

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
FACULTATEA DE FARMACIE**

**STUDII FIZICO-CHIMICE PENTRU REALIZAREA
ȘI CARACTERIZAREA UNOR FORME
FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF.UNIV.DR. RODICA SÎRBU**

**DOCTORAND:
FARM. ALEF MUSTAFA**

BUCUREȘTI

2018

Mulțumiri

Pentru tot sprijinul, încrederea și atenția oferită vreau să-i mulțumesc în primul rând Doamnei Coordonator, Prof. univ. dr. Rodica Sîrbu, care mi-a îndrumat Teza de doctorat cu dedicație și responsabilitate. Doamna profesor mi-a fost mereu alături cu sfaturi, m-a încurajat și mi-a stimulat ambiția. Cu ajutorul dumneaei această Teză de doctorat a devenit o realitate și îi voi fi veșnic recunoscătoare.

Mulțumiri deosebite doamnei Decan Prof.dr. Doina Drăgănescu și tuturor domnilor profesori care m-au onorat cu prezența în cadrul comisiei de susținere a Tezei. Mulțumesc colegilor și cadrelor didactice din Facultatea de Farmacie – UMF Carol Davila, București, care mi-au oferit sprijin și înțelegere.

Vreau să mulțumesc îndeosebi, pentru tot ajutorul și încurajările oferite Domnului Prof. univ. dr. Constantin Mircioiu și Domnului Conf. univ. dr. Flavian Rădulescu.

Nu în ultimul rând, le mulțumesc din toată inima părinților mei, Ferudin și Suria Mustafa. Această lucrare este dedicată lor, ca o mărunță mulțumire pentru toate eforturile depuse în creșterea și educația mea. Cuvintele sunt insuficiente pentru a le arăta toată dragostea mea și vreau, prin toată munca pe care am adunat-o în aceste pagini, să le mulțumesc că mi-au dat tăria de a finaliza această teză.

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

INTRODUCERE

PARTEA A I-A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. CARACTERISTICILE PIELII, TRANSPORTUL TRANSDERMIC AL SUBSTANȚELOR ȘI MODELE REOLOGICE ALE FORMULĂRILOR FARMACEUTICE APLICATE TOPIC

I.1 Structura și funcțiile pielii

I.2 Absorbția transcutanată și difuziunea medicamentelor prin piele

I.3 Influența proprietăților fizico-chimice și structurale ale moleculelor bioactive în administrarea topică

I.4 Influența factorilor fiziologici asupra transportului medicamentelor topice

I.5 Modele și parametri reologici de caracterizare a formelor farmaceutice semisolide topice

I.6 Comportarea reologică a formelor semisolide topice

CAPITOLUL II. METODE DE ANALIZĂ ÎN CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI MICROBIOLOGICĂ A CHITOSANULUI

II.1 Metode de determinare a Gradului de Dezacetilare

II.1.1 Metode de titrare

II.1.2 Metode hidrolitice

II.1.3 Metode spectroscopice

II.2 Determinarea Masei Moleculare

II.3 Determinarea Capacității Antioxidante

II.3.1 Metode de captare a radicalilor liberi

II.3.2 Metode bazate pe potențialul non-radical redox

II.3.3 Capacitatea de chelare a metalelor

II.3.4 Conținutul total de polifenoli

II.4 Determinarea Activității Antimicrobiene

II.4.1 Metoda difuzimetrică

II.4.2 Metoda diluțiilor

CAPITOLUL III. VALORIFICAREA RESURSEI MARINE PENTRU OBȚINEREA CHITOSANULUI ȘI APLICAȚIILE SALE BIOMEDICALE

III.1 Obținere a chitosanului din diferite surse

III.2 Cercetari privind chitosanul obținut din surse diferite

III.3 Caracteristici ale chitinei și chitosanului

III.4 Proprietățile biologice ale chitosanului

III.5 Aplicațiile biomedicale ale chitosanului

III.6 Alte aplicații ale chitosanului

PARTEA A II-A. CONTRIBUȚII PERSONALE

Ipoieza de lucru și obiectivele generale ale tezei

Metodologia generală a cercetării

CAPITOLUL IV. OBȚINEREA CHITOSANULUI DIN RESURSĂ MARINĂ DIN MAREA NEAGRĂ

IV.1 Introducere

IV.2 Materiale și metodă de lucru

IV.3 Etapele procesului de extracție al chitosanului din resursă marină

IV.4 Rezultate și discuții

IV.5 Concluziile studiului

CAPITOLUL V. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A CHITOSANULUI OBȚINUT DIN *PACHYGRAPSUS MORMORATUS*

V.1 Introducere

V.2 Parametrii fizico-chimici ai chitosanului extras din *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră

V.2.1 Gradul de dezacetilare

V.2.2 Masa moleculară

V.2.3 Conținutul de cenușă

V.2.4 Conținutul de umiditate

V.2.5 Solubilitatea probelor de chitosan

V.2.6 Valoarea pH-ului

V.2.7 Analiza termogravimetrică (TGA)

V.2.8 Analiza spectrofotometrică în infraroșu (FT-IR)

V.2.9 Analiza prin microscopie electronică de baleiaj (SEM)

