Invenţia se referă la domeniul biochimiei şi medicinei, în particular la un procedeu de obţinere a unui material polimeric cu proprietăţi antioxidante din copolimer de chitosan cu quercetină, şi poate fi utilizată în domeniul medicinei, farmaceuticii.

Este cunoscut procedeul de grefare a polifenolilor la chitosan cu utilizarea catalizatorului 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimid hidroclorură (EDAC) [1], caracteristic pentru polifenoli ce conţin în structura lor gruparea carboxilică. Acest procedeu este prea complicat şi necesită un catalizator dificil de obţinut.

Dezavantaje:

- catalizator cu structură chimică complicată;
- preţ de cost prea înalt;
- randament relativ mic (30-35%).

Cel mai apropiat de procedeul revendicat este procedeul de grefare a quercetinei şi altor polifenoli la chitosan cu ajutorul enzimei cloroperoxidaza (CPO) [2], ce include la prima etapă oxidarea quercetinei pînă la o-chinonă, ce la cataliza enzimatică reacţionează cu grupa amină din structura chitosanului, formând un derivat grefat al chitosanului cu quercetină. Acest procedeu este destul de complicat, îndeosebi la etapa de oxidare a quercetinei, necesită enzima cloroperoxidaza, dificil de obţinut şi are următoarele dezavantaje:

- procesul de oxidare a quercetinei este dificil de controlat, fiindcă se formează mai mulţi compuşi;
- enzima CPO este greu de obţinut şi are un preţ de cost foarte înalt.

Problema pe care o rezolvă invenţia constă în elaborarea unui procedeu de grefare a quercetinei la copolimeri din chitosan fără utilizarea enzimelor şi cu mult mai uşor de controlat.

Problema este rezolvată prin procedeul de grefare a quercetinei la copolimer din chitosan cu anhidridă maleică, care include amestecarea la agitare a chitosanului şi a anhidridei maleice în raport molar de 1:1, dizolvate în dimetilformamidă, tratarea soluţiei obţinute cu clorformiat de etil la temperatura de 0-5°C în prezenţa trietilaminei, adăugarea soluţiei de quercetină în dimetiformamidă în cantitate ce asigură obţinerea concentraţiei de quercetină în copolimer de 10-50 mol%, menţinerea la temperatura camerei, decantarea şi evaporarea solventului.

Rezultatul tehnic al invenţiei constă în obţinerea unui copolimer nou din chitosan, anhidridă maleică şi quercetină printr-un procedeu ce nu necesită utilizarea enzimelor, în condiţii uşor de controlat şi cu proprietăţi antioxidante bune.

Rezultatul tehnic obţinut este cauzat de activitatea chimică înaltă a anhidridei maleice şi clorformiatului de etil în procesul de grefare a quercetinei.

Materialul polimeric obţinut cu proprietăţi antioxidante prezintă interes pentru practica medicinală, în special la preîntâmpinarea cancerului şi a altor maladii.

Invenţia este ilustrată în 4 figuri care prezintă:

Fig. 1, Spectrul IR pentru copolimerul suport chitosan cu anhidridă maleică;

Fig. 2, Spectrul IR pentru copolimerul chitosan cu anhidridă maleică, funcţionalizat cu quercetină;

Fig. ,3 Schema instalaţiei de cercetare a efectului de prolongare a eliberării quercetinei;

Fig. 4, Variaţia intensităţii benzii de absorbţie pentru quercetină λ=380 nm (curba 1) şi pentru copolimer funcţionalizat cu quercetină λ=275 nm (curba 2).

Exemplu de realizare a invenţiei

Sinteza 1 (coplolimerul suport).

