

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la sinteza unor copolimeri obținuți la funcționalizarea chitosanului cu antioxidanți, și poate fi utilizată în domeniul industriei farmaceutice pentru obținerea preparatelor cu proprietăți reducătoare, care pot fi aplicate pentru inhibiția formării substanțelor cancerigene, a N-nitrozaminelor produse în rezultatul nitrozării substanțelor medicamentoase cu nitriți.

Antioxidanții naturali, astfel ca polifenolii, dar în special flavanoizii prezenți în diferite produse vegetale prezintă un interes considerabil datorită proprietăților și efectelor lor potențiale nutriționale și terapeutice. Radicalii liberi și speciile reactive de oxigen sunt implicate în apariția diferitor tipuri de leziuni oxidative a biomoleculilor, iar ca rezultat acești factori de risc duc la dezvoltarea diferitor patologii în organismele vii. Radicalii liberi pot induce modificări în diferite țesuturi biologice și celulele biomoleculilor cum ar fi lipide, proteine, ADN sau ARN. Rolul principal al antioxidanților este reducerea riscului dezvoltării diverselor patologii în organismul uman. Mulți antioxidanți sintetici au fost utilizați în industria alimentară, medicinală, farmaceutică, dar cercetările recente au menționat dezavantajele și posibilele lor proprietăți toxice pentru sănătatea umană și animală (Neeraj Kumar Sethiya, Ashish Trivedi, Shrihari Mishra. The total antioxidant content and radical scavenging investigation on phytochemical from dietary plant sources used globally as functional food. *Biomedicine and preventive nutrition*, 2014, nr. 4, pag. 439-444).

Este cunoscut faptul că chitosanul (Cht) este netoxic, mucoadeziv, hemocompatibil, biodegradabil și posedă proprietăți antitumorale, antioxidante și antimicrobiene (Dongying Z., Shuang Y., Beini S., Shuang G., Sihan G., Kai Z. *Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles*. *Polymers*, 2018, vol. 10, nr. 462, p. 17). Aceste proprietăți fac ca chitosanul să devină un biomaterial foarte atractiv pentru diferite aplicații în domeniul biomedical. Polimerii funcționalizați cu substanțe biologice active sunt aplicați pe scară largă în domeniul biomedical ca instrumente în diagnostică și tratamentul diferitor boli (Uthaman S., Lee S.J., Cherukula K., Cho C., Park I.K. *Polysaccharide-coated magnetic nanoparticles for imaging and gene therapy*. *BioMed Res. Int.*, 2015, p. 54). În calitate de purtători, particulele polimerice pot fi grefate cu medicamente multiple care la rândul său pot fi eliberate controlat în organism.

Este cunoscut procedeul de funcționalizare a chitosanului cu acidul ascorbic (AAs) [1], în care într-un balon rotund se adaugă chitosan și alcool izopropilic, aerul din balon se înlocuiește cu gaz inert,  $N_2$ . După ce amestecul s-a agitat o oră, se adaugă soluția de acid ascorbic, peste 30 de minute se mai adaugă alcool izopropilic și apă, și se agită încă 2 ore. Polimerul se filtrează, se spală cu un amestec de alcool izopropilic și apă și apoi numai cu alcool izopropilic, iar fracția obținută se usucă sub vid.

Dezavantajul procedurii dat este folosirea unor cantități mari de alcool izopropilic și realizarea reacției în gaz inert, ceea ce complică efectuarea experimentului și mărește costul procedurii.

Cel mai apropiat după esența tehnică și rezultatul obținut este procedeul, în care la chitosanul în apă distilată se adaugă acidul ascorbic sub mediul de gaz inert (de azot). Chitosanul se dizolvă și se agită timp de 6 ore. După aceasta se efectuează dializa produsului în apă timp de 3 zile și în final se usucă, obținându-se produsul în formă de praf [2].

Dezavantajul acestui procedeu este timpul îndelungat de efectuare a sintezei (6 ore + 72 ore de dializă) și utilizarea gazului inert ce complică efectuarea experimentului și mărește costul procedurii.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de funcționalizare a chitosanului cu acid ascorbic, care simplifică metoda de obținere, micșorează timpul de sinteză, costul procedurii și numărul de reagenți necesari.