V.2.10 Analiza spectrofotometrică în UV-VIS

V.3 Discuții privind analizele fizico-chimice efectuate

V.4 Concluziile studiului

CAPITOLUL VI. FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN

VI.1. Chitosanul utilizat în tratamentul rănilor și arsurilor

VI.2 Studii privind comportarea reologică a unor forme farmaceutice pe bază de chitosan cu diverse alte substanțe active

VI.2.1 Creme pe bază de chitosan

VI.2.2 Studiul reologic al cremelor pe bază de chitosan

VI.2.3 Unguente pe bază de chitosan

VI.2.4 Studiul reologic al unguentelor pe bază de chitosan

VI.2.5 Bureți și pansamente cu chitosan

VI.3 Forme farmaceutice pe bază de chitosan și alge marine

VI.3.1 Unguente cu chitosan și extract de alge marine

VI.3.2 Reologia unguentelor cu chitosan și extract de alge marine

VI.3.3 Geluri de chitosan cu alge marine

VI.3.4 Comportarea reologică a gelurilor pe bază de chitosan și alge marine

VI.3.5 Pelicule/membrane de chitosan cu alge marine

VI.4 Concluziile studiului

CAPITOLUL VII. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE A NOILOR FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN

VII.1 Introducere

VII.2. Activitatea antioxidantă a extractelor de alge marine

VII.2.1. Determinarea conținutului de polifenoli totali prin metoda Folin-Ciocalteu

VII.2.2. Determinarea și separarea polifenolilor prin analiza HPLC

VII.3. Activitatea antioxidantă a chitosanului

VII.3.1. Puterea reducătoare cu FeCl_3

VII.3.2. Capacitatea de captare a radicalului 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – metoda DPPH

VII.3.3. Capacitatea de captare a radicalilor hidroxil

VII.4. Cercetări privind capacitatea antioxidantă a unui preparat obținut din chitosan, colagen și alge marine

VII.4.1. Determinarea activității antioxidante a compozitului marin prin metoda chemiluminescenței

VII.5. Concluziile studiului

CAPITOLUL VIII. CERCETĂRI PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A COMPUȘILOR FARMACEUTICI CU CHITOSAN

VIII.1 Introducere

VIII.2 Material și metode de lucru

VIII.3 Analiza activității antimicrobiene a chitosanului

VIII.4 Rezultate și discuții

VIII.5 Studiul activității antimicrobiene a formulărilor realizate cu chitosan

VIII.5.1 Testarea antimicrobiană a substanțelor active de origine marină

VIII.5.2 Analiza antimicrobiană a preparatelor compuse pe bază de chitosan

VIII.6 Rezultatele și discuțiile studiului efectuat

VIII.7. Concluziile studiului

CAPITOLUL IX. STUDII FARMACO-CINETICE *IN VITRO* PE FORMULĂRI SEMISOLIDE CU CHITOSAN

IX.1 Cinetica transportului membranar în absorbția transdermică

IX.2 Material și metodă

IX.3 Rezultatele experimentale

IX.4 Discuțiile studiului de cedare

IX.5 Concluziile studiului efectuat

CONCLUZII GENERALE

BIBLIOGRAFIE

ANEXE

INTRODUCERE

Terapiile alternative noi care folosesc medicamente cu principii bioactive de proveniență naturală au devenit foarte utile în practica medicală, constituind o preocupare serioasă pentru domeniul medico-farmaceutic în ultimii ani. Prin aceste demersuri de cercetare științifică s-a lărgit aria de preocupări luându-se în considerare cercetarea unor compuși bioactivi proveniți din resurse naturale.

O sursă extrem de valoroasă și accesibilă o reprezintă mediul marin, prin bogăția de organisme marine ce oferă materia primă de cercetare a extracției diverselor principii active. Marea Neagră oferă o sursă foarte diversă pentru cercetarea zooplanctonului și a fitoplanctonului din care se pot obține compuși bioactivi deosebit de importanți ce pot fi valorificați prin terapii alternative în tratarea diverselor afecțiuni. Prezenta **Teză de doctorat se încadrează** prin conținutul ei în cercetări asupra resurselor marine cu valorificări ale compușilor bioactivi în obținerea unor noi formulări farmaceutice.

Ipoteza de lucru în cercetarea efectuată a pornit de la obținerea chitosanului din crabul *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră, care este un crustaceu ce se găsește din abundență pe litoralul românesc. Din acest polizaharid (chitosanul extras) am obținut noi formulări farmaceutice.

Motivația temei de cercetare a fost generată de lipsa de competitivitate a medicamentelor pe bază de chitosan în țara noastră, dar și de importanța chitosanului cunoscută pe plan mondial, în utilizările din terapeutică, bazată pe proprietățile remarcabile ale acestui polizaharid, dintre care amintim în mod special, acțiunea antimicrobiană, antioxidantă și cicatrizantă.

