

Invenția se referă la domeniul medicinei și farmaceuticii, și anume la materiale polimerice cu proprietăți antibacteriene pe bază de chitosan.

La grupa de preparate antibacteriene pe bază de nitrofuran se referă izofuralul, furacilina și altele, posedând un spectru larg de acțiune, fiind active față de multe bacterii Gram negative (*Escherihia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*) și Gram pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*).

Preparatele antibacteriene cunoscute ca izofuralul și furacilina, utilizate în practica farmaceutică sub formă de pastile, soluție sau unguente [1], se mențin pe piața farmaceutică mai mult de 50 de ani, dar posedă și unele dezavantaje:

- solubilitate neînsemnată în apă și dimetilformamidă ;
- timp redus (până la 60 de minute) de acțiune în organismul uman.

Cel mai aproape de invenția propusă este poliglucida naturală chitosanul [2], ce se obține prin extracție sub formă de chitină din scheletul de creveți și raci, ciuperci și alte specii ale regnului animalier și vegetal. Chitina este ușor transformată în chitosan. Este cunoscut faptul că chitosanul posedă activitate antibacteriană de 100 - 300 μg/mL, dar posedă și unele neajunsuri:

- activitate biologică mai mică decât a izofuralului sau furacilinei;
- puțin solubil în apă;
- nepeliculogen.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unor materiale polimerice din chitosan cu proprietăți antibacteriene la nivelul preparatelor izofural și furacilină cu activitate prelungită, solubilitate mai bună în apă, alcool și alți solvenți organici.

Conform invenției, se propune un material polimeric cu proprietăți antibacteriene, care constă dintr-un copolimer de chitosan cu anhidrida maleică, grefat cu izofural sau furacilină, cu un conținut de izofural sau furacilină de 10-30 mol %.

Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că materialul polimeric elaborat posedă acțiune antibacteriană la nivelul preparatelor izofural sau furacilina, însă cu activitate prelungită datorită activității antibacteriene prelungite a chitosanului, cât și solubilitate de 2-3 ori mai bună în apă, alcool și solvenți organici.

Invenția este argumentată prin studiul și analiza rezultatelor ilustrate suplimentar cu 5 tabele și 3 figuri, care reprezintă:

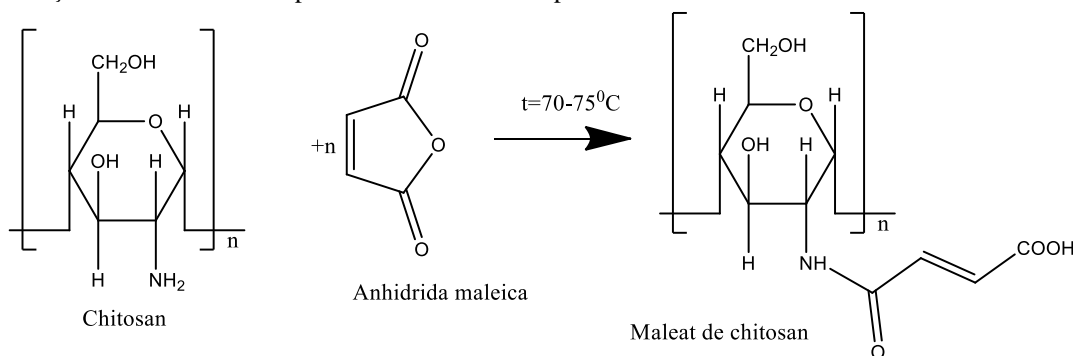
- fig. 1, spectrul IR al polimerului suport chitosan;
- fig. 2, spectrul IR pentru chitosan funcționalizat cu anhidrida maleică;
- fig. 3, spectrul IR pentru chitosan funcționalizat cu furacilină.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Sinteza polimerului suport

Pentru sinteza polimerului suport chitosan-anhidrida maleică, la 1,0 g de chitosan dizolvat în 50 mL de dimetilformamidă (DMF) (soluția 1), se picură soluția 2, ce constă din 0,6 g de anhidridă maleică în 20 ml DMF. Reacția se realizează la temperatura de 70-75°C timp de 3 ore conform schemei:



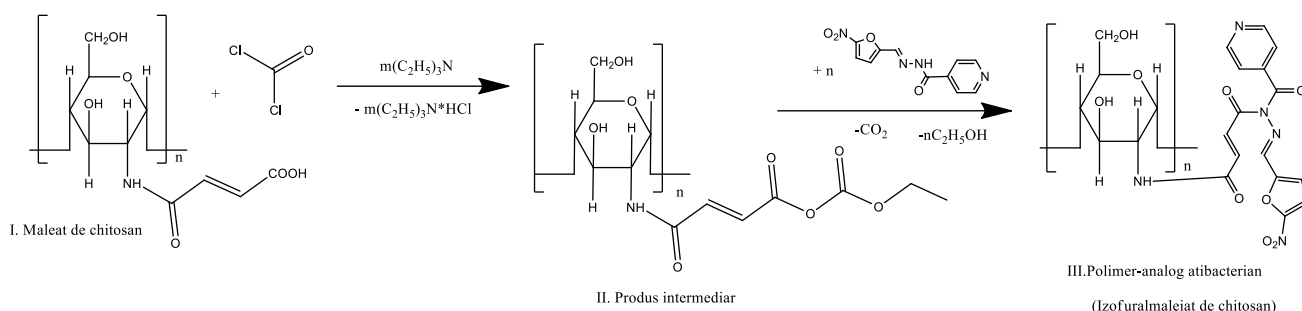
Schema reacției de funcționalizare a anhidridei maleice la chitosan

Produsul de reacție maleat de chitosan (MLC) se separă de DMF la distilare în vid și se usucă în exsicator, iar apoi se utilizează pentru sinteza din exemplul 2. Din IR-spectrul acestui polimer (Fig. 2) observăm apariția vibrațiilor noi în comparație cu chitosanul (Fig. 1) la frecvența de 1540-1590 cm^{-1} , caracteristică grupelor -NH-CO- și $\nu = 850-890 \text{ cm}^{-1}$, caracteristică legăturii duble și la 2400-2650 cm^{-1} pentru grupele carboxilice.

Exemplul 2

Funcționalizarea izofuralului (furacilinei) la maleatul de chitosan cu compoziția 70:30 mol %

1,0 g de MLC se dizolvă în 20 ml DMF, se adaugă 0,8 mL de etilcloroformiat timp de 10 minute sub agitare, la care se adaugă 0,6 g de izofural dizolvat în 30 ml DMF prin picurare și agitare.



Schema reacției pentru Exemplul 2

Soluția se mai agită 3-4 ore la temperatura de 40°C. După distilarea DMF se purifică prin sedimentare în eter dietilic. Randamentul constituie ~73%. Din spectrele IR observăm creșterea benzii $\nu = 1540-1590 \text{ cm}^{-1}$, caracteristice grupelor noi, cât și la $\nu = 3200-3300 \text{ cm}^{-1}$, caracteristice grupelor amine secundare și terțiare, cât și modificarea altor grupe.

Testarea activității antibacteriene (bacteriostatice și bactericide).

Substanțele Chitosan-IZF (70:30) și Chitosan-furacilină (70:30) au fost dizolvate în dimetilformamidă (cu concentrația de 10 mg/mL). Cercetările au fost efectuate prin metoda diluărilor în serie în mediul nutritiv lichid (bulion peptonat din carne 2%, pH=7,0).

În calitate de culturi de referință au fost folosite: *Staphylococcus aureus* (tulpina 209), *Staphylococcus aureus* (MRS), *Staphylococcus epidermidis* (MRS), *Enterococcus faecalis* (t. ATCC 19433), *Escherichia coli* (t. ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (t. ATCC 3177), *Klebsiella pneumoniae* (t. 3534/51), *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*.

Culturile de microorganisme, crescute timp de 24 de ore pe agar peptonat înclinat, au fost spălate cu soluție izotonică de clorură de sodiu și diluate până la nivelul standardului optic de turbiditate cu obținerea inoculelor ce conțin 1 mln de corpi microbieni în 1 mL de mediu. Inoculele obținute au fost diluate cu substanțele studiate în raport de 1:1.

Culturile obținute au fost supuse incubării la temperatura de 37°C (timp de 24, 48-144 ore). În calitate de control au servit mediile nutritive însămânțate cu aceleași tulpini fără conținutul compusului studiat. Evaluarea rezultatelor s-a efectuat vizual.

Activitatea bacteriostatică (concentrația minimă de inhibiție (CMI)) s-a stabilit în cazul lipsei creșterii microorganismelor în mediul nutritiv lichid. Activitatea bactericidă (concentrația minimă bactericidă (CMB)) s-a determinat în baza lipsei creșterii microorganismelor după însămânțarea repetată pe geloză peptonată cu incubarea ulterioară timp de 24, 48, 72 ore.

Rezultatele obținute sunt expuse în tabelele 1-5.