Esența invenției constă în faptul că se propune un procedeu de funcționalizare a chitosanului cu acid ascorbic, care include interacțiunea chitosanului cu acidul ascorbic în raport molar de 1:1 într-o soluție de acid acetic de 1%, în condiții aerobe, încălzirea și menținerea amestecului timp de 3 ore la temperatura de  $100^\circ\text{C}$  într-un vas conectat la un refrigerent vertical, după care copolimerul obținut se separă și se usucă.

Rezultatul tehnic al invenției constă în micșorarea timpului de sinteză de la 78 ore la 3 ore, astfel se micșorează timpul de sinteză de 26 de ori. În procedeul propus sinteza se realizează în aerul atmosferic, astfel se micșorează costul și se simplifică instalația utilizată în sinteza după procedeul dat.

Rezultatul tehnic obținut este determinat de încălzirea amestecului reactant timp de 3 ore la  $100^\circ\text{C}$ , timp în care are loc funcționalizarea chitosanului cu acidul ascorbic.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1-12, care reprezintă:

Fig. 1, Funcționalizarea chitosanului cu acid ascorbic, raport echimolar, 3 ore,  $100^\circ\text{C}$ ;

Fig. 2, Spectrul IR al chitosanului;

Fig. 3, Spectrul IR al chitosanului funcționalizat Cht:AAs (1:1), 3 ore,  $100^\circ\text{C}$ ;

Fig. 4, Spectrul IR al amestecului dintre chitosan și acid ascorbic;

Fig. 5, Curba de calibrare a AAs determinată prin metoda spectrofotometrică;

Fig. 6, Mecanismul de interacțiune a DPPH-lui cu reducătorii;

Fig. 7, Variația concentrației de DPPH la interacțiunea cu AAs pur în funcție de [AAs];

Fig. 8, Variația concentrației de DPPH în funcție de concentrația AAs din copolimer;

Fig. 9, Structura chimică a  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ;

Fig. 10, Variația absorbantei ( $\lambda_{\text{max}}$  714 nm) în timp în funcție de [AAs] la determinarea AAT;

Fig. 11, Dependența AAT în funcție de concentrația acidului ascorbic;

Fig. 12, Variația absorbantei ( $\lambda_{\text{max}}$  714 nm) în timp a chitosanului funcționalizat cu AAs, (a)-  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  pur; (b)- chitosan pur; (c)- Cht-AAs.

### Exemplu de realizare a invenției

Într-un balon Erlenmeyer (200 ml) se adaugă 1,00 g de chitosan sub formă de praf. În acest balon se toarnă 100 ml de acid acetic de 1 % și se amestecă cu agitatorul magnetic până la solubilizarea chitosanului. După aceasta se adaugă în același vas 1,10 g de acid ascorbic (raport molar Cht:AAAs=1:1), se conectează refrigerentul și se încălzește timp de 3 ore la temperatura de 100°C (acidul ascorbic se oxidează în dehidroascorbic numai după 6 ore de tratament termic de 100°C). După finalizarea timpului de reacție, amestecul se precipită, se filtrează și se usucă sub vid.

Mecanismul reacției dintre chitosan și acid ascorbic este reprezentat în figura 1. Acest mecanism reprezintă funcționalizarea chitosanului cu acid ascorbic prin interacțiunea grupelor amine (-NH<sub>2</sub>) și hidroxil (-OH) cu eliminarea unei molecule de apă. Reacția are loc la 100°C timp de 3 ore.

Inițial a fost obținut spectrul IR al chitosanului (fig. 2) pentru a vedea picurile caracteristice acestuia. Picul cu intensitatea cea mai puternică la frecvența 1023 cm<sup>-1</sup> ne arată prezența grupei eterice, -OH și -NH<sub>2</sub>, banda lată în regiunea 3400-2500 cm<sup>-1</sup> și picul amprentei digitale 890 cm<sup>-1</sup> – prezența grupei -OH, două picuri în regiunea 3300 cm<sup>-1</sup> – prezența grupei -NH<sub>2</sub>, picul 2865 cm<sup>-1</sup> – prezența grupei metin.

Din spectrul IR (fig. 3) a compozitului Cht:AAAs (1:1, 2 ore, 100°C) s-a constatat că banda lată în regiunea 3400-2500 cm<sup>-1</sup> și picul amprentei digitale 829 cm<sup>-1</sup> indică prezența grupei -OH, această bandă fiind mărită. Picul la frecvența 3222 cm<sup>-1</sup> ne arată prezența grupei -NH, picurile 2987, 2896, 1379, 1255 cm<sup>-1</sup> prezența grupelor -CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>. Picurile 1712, 1570 cm<sup>-1</sup> indică prezența cetonei, picurile 1712, 1570, 1405 cm<sup>-1</sup> – prezența -C=C-.