Obiectivul general al Tezei a fost acela de a obține prin extracție chitosanul din carapacea crabilor *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră, și realizarea de forme farmaceutice pe baza acestui chitosan cu aplicații terapeutice. Toate formulările farmaceutice le-am caracterizat fizico-chimic și farmacologic. Pentru realizarea acestui obiectiv general am avut în vedere realizarea următoarelor **obiective specifice**:

- ✓ Obținerea, realizarea și optimizarea pentru prima dată a unui proces biotehnologic de extracție al chitosanului din carapacea dorsală a crabilor *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră și caracterizarea produselor de extracție.
- ✓ Caracterizarea celor doi chitosani obținuți, diferiți prin valorile maselor moleculare, prin analize fizico-chimice care au urmărit determinarea gradului de dezacetilare, puritatea, conținutului de cenușă, umiditatea, pH-ul, solubilitatea și caracteristicile fizico-chimice prin analize termogravimetrice și măsurători spectroscopice în UV-VIS și FT-IR și prin analize optice – SEM.
- ✓ Analiza posibilităților de utilizare în obținerea de formulări farmaceutice pe baza chitosanilor obținuți din resurse din Marea Neagră.
- ✓ Realizarea formulărilor semisolide de tipul hidrogeluri, pelicule, unguente cu utilizare topică, în care am folosit, ca principii active chitosanii singuri sau asociați cu alți compuși bioactivi, proveniți din alge și colagen de origine marină.
- ✓ Caracterizarea formulărilor realizate, cu evidențierea comportării reologice a activității antioxidante și antimicrobiene, aceste noi preparate putând constitui o alternativă la produsele farmaceutice convenționale existente.
- ✓ Alături de determinarea caracteristicilor fizico-chimice ale chitosanului am efectuat și studii fizico-chimice pentru evidențierea compușilor bioactivi pe materialele provenite din resurse marine. În acest sens, am determinat conținutul de polifenoli prin diferite metode (conținutul de polifenoli totali prin metoda Folin-Ciocalteu și prin metoda HPLC) pe algele marine, cu care am asociat chitosanii luați în studiu. Acest obiectiv specific a fost necesar să îl efectuăm pentru a evidenția activitatea antioxidantă a formulărilor semisolide realizate din chitosan și alge.
- ✓ Realizarea de teste *in vitro* pentru a evidenția cedarea substanțelor medicamentoase din preparatele pe bază de chitosan obținut din resurse marine din Marea Neagră și ketoconazol.

Importanța temei alese este evidențiată și susținută prin obiectivul general propus și încadrează Teza de doctorat în cadrul studiilor privind obținerea de medicamente din resurse marine. Tema aleasă este actuală, de mare complexitate ca studiu, fiind ancorată în cercetările moderne la nivel național și internațional. Tema se încadrează în liniile de cercetare cuprinse în programele de cercetare de valorificare a resurselor oferite de Marea Neagră, fiind inclus în proiectul câștigat în 2011 în cadrul Proiectelor Complexe – PCCDI cu tema *Valorificarea superioară complexă a biomasei marine ofetită de Marea Neagră*.

Originalitatea acestei Teze doctorale derivă în primul rând din investigarea unui polimer natural, extras pentru prima dată din carapacea speciei de crabi de piatră, *Pachygrapsus marmoratus*, din Marea Neagră. Teza constituie un **studiu original avansat de cercetare** a compușilor biologic activi din surse naturale din Marea Neagră și include realizarea **de noi forme farmaceutice semisolide cu aplicație topică**, precum geluri, unguente și membrane, atât din chitosan, cât și din asocierea acestuia cu alte substanțe de origine naturală: algele marine și colagenul din pește. Această abordare a substanțelor compozite din materiale naturale reprezintă **o nouă perspectivă de cercetare** pentru îmbunătățirea acțiunii și eficacității

formelor farmaceutice deja existente și crearea de noi compuși, non-invazivi, de toxicitate redusă, care să livreze rezultatele așteptate într-un timp mai scurt de vindecare.

Teza de doctorat prin conținutul ei, a necesitat cunoștințe teoretice și experimentale, având un profund **caracter interdisciplinar** prin utilizarea cunoștințelor de ecologie marină, biotehnologie, noțiuni avansate de chimie-fizică experimentală, tehnică farmaceutică, metode moderne de analiză (spectroscopie, metode optice, metode reologice) microbiologie, studii de farmaco-cinetică de cedare a substanțelor medicamentoase și analize statistice în evaluarea datelor de laborator. Proiectul depășește sfera importanței pur teoretice, având și o finalitate practică prin valorificarea ideii unui material natural, nontoxic și sigur, care a fost analizat și confirmat de rezultatele obținute, în industria farmaceutică și în medicină, prin realizarea unor forme farmaceutice semisolide cu aplicare topică, utilizare în vindecarea și cicatrizarea rănilor și arsurilor.

Teza este alcătuită din două părți. Partea I – stadiul actual al cunoașterii, ce cuprinde 3 capitole și partea a II-a – Contribuții personale, ce cuprinde 6 capitole. Teza este însoțită de capitolul de Introducere, Concluzii generale și Bibliografie.

Partea I – Stadiul actual al cunoașterii

Capitolul I - Caracteristicile pielii, transportul transdermic al substanțelor și modele reologice ale formulărilor farmaceutice aplicate topic, cuprinde informațiile din literatura de specialitate în ceea ce privește structura și funcțiile pielii, date despre absorbția transcutanată și difuziunea prin piele. Influența pe care o au factorii fiziologici asupra transportului transmembranar și metodele de îmbunătățire ale acestuia sunt aspecte foarte importante de luat în calcul. Tot în acest capitol sunt descrise modele și parametri de caracterizare reologică ale formelor farmaceutice semisolide cu aplicație topică.