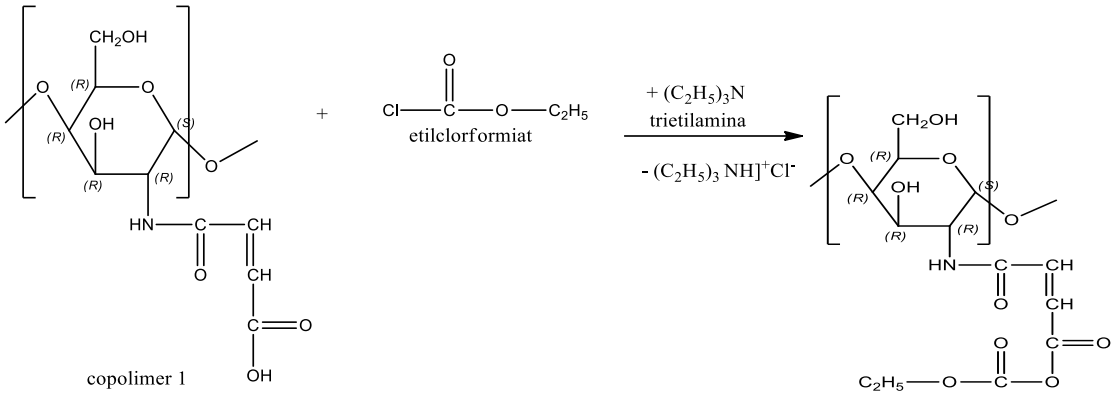
Pentru sinteza copolimerului suport de chitosan cu anhidridă maleică (AM) se ia 1,0 g (0,006 mol) de chitosan care se dizolvă în 80,0 mL de dimetilformamidă şi se agită. La această soluţie se adaugă soluţie de anhidridă maleică (0,6 g sau 0,006 mol, dizolvată în 30 mL de dimetilformamidă). Amestecul de chitosan şi anhidridă maleică s-a agitat timp de 240 minute continuu, la temperatura camerei şi alte 120 minute la temperatura de 50°C.

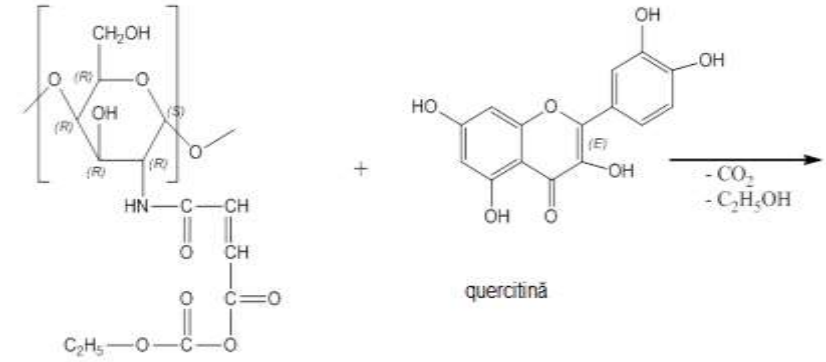
Sinteza 2 (copolimerul suport grefat cu quercetină).

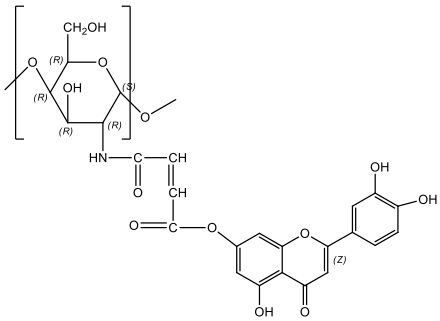
Într-un pahar cu volumul de 100 ml se cântăreşte 1g de copolimer de chitosan:AM (1:1) dizolvat în 20 ml dimetilformamidă (soluţia-emulsie 1). În alt pahar se dizolvă 0,453 g (0,0015 mol) quercetină în 10 ml DMF (soluţia 2).

Soluţia 1 se introduce în baia cu gheaţă şi la agitare se picură 2,3 ml de trietilamină în calitate de catalizator. După 15-20 minute la soluţia 1 se adaugă cu picătura la agitare 3,5 ml (0,032 mol) de clorformiat de etil. Amestecul obţinut se agită 10-15 minute şi la rece se adaugă cu picătura soluţia de quercetină (soluţia 2).