Din rezultatele prezentate se constată că a avut loc funcționalizarea chitosanului cu AAAs la gruparea -NH<sub>2</sub>.

Pentru a demonstra că a avut loc interacțiunea dintre chitosan și acidul ascorbic a fost obținut spectrul IR al amestecului de acești 2 componenți.

În figură 4 se observă că interacțiunea nu a avut loc din motivul că spectrul IR se aseamănă cu cel al acidului ascorbic și se deosebește de spectrul compozitului obținut.

Picurile chitosanului și acidului ascorbic s-au suprapus fără modificări, pe când în urma sintezei compozitului Cht-AAAs apar schimbări pronunțate.

A fost determinată cantitatea de AAAs care s-a funcționalizat cu chitosan prin metoda spectrofotometrică.

Principiul metodei. Acidul ascorbic absoarbe în domeniul UV având maximum de absorbție la  $\lambda_{\max}$  243 nm. S-a construit curba de calibrare pentru AAAs pur, ea fiind reprezentată în figura 5, s-a obținut ecuația dreptei, iar prin utilizarea acestei ecuații se determină concentrația de AAAs în compozitul obținut.

Se prepară un șir de soluții de AAAs de diferite concentrații în intervalul 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-4</sup> M și analizându-se în UV se construiește curba de calibrare.

Calcul:  $A(\text{Cht-AAAs}) = 0,490$ ;  $x = (0,490 + 0,0003) / 0,1283 = 3,82 \cdot 10^{-5}$  M.

Concentrația acidului ascorbic în compozit este  $C_{\text{AAAs}} = 3,82 \cdot 10^{-5}$  M.

$C_{\text{AAAs}} = 3,82 \cdot 10^{-5} \cdot 176 \text{ g/mol} = 6,72 \text{ mg/l}$

Determinăm concentrația procentuală a AAAs în compozitul obținut:

$X(\text{AAAs}) = ([\text{AAAs}] / [\text{Cht-AAAs}]) \cdot 100 \% = (6,72 \text{ mg/l} / 60 \text{ mg/l}) \cdot 100 \% = 11,2 \%$

În continuare a fost determinată activitatea antioxidantă a chitosanului funcționalizat cu AAAs prin metoda DPPH.

Principiul metodei. DPPH sau 2,2-difenil-1-picrilhidrazil generează în sistem un radical stabil DPPH, care ulterior interacționează cu antioxidantul, consumându-se. În rezultat are loc decolorarea soluției (datorită consumării DPPH), care virează de la violet la galben. S-a determinat variația în timp a densității optice a DPPH la lungimea de undă 517 nm în funcție de concentrația antioxidantului. Mecanismul de interacțiune a DPPH cu reductorii este prezentat în figura 6.

Au fost calculate conținuturile de DPPH % în toate sistemele modelate, după formula:

$$W(\text{DPPH}) = \frac{A_t}{A_o} \times 100\%$$

unde:  $A_t$  – absorbanta la un timp anumit,  $A_o$  – absorbanta la  $t=0$  min.

Ulterior a fost construită dependența  $W(\text{DPPH}) = f(t)$  reprezentată în figura 7 pentru acid ascorbic pur și în figura 8 pentru copolimer.

S-a determinat concentrația procentuală a radicalului DPPH, care este o particulă oxidativă, după interacțiunea în timp cu diferite concentrații de AAAs. Ulterior a fost construită dependența  $W(\text{DPPH}) = f(t)$  reprezentată în figura 7 pentru acid ascorbic pur. Din acest grafic se observă că, cu cât este mai mare concentrația AAAs, cu atât mai repede scade concentrația DPPH.

S-a determinat concentrația procentuală a radicalului DPPH și după interacțiunea în timp cu diferite concentrații de copolimer Cht-AAAs. Similar a fost construită dependența  $W(\text{DPPH}) = f(t)$ , reprezentată în figura 8 pentru copolimer, în care se observă că, cu cât este mai mare concentrația copolimerului dat, cu atât mai repede scade concentrația DPPH.

În continuare a fost determinată concentrația eficientă  $CE_{50}$ , care este definită ca cantitatea de antioxidant necesară pentru diminuarea concentrației inițiale de DPPH cu 50%. Au fost determinate conținuturile (%) la echilibru de DPPH în funcție de concentrația antioxidantului și s-a calculat raportul molar: [Antioxidant] : [DPPH].