Capitolul II - Metode de analiză în caracterizarea fizico-chimică și microbiologică a chitosanului, prezintă descrierea unor metode și tehnici de determinare a principalilor parametri funcționali ai chitosanului, adică gradul de dezacetilare și masa moleculară. Modalitățile de testare ale activității antioxidante și acțiunii antimicrobiene prin diferite metode chimice sunt relatate conform studiilor și cercetărilor regăsite în literatura de specialitate. Acest capitol sumarizează principalele metode de analiză fizico-chimică pentru determinarea valorilor parametrilor și acțiunilor antioxidante și antimicrobiene pe care le posedă chitosanul studiat.

Capitolul III - Valorificarea resursei marine pentru obținerea chitosanului și aplicațiile sale biomedicale, prezintă diferitele surse de proveniență ale chitosanului, pe care cercetătorii din domeniul de specialitate le-au folosit pentru a extrage acest biopolimer. Sursele de chitosan sunt variate, el fiind prezent atât în organismele marine, precum crabii, moluștele, scoici, creveții, dar și în anumite fungi și insecte cu carapace chitinoasă. Din acest motiv și metodele de obținere sunt diferite în funcție de fiecare sursă. Pentru chitină și chitosan sunt descrise caracteristici generale, structura, proprietățile și aplicațiile biomedicale și industriale pe care le dețin.

Partea a II – a - Contribuțiile personale cuprind:

Capitolul IV - Obținerea chitosanului din resursă marină din Marea Neagră, prezintă procedeul de extracție chimică al chitosanului din carapacele dorsale ale crabilor de piatră, specia *Pachygrapsus marmoratus*, din Marea Neagră. S-au urmărit anumiți pași de extracție, într-o ordine cronologică, și anume: etapa de deproteinizare, demineralizare, decolorare și dezacetilare alcalină puternică. Tehnica de lucru a presupus utilizarea a două variante de extracție, ce diferă prin condițiile de lucru, reactivii folosiți, temperatura și timpii de reacție. În urma acestor două variante de extracție am obținut doi chitosani diferiți ca mase moleculare.

Capitolul V - Caracterizarea fizico-chimică a chitosanului obținut din *Pachygrapsus marmoratus*, cuprinde caracterizarea celor doi chitosani obținuți prin extracție chimică din *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră, în capitolul anterior, prin analiza principalilor parametri fizico-chimici. Caracterizarea corectă și completă este foarte importantă pentru identificarea proprietăților fizico-chimice pe care le posedă chitosanul și stabilește efectele procesului de preparare asupra acestor proprietăți. În funcție de influența acestor caracteristici ale polimerului asupra aplicațiilor în care se folosește, domeniile de aplicabilitate sunt foarte variate. Pentru caracterizarea chitosanului obținut am analizat și determinat atributele calitative ale proprietăților fizico-chimice, precum: gradul de dezacetilare, masa moleculară, conținutul de cenușă, solubilitatea, umiditatea, valoarea pH-ului, iar pentru confirmarea structurii și compararea materialului extras de noi cu produsul standard luat ca referință, am realizat analize spectrofotometrice în infraroșu (FT-IR), în domeniul ultraviolet-vizibil (UV-VIS), dar și analize de microscopie electronică SEM și termogravimetrie TGA.

Capitolul VI - Forme farmaceutice pe bază de chitosan, cuprinde descrierea modului de preparare al diferitelor forme farmaceutice semisolide cu aplicație topică, sub formă de unguente și geluri, dar și bureți, pansamente, membrane și pelicule absorbabile pe bază de chitosan pe care l-am asociat cu alte substanțe ce prezintă acțiune antimicrobică, antiseptică și regenerantă și cu substanțe de origine naturală, precum algele marine, tot din Marea Neagră. Algele marine recoltate le-am pregătit sub formă de extracte

alcoolice pe care le-am încorporat în preparatele farmaceutice semisolide alături de chitosan. Dintre polimerii naturali, chitosanul prezintă un mare potențial pentru a fi utilizat în aplicații biomedicale și farmaceutice de tratare a rănilor și în vindecarea afecțiunilor de la nivel cutanat, datorită biocompatibilității, biodegradabilității și non-toxicității sale.

Studiile reologice s-au efectuat pe fiecare din probele rezultate, pentru a determina influența unui component adițional asupra vâscozității formei farmaceutice. Am folosit două vâscozimetre, unul model HAAKE Viscotester 550 VT, folosind sistemul de senzori MV1, și unul VISCOSTAR R Viscosimeter. Măsurătorile de vâscozitate efectuate pentru viteza de forfecare, vâscozitate și tensiunea de forfecare au rezultat în reogramele și curbele de vâscozitate care au fost analizate și comparate. S-a evidențiat caracterul pseudoplastic al gelurilor și unguentelor studiate.

