iar tesutul nu a prezentat semne de inflamare, sugerand ca netesuta poate fi utilizata in contact cu tesuturile vii.

Exemplul 2. Se lucreaza ca in exemplul 1, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan 6%. Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 32.4 ± 17.3 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

Exemplul 3. Se lucreaza ca in exemplul 1, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan 7%. Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 39.2 ± 21.1 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

Exemplul 4. Se lucreaza ca in exemplul 1, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan/ chitosan cuaternizat (HTCC, 197kDa, DQ=54.4%) cu un raport masic de 19/1. Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 29.7 ± 22.5 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

Exemplul 5. Se lucreaza ca in exemplul 4, cu diferenta ca se prepara o solutie de chitosan/ chitosan cuaternizat (TMC, DQ=61.33%, DM=17.3%) . Fibrele obtinute au avut diametrul mediu de 28.5 ± 19.2 nm, si similar exemplului 1 au prezentat biocomaptibilitate *in vivo* pe sobolani.

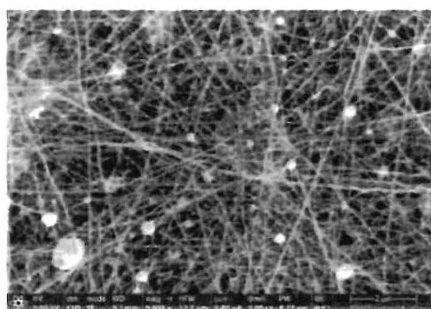


a)

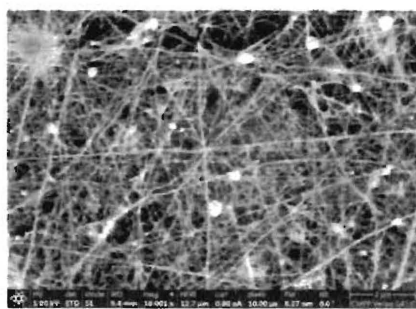


b)

Figura 1. Imaginea unei fibre de chitosan obtinuta din solutia 6%



a)



b)

Figura 2. Imagini SEM ale fibrelor de chitosan obtinute din solutie 6% si 7%