După 20-30 minute de agitare, soluţia obţinută se aduce la temperatura camerei şi se menţine 3-4 ore. După aceasta lichidul vâscos se decantează şi se evaporă solventul. Copolimerul obţinut se purifică prin sedimentare în hexan sau eter dietilic. Grefarea quercetinei la copolimer chitosan:AM s-a realizat conform schemei:







Finalizarea reacţiei chimice s-a verificat cu ajutorul cromatografiei pe strat subţire. Structura polimer-analogului obţinut a fost confirmată cu ajutorul spectroscopiei IR (fig. 1, 2).

Din spectre observăm schimbări esenţiale în spectrul copolimerului chitosan:anhidridă maleică grefat cu quercetina, îndeosebi prin apariţia unei benzi de absorbţie mare la frecvenţa ν=3500 cm^{-1} caracteristică grupărilor hidroxilice prezente în quercetină. Observăm apariţia unor vibraţii noi în diapazonul ν=3400-3500 cm^{-1} caracteristice grupelor amidice. La fel observăm apariţia unei benzi noi de absorbiţie la ν=1200 caracteristică grupelor hidroxilice. În spectre se mai observă şi alte schimbări (fig. 2) ce confirmă structura copolimerului funcţionalizat cu quercetină.

Testarea efectului de prolongare şi antioxidativ

Pentru depistarea efectului de prolongare, adică timpul de eliberare a quercetinei din materialul polimeric s-a utilizat o metodă de laborator bazată pe dializa quercetinei printr-o membrană semipermeabilă de celuloid cu grosimea de cca 10 µm. Schema instalaţiei pentru dializă este prezentată în figura 3. În paharul 1 s-au introdus 50 ml de dimetilformamidă. Tubul din sticlă 2, la una din deschiderile sale, s-a acoperit cu o membrană semipermeabilă 3, care a fost fixată de tub astfel încât să formeze o suprafaţă plană orientată spre exterior.

Tubul s-a introdus în paharul 1, în dimetilformamidă la o adâncime de 0,5 cm de fundul paharului. Apoi în tub s-a introdus soluţia analizată - quercetina dizolvată în DMF. Experimentul s-a înfăptuit la temperatura camerei 20-22°C. Peste fiecare 10 minute din paharul 1 s-a luat 1 ml de soluţie, în care prin metoda spectrofotometrică „UV-VIS'' s-a depistat conţinutul quercetinei (λ=280 nm). Pentru menţinerea volumului de solvent în pahar la fiecare măsurare s-a adăugat 1 ml de solvent DMF.

Din rezultatele obţinute (fig. 3) s-a constatat că quercetina individuală trece prin membrana semipermeabilă în decurs de 50-60 minute. Pe curba 1 (fig. 4) se observă o saturaţie, pe când quercetina grefată la material polimeric traversează membrana în decurs de 5 ore (Fig. 4, curba 2).

Testarea parametrilor de antioxidant se realizează prin metoda ABTS·+ (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-acid sulfonic) care permite evaluarea activităţii antioxidative totale (AAT) a antioxidanţilor. Soluţia de lucru de ABTS·+ se prepară prin diluarea soluţiei iniţiale de ABTS·+ cu alcool etilic de 70 %, până la obţinerea densităţii optice a acesteia egală cu 0,7 ± 0,03, măsurată la lungimea de undă de 734 nm. La analiza copolimerului se ia 3 mL soluţie de ABTS·+ şi 30 µl soluţie de copolimer (10 µg/ml).

La interacţinea substanţelor reducătoare cu ABTS·+ intensitatea culorii se micşoreză în funcţie de concentraţia antioxidantului.
Activitatea antioxidantă totală a fost calculată după formula :
AAT=(T0a-T1a)/T0a-(T0b-T1b)/T0b,
unde:
T0a şi T1a sunt absorbanţele la 0 şi la 1 min respectiv, ale probelor de analiză,
T0b şi T1b sunt absorbanţele probei martor.
Rezultatele experimentale sunt prezentate în tabel.
Tabel

N d/o	Masa substanţelor (g)		Compoziţia copolimerului final (mol%)		Proprietăţi antioxidative (u. c.)
	Polimer suport	Quercetină	Polimer suport	Quercetină	
1.	1,0	0,45	50	50	0,92
2.	0,5	0,16	70	30	0,82
3.	0,5	0,06	90	10	0,50
4.	Quercetină				0,92