Capitolul VII - Studiul activității antioxidante totale a noilor forme farmaceutice pe bază de chitosan, cuprinde metodele de investigare ale proprietății antioxidante a chitosanului extras chimic din specia de crab de piatră *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră. Analiza s-a efectuat atât pe chitosan ca substanță propriu-zisă de studiu, cât și pe combinații ale acestui polimer cu alte substanțe de origine marină. S-au luat în studiu 4 tipuri de alge marine (*Ulva lactuca*, *Cystoseira barbata*, *Ceramium rubrum* și *Cladophora vagabunda*), pregătite ca și extracte alcoolice. Chitosanul extras chimic a fost analizat pentru proprietățile antioxidante prin testarea a trei metode și mecanisme de acțiune, precum: puterea reducătoare cu $FeCl_3$, capacitatea de captare a radicalilor DPPH și a radicalilor hidroxil. De asemenea, am determinat capacitatea antioxidantă totală a unui compozit sub formă de hidrogel, obținut din chitosanul extras de noi în laborator, collagen și extract de alge marine, prin metoda chemiluminescenței. S-a evidențiat influența componentelor asociate în compozit asupra capacității antioxidante totale. Toate formulările studiate au prezentat capacitate antioxidantă marcantă. Rezultatele obținute arată faptul că proprietățile antioxidante ale chitosanului extras din *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră au crescut cu creșterea concentrației de chitosan din probele analizate. În comparație cu datele regăsite în literatura de specialitate pentru chitosanul comercial, luat ca referință în această cercetare, s-a observat că puterea reducătoare a chitosanului extras de noi este mai pronunțată decât a chitosanului comercial, însă valorile obținute pentru testarea capacității de captare a radicalilor hidroxil și DPPH au fost mai scăzute decât ale acestuia. Rezultatele înregistrate pentru probele de compozit marin (chitosan, alge, collagen) arată aceeași tendință de mărire a activității antioxidante cu creșterea concentrației compozitului.

Capitolul VIII - Cercetări privind activitatea antimicrobiană a compușilor farmaceutici cu chitosan, prezintă studiul microbiologic efectuat pentru determinarea activității antimicrobiene a chitosanului extras. În prima parte, s-a evidențiat proprietatea chitosanului de a inhiba dezvoltarea microorganismelor, prin testarea acestei acțiuni pe două tipuri de bacterii diferite (una Gram-pozitivă – *Staphylococcus aureus* și una Gram-negativă – *Escherichia coli*) și pe o specie de fungi (*Candida albicans*). În a doua parte, chitosanul a fost asociat cu alte substanțe naturale de origine marină, care de asemenea prezintă un caracter antimicrobian demonstrat, și anume collagenul și 3 specii de alge marine (două verzi - *Cladophora vagabunda*, *Ulva lactuca*, și una brună - *Cystoseira barbata*). Din această combinație de substanțe s-au realizat diferite formulări farmaceutice, precum: soluții, geluri, membrane și pelicule. Pentru formulările preparate s-a efectuat un studiu prin care s-a evidențiat caracterul antimicrobian superior pe care îl prezintă aceste formulări față de efectul fiecărui component luat separat. Activitatea antimicrobiană atestată și prin studiile noastre realizate atât pe soluțiile cu chitosan cât și pe peliculele realizate pe baza de chitosan evidențiază efectul antimicrobian asupra bacteriilor gram-pozitive *Staphylococcus aureus*, ridicat față de bacteriile gram-negative. Formulările tip gel pe bază de chitosan și collagen au exercitat un efect mai bun asupra bacililor gram-pozitivi de *S. aureus*, decât pe *E. coli*. La adăugarea extractelor algale în formulările compozite pe bază de chitosan și collagen, am observat o potențare a efectului inhibitoriu asupra ambelor tipuri de microorganisme analizate. Cel mai bun efect antibacterian s-a observat în cazul formulării tip compozit pe bază de chitosan CT 1, collagen și extracte de algă 20%, asupra bacilului *S. aureus*.

Capitolul IX - Studii farmaco-cinetice in vitro pe formulări semisolide cu chitosan, cuprinde analiza profilului de cedare al ketoconazolului în funcție de influența concentrației de chitosan din formulări semisolide pentru aplicație topică. Pentru studiul cedării substanțelor s-au pregătit probe de forme semisolide reprezentate de unguente tip U/A în care s-au încorporat două tipuri de chitosan, de două mase moleculare diferite, în 4 concentrații (10%, 20%, 30%, 40%) și o substanță de referință, ketoconazolul, care s-a menținut la o concentrație constantă de 2% în fiecare probă. Se constată că masa moleculară a celor doi chitosani luați în studiu influențează vizibil viteza de cedare. Astfel, formulările FII (cu chitosanul cu masă moleculară mai mare) au înregistrat viteze de cedare apreciabil mai mari decât formulările FI (cu chitosanul cu masă moleculară mai mică). Se constată că la ambele formulări FI și FII, cele mai mari viteze de cedare ale substanței active se înregistrează la concentrațiile de 10% chitosan față de cele de 20%, 30%, 40%, explicabil prin vâscozitățile formelor de 10% mai mici, comparativ cu celelalte. La aceleași concentrații de chitosan, în cazul formulărilor FII, cu masă moleculară mai mare (vâscozitatea unguentelor mai mare) se obțin viteze de cedare a substanței bioactive mai mari față de formulările FI.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE TEZEI

Obiectivul Principal al Tezei de Doctorat îl reprezintă în primul rând extracția și obținerea chitosanului din resursă marină din Marea Neagră. În acest context, am extras pentru prima oară chitosanul din specia de crab de piatră, *Pachygrapsus marmoratus*, ce se găsește pe litoralul Mării Negre. **Caracterizarea proprietăților și parametrilor fundamentali** ai polimerului de interes s-a realizat prin analize fizico-chimice cu scopul de a confirma structura și a determina parametrii fizico-chimici principali.