Rezultatele investigațiilor demonstrează că substanțele cercetate au manifestat activitate antibacteriană înaltă față de culturile Gram pozitive *Staphylococcus aureus* (tulpina 209), *Staphylococcus aureus* (MRS), *Staphylococcus epidermidis* (MRS), *Enterococcus faecalis* (t. ATCC 19433) și Gram negative *Escherichia coli* (t. ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (t. 3534/51), *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*.

Activitatea bacteriostatică a substanței Chitosan-IZF (70:30) variază în limitele concentrațiilor 18,75- $\geq 300 \mu\text{g/mL}$, activitatea bactericidă în limitele 75- $\geq 300 \mu\text{g/mL}$.

Activitatea bacteriostatică a substanței Chitosan-furacilină (70:30) variază în limitele concentrațiilor 18,75- $\geq 300 \mu\text{g/mL}$, activitatea bactericidă a substanței Chitosan-furacilină (70:30) variază în limitele concentrațiilor 75- $\geq 300 \mu\text{g/mL}$.

Ca rezultat, s-a demonstrat că materialul polimeric are avantaje, manifestând o activitate antibacteriană la nivelul izofuralului sau furacilinei, dar având o acțiune mai prolongată comparativ cu aceste preparate.

Tabelul 1

Activitatea bacteriostatică a substanței Chitosan-IZF (70:30) pe perioadă prolongată
Concentrația minimă de inhibiție ($\mu\text{g/mL}$)

Test - culturi bacteriene												
Doza	<i>S. aureus</i> (t. 209)			<i>S. aureus</i> (MRS)*			<i>S. epidermidis</i> (MRS)*			<i>E. faecalis</i> (t. ATCC 19433)		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
75	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
37,5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
18,75	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
9,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* MRS – meticilinrezistent

Continuare Tabelul 1

Tabelul 4

Activitatea bactericidă a substanței Chitosan-furacilină (70:30) pe perioadă prolongată
Concentrația minimă bactericidă ($\mu\text{g/mL}$)

Test - culturi bacteriene												
Doza	<i>S. aureus</i> (t. 209)			<i>S. aureus</i> (t. de la bolnav MRS)*			<i>S. epidermidis</i> (t. de la bolnav MRS)*			<i>E. faecalis</i> (t. ATCC 19433)		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
300	±	±	-	±	-	-	-	-	-	-	+	+
150	±	-	-	±	-	-	-	-	+	±	+	+
75	±	-	-	±	-	+	-	+	+	±	+	+
37,5	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+
18,75	±	±	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
9,37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* MRS – meticilinrezistent

Continuare Tabelul 4

Test - culturi bacteriene															
Doza	<i>E. coli</i> (t. ATCC 25922)			<i>Kl. pneumoniae</i> (t. 3534/51)			<i>S. typhimurium</i>			<i>P. mirabilis</i> (t. ATCC 3177)			<i>Acinetobacter baumannii</i>		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
300	-	-	-	±	-	-	±	-	-	+	+	+	-	-	-
150	-	-	-	±	-	-	±	-	-	+	+	+	+	-	-
75	+	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelul 5

Activitatea bacteriostatică și bactericidă a substanțelor Izofural, Furacilină și Chitosan

Compusul	Test - culturi bacteriene, ($\mu\text{g/mL}$)															
	<i>S. aureus</i> (t. 209)		MRSA (t. NCTC 12493)		<i>E. faecalis</i> (t. ATCC 19433)		<i>E. coli</i> (t. ATCC 25922)		<i>Kl. pneumoniae</i> (t. ATCC 3534/51)		<i>Ps. aeruginosa</i> (t. ATCC 27853)		<i>A. baumannii</i> (t. ATCC 19606)		<i>P. mirabilis</i> (t. ATCC 3177)	
	CMI	CM B	CMI	CM B	CMI	CM B	CMI	CMB	CMI	CM B	CMI	CMB	CMI	CM B	CMI	CM B
Izofural	4,6 8	9,3 7	4,6 8	9,3 7	18,7 5	37, 5	18,7 5	18,7 5	75, 0	75, 0	75, 0	300, 0	37, 5	75, 0	37, 5	75, 0
Furacilină	18,7	37,5	37,5	75,0	37,5	75,0	18,7	37,5	>30 0	>30 0	>30 0	>300	-	-	150, 0	>30 0
Chitosan	>30 0	>30 0	>30 0	>30 0	>300	>30 0	>300	>300	>30 0	>30 0	>30 0	>300	>30 0	>30 0	>30 0	>30 0