Din graficul obținut a fost determinată  $EC_{50}$ , și puterea antiradicalică (PAR):

- pentru AAAs pur:  $EC_{50} = 0,70$ ;  $PAR = 1 / EC_{50} = 1,43$ ;

- pentru  $[AAs]_{Cht}$  din Cht: AAs:  $EC_{50}=0,70$ ;  $PAR=1/EC_{50} = 1,43$ .

Puterea antiradicalică a  $[AAs]_{teor.}$  din Cht-AAs este egală cu a reducătorului AAs pur. Prin această funcționalizare se mărește timpul de prolongare a reducătorului, el fiind eliberat într-un timp mai lung și nu interacționează deodată cu particulele oxidative ca AAs pur.

Pentru determinarea activității antioxidante totale a fost folosită metoda ABTS<sup>+</sup>.

Principiul metodei. Testul ABTS cu utilizarea ATBS<sup>+</sup> cation-radicalului (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-acid sulfonic), permite evaluarea activității antioxidante totale (AAT) a antioxidanților, structura chimică a ABTS<sup>+</sup> fiind reprezentată în figura 9.

Soluția de lucru de ABTS<sup>+</sup> se prepară prin diluarea soluției inițiale de ABTS<sup>+</sup> cu alcool etilic de 70%, până la obținerea densității optice a acesteia egală cu  $0,7 \pm 0,03$ , măsurată la lungimea de undă de 734 nm.

În figura 10 sunt prezentate curbele cinetice de consum a ATBS<sup>+</sup>, ATBS<sup>+</sup> cation-radicalul (particulă oxidativă) se consumă la interacțiunea cu antioxidanții testați. Consumul de ATBS<sup>+</sup> cation-radical este cu atât mai mare cu cât este mai mare concentrația antioxidanților.

Activitatea antioxidantă totală a fost calculată după formula dată:

$$AAT = \frac{T0a - T1a}{T0a} - \frac{T0b - T1b}{T0b}$$

unde:

- T0a și T1a sunt absorbanțele la 0 și la 1 min, respectiv, ale probelor de analiză,
- T0b și T1b sunt absorbanțele probei martor.

Din datele obținute în figura 10 se construiește graficul dependenței AAT în funcție de concentrația antioxidantului reprezentat în figura 11.

Activitatea antioxidantă a acidului ascorbic crește odată cu mărirea concentrației acestuia.

Pentru a compara activitatea antioxidantă a AAs pur și Cht-AAs a fost studiată AAT a compozitului Cht-AAs. În figura 12 este prezentată variația absorbantei la  $\lambda_{max}$  714 nm a ATBS<sup>+</sup> pentru: (a)- ABTS<sup>+</sup> pur; (b)- chitosan pur; (c)- Cht-AAs. Din figură se observă că AAT a Cht:AAs este cu mult mai înaltă decât a chitosanului pur (fig. 12).

În baza datelor experimentale au fost calculate AAT pentru diferite probe și s-a constatat că activitatea antioxidantă a copolimerului Cht-AAs este cu 16,7 % mai mare decât a acidului ascorbic pur, la aceeași concentrație de AAs (tab. 1).

Tabelul 1

Activitatea antioxidantă totală (ABTS<sup>+</sup>) a compozitului și a AAs pur după [AAs]

C(AAs), M · 10 <sup>-4</sup>	0	2,03	2,0	2,03
	Cht (2 · 10 <sup>-3</sup> M)	Cht-AAs	AAs pur	AAs pur
AAT	0,009	0,293	0,232	0,244

Din rezultatele prezentate în tabelul 2 observăm că compozitul obținut este solubil în apă, HCl (0,1 N) și acid acetic de 1 %, ceea ce nu se obține în cazul altor procedee.

Tabelul 2

Solubilitatea compozitelor obținute

Compozitul Solventul	Cht-AAs, 24 ore, t=25°C		Cht-AAs, 2 ore, t=100°C		Cht-AAs, 3 ore, t=100°C	
	Concen- trația, mg/ml	Solubilita- tea	Concen- trația, mg/ml	Solubilita- tea	Concen- trația, mg/ml	Solubilita- tea
H <sub>2</sub> O distilată	3	I	3,4	P	3	S
HCl, 0,1 N	3	I	3,4	P	3	S
Acid acetic, 1%	3	S	3,2	S	3	S

I-Insolubil, S-solubil, P- puțin solubil