Un alt obiectiv al Tezei, a fost realizarea unor formulări farmaceutice cu acțiune topică pe bază de chitosan și alte substanțe de origine naturală cu acțiune terapeutică. Formele farmaceutice au fost preparate prin încorporarea chitosanului simplu și a celorlate substanțe, precum algele marine și colagenul din pește, în forme semisolide, cu obținerea de creme, geluri, unguente, membrane și pelicule resorbabile. Aceste preparate semisolide obținute au fost supuse mai multor teste pentru optimizarea acțiunii farmacologice a substanțelor active folosite. **Caracterizarea formelor farmaceutice cu chitosan cu destinație topică** s-a realizat prin analizele fizico-chimice ale caracteristicilor reologice și prin testarea capacității antioxidante totale, a acțiunii antimicrobiene, atât a chitosanului singur în formulare, cât și în formule compozite cu celelalte substanțe.

METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII

Metodologia generală de analiză și cercetare a Tezei pornește de la extracția și caracterizarea chitosanului și continuă cu formularea și analiza fizico-chimică a formelor farmaceutice.

Extracția s-a realizat prin punerea la punct a două biotehnologii diferite de extracție chimică care au condus la obținerea a două tipuri de chitosan, cu caracteristici diferite. Cei doi chitosani obținuți din *Pachygrapsus marmoratus* au fost caracterizați separat prin analize fizico-chimice cu scopul de a confirma structura și a determina parametrii fizico-chimici principali. Testele de microscopie electronică, spectroscopie FT-IT și UV-VIS au ajutat la stabilirea și confirmarea datelor privind structura chitosanului extras chimic.

Pe baza chitosanilor obținuți s-au realizat forme farmaceutice semisolide, de tipul cremelor, gelurilor, unguentelor și peliculelor. Aceste formulări semisolide s-au caracterizat prin analize fizico-chimice de reologie pentru stabilirea parametrilor de vâscozitate, prin teste microbiologice analizând acțiunea inhibitorie asupra diferitelor microorganismelor patogene, prin determinarea activității antioxidante totale și a conținutului de polifenoli. De asemenea, s-au efectuat studii de cedare a substanțelor active din formulările farmaceutice realizate care analizează fenomenul de difuzie prin piele după aplicarea topică.

CAPITOLUL IV

OBȚINEREA CHITOSANULUI DIN RESURSĂ MARINĂ DIN MAREA NEAGRĂ

Obiectivele studiului

Pentru obținerea chitosanului am pornit de la extracția chitinei prin metoda chimică din carapacele dorsale ale crabilor de piatră specia *Pachygrapsus marmoratus*, din Marea Neagră, fiind o specie de crustacee ce se găsește din abundență pe litoralul Mării Negre.

În obținerea chitinei din material brut am urmărit anumiți pași, într-o ordine cronologică, și anume: etapa de deproteinizare, demineralizare, decolorare și apoi am transformat chitina în chitosan printr-o metodă de dezacetilare alcalină puternică. Tehnica de lucru a presupus utilizarea a două variante de extracție, ce diferă prin condițiile de lucru, reactivii folosiți, temperatura și timpii de reacție. În urma acestor două variante de extracție am obținut doi chitosani diferiți ca mase moleculare, proprietăți și caracteristici funcționale.

IV.3 ETAPELE PROCESULUI DE EXTRACȚIE AL CHITOSANULUI DIN RESURSĂ MARINĂ

Procesul chimic de obținere al chitosanului din carapacea de crab urmărește mai multe etape, și anume: deproteinizarea - etapă ce dizolvă proteinele și glucidele, demineralizarea - care înlătură carbonatul de calciu și celelalte minerale, decolorarea - procesul de extracție al carotenoizilor și altor coloranți, și dezacetilarea - care reprezintă procesul de transformare al chitinei în chitosan.

IV.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin cele două variante de extracție am obținut doi chitosani diferiți, atât din punct de vedere al caracteristicilor, cât și prin culoare, textură și aspect macromolecular.

În urma variantei 1 de extracție (V1) a rezultat un chitosan (CT 1) cu aspect fin, de culoare albă, slab gălbuie. Chitosanul CT 2, obținut prin varianta 2 de extracție (V2) are aspect mai grunjos, o culoare maronie. O importanță mare trebuie acordată fiecărei reacții în parte, dar și reactivilor și temperaturilor folosite în cadrul variantelor de extracție deoarece acești factori influențează parametrii importanți în caracterizarea și calitatea chitosanului obținut.

Randamentul de Reacție

Randamentul unei reacții oferă informații despre gradul de eficiență al unei reacții chimice sau proces biotehnologic. Se exprimă procentual și este raportul dintre masa materiei prime luate în lucru și masa produșilor de reacție transformați. Randamentul de reacție a fost obținut prin compararea masei materialului brut cu masa chitosanului extras chimic. Am calculat randamentele de obținere ale chitosanilor extrași din carapacele uscate ale crabilor de piatră, prin cele două variante V1 și V2, pentru a observa influența pe care o au condițiile de lucru și reactivii folosiți în etapele procesului de extracție. Valorile randamentelor de obținere ale chitosanilor extrași chimic prin variantele V1 și V2 sunt prezentate comparativ în Fig.IV.17:

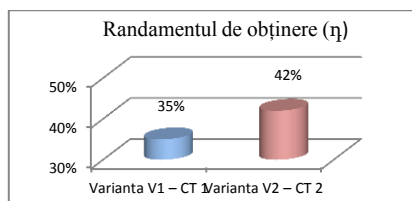


Fig.IV.17. Valorile randamentelor de obținere ale chitosanilor chimic prin variantele V1 și V2

Din Fig. IV.17 se poate observa o diferență între cantitățile de obținere ale chitosanului prin cele două variante de extracție. Diferența dintre varianta V1 și V2 este reprezentată de tratamentul folosit pentru etapa de decolorare a probelor, adică, cu permanganat de potasiu pentru varianta V1 și, respectiv, acetonă și eter etilic pentru varianta V2. Proba de chitosan CT1, obținută în urma variantei de extracție V1 a avut un randament de reacție mai mic, fapt datorat caracterului puternic oxidant al soluției de permanganat de potasiu, care este posibil să fi distrus legăturile de chitină în timpul procesului de îndepărtare al pigmentilor din probă. Este posibil ca randamentul de reacție să fie influențat de pierderea în greutate a probei din cauza îndepărtării excesive a grupărilor acetil din lanțul polimeric în timpul procesului de dezacetilare.

CAPITOLUL V CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A CHITOSANULUI OBȚINUT DIN *PACHYGRAPSUS MORMORATUS*

Obiectivul acestui capitol este de a caracteriza cei doi chitosani obținuți din *Pachygrapsus mormoratus* din Marea Neagră, prin extracție chimică în capitolul anterior, prin analiza principalilor parametri fizico-chimici.

Caracterizarea corectă și completă are o importanță majoră în identificarea proprietăților fizico-chimice pe care le posedă și stabilește efectele procesului de preparare asupra acestor proprietăți. În funcție de influența acestor caracteristici ale polimerului asupra aplicațiilor în care se folosește, domeniile de aplicabilitate sunt foarte variate.

Caracterizarea s-a realizat prin determinarea atributelor calitative ale proprietăților fizico-chimice, precum: gradul de dezacetilare, masa moleculară, conținutul de cenușă, solubilitatea, umiditatea, valoarea pH-ului, iar confirmarea structurii și compararea materialului extras în această teză cu produsul standard luat ca referință s-a realizat prin analize spectrofotometrice în infraroșu FT-IR, în domeniul ultraviolet-vizibil UV-VIS, dar și prin analize de microscopie electronică SEM și termogravimetrie TGA.

V.2 PARAMETRII FIZICO-CHIMICI AI CHITOSANULUI EXTRAS DIN *PACHYGRAPSUS MORMORATUS* DIN MAREA NEAGRĂ

V.2.1 GRADUL DE DEZACETILARE

Determinarea gradului de dezacetilare a unei mostre de chitosan se poate face prin titrarea unei soluții acide de chitosan cu o soluție apoasă standardizată de NaOH, concentrație molară cunoscută, în apropierea valorii de 0,1 M. Se înregistrează valorile de pH ale sistemului apos în funcție de volumul (în mL) de soluție standardizată de NaOH. Pe măsură ce se adaugă soluție de NaOH, se neutralizează mai întâi acidul clorhidric în exces existent în soluție, după care grupele $-\text{NH}_3^+$ ale resturilor de D-glucozamină. La terminarea titrării, se determină volumul de soluție apoasă standardizată de NaOH folosit numai la titrarea grupelor $-\text{NH}_3^+$. Formula de calcul al gradului de dezacetilare al chitosanului este (V.3):

$$DD[\%] = 2,03 \frac{V_2 - V_1}{m + 0,0042(V_2 - V_1)} \quad (\text{V.3})$$

unde: m este masa probei, V_1, V_2 sunt volumele de NaOH 0,1 M ce corespund punctelor de inflexiune, 2,03 este coeficientul rezultat din masa moleculară a unității monomere de chitină, 0,0042 este coeficientul ce rezultă din diferența dintre masele moleculare ale unităților monomere de chitină și chitosan [Czechowska-Biskup R., 2012], [Czechowska-Biskup R., 2004].

Rezultatele obținute

Fig.V.2 prezintă curba de titrare (culoare neagră) și curba derivată corespunzătoare (culoare albastră) pentru titrarea a 0,2011 g chitosan (CT 1) cu o soluție apoasă de NaOH 0,0904 M. Din volumele corespunzătoare punctelor de echivalență (punctele de inflexiune pe curba de titrare sau maximele de pe curba derivată), s-a obținut valoarea $\Delta V = 9,2$ mL. Astfel, aplicând ecuația (V.7), rezultă:

$$DD(\%) = 20,03 \frac{9,2 \times 0,0904}{0,2011 + 0,042 \times 9,2 \times 0,0904} = 71,5$$

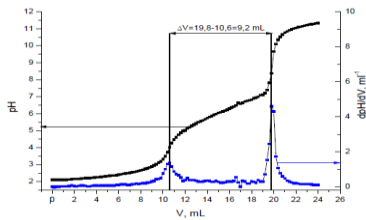


Fig. V.2. Curba de titrare (culoare neagră) și curba derivată corespunzătoare (culoare albastră) pentru titrarea sol. CT 1 cu sol. NaOH 0,0904M

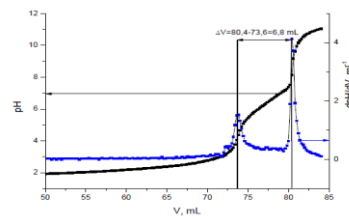


Fig. V.3. Curba de titrare (culoare neagră) și curba derivată corespunzătoare (culoare albastră) pentru titrarea sol. CT 2 cu sol. NaOH 0,0904M

În cazul titrării potențiometrice efectuate pe proba de CT 2 am folosit următoarele: $[\text{NaOH}] = 0,0904$ mol/L, $m = 0,1817$ g chitosan (CT 2) și o valoare a $\Delta V = 6,8$ mL. Fig. IV.3 prezintă curba de titrare (culoare neagră) și curba derivată corespunzătoare (culoare albastră) pentru titrarea a 0,1817g chitosan (CT 2) cu o soluție apoasă de NaOH 0,0904 M. Din volumele corespunzătoare punctelor de echivalență (punctele de inflexiune pe curba de titrare sau maximele de pe curba derivată), am obținut valoarea $\Delta V = 6,8$ mL. Astfel, aplicând aceeași ecuație (V.7), rezultă:

$$DD(\%) = 20,03 \frac{6,8 \times 0,0904}{0,1817 + 0,042 \times 6,8 \times 0,0904} = 60,1$$

O comparație grafică între valorile gradului de dezacetilare ale chitosanilor obținuți prin cele două variante de extracție este prezentată în figura (Fig. V.4) de mai jos:

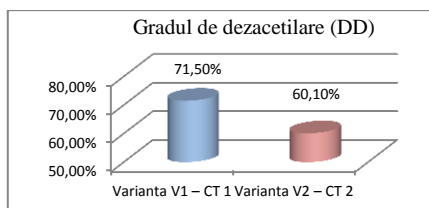


Fig.V.4. Valorile gradului de dezacetilare ale chitosanilor obținuți prin cele două variante de extracție

V.2.2. MASA MOLECULARĂ

Vâscozitatea intrinsecă este un parametru reologic foarte important folosit pentru caracterizarea proprietăților hidrodinamice ale polimerilor și pentru a determina masa moleculară medie aplicând ecuația Mark-Houwink [Wang W., 1991]. Determinarea valorii masei moleculare prin măsurători de vâscozitate intrinsecă este o metodă mai simplă, atât prin tehnica de lucru folosită, cât și prin modalitatea de calcul.

Ca și formulă de calcul, pentru determinarea masei moleculare am folosit ecuația (V.8) Mark-Houwink:

$$[\eta] = kM^a \quad (V.8)$$

unde: M este vâscozitatea medie a masei moleculare, $[\eta]$ este vâscozitatea intrinsecă, k și a sunt valorile constante $1,424 \times 10^{-5}$ (dL/g) și respectiv 0,96 [Wang W., 1991].

Rezultatele obținute

Din măsurătorile efectuate am determinat valorile pentru vâscozitatea cinematică (ν) și pentru vâscozitatea redusă (η_{red}), reprezentate în Tabelul V.1 și Tabelul V.2 pentru fiecare din cei doi chitosani obținuți.

Tabelul V.1. Valorile de vâscozitate obținute pentru proba de Chitosan CT 1

Concentrația (c, g/dL)	Vâscozitatea cinematică (ν , cSt)	Vâscozitatea redusă (η_{red} , dL/g)
0,04680	1,1631	8,1977
0,07488	1,392	8,7602
0,11232	1,7328	9,4497
0,14976	2,1093	10,0780
0,18720	2,5321	10,7492

Tabelul V.2. Valorile de vâscozitate obținute pentru proba de Chitosan CT 2

Concentrația (c, g/dL)	Vâscozitatea cinematică (ν , cSt)	Vâscozitatea redusă (η_{red} , dL/g)
0,02560	1,0212	8,3924
0,04096	1,1468	8,8931
0,06144	1,3180	9,2436
0,08192	1,5171	9,8240
0,10240	1,7207	10,2245

Valorile obținute pentru masa moleculară pentru cei doi chitosani extrași prin variantele V1 și V2 sunt prezentate comparativ în Fig.V.9:

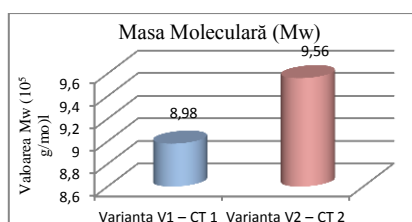


Fig.V.9. Valorile obținute pentru masa moleculară pentru cei doi chitosani extrași prin variantele V1 și V2

În unele studii, masa moleculară se exprimă în kDa. Se cunoaște că, $1 \text{ g/mol} = 1\text{Da}$. Astfel, valorile obținute pentru cei doi chitosani se pot rescrie sub forma:

$$M_w \text{ CT1} = 898 \text{ kDa}$$

$$M_w \text{ CT2} = 956 \text{ kDa}$$

Din datele experimentale obținute, cei doi chitosani extrași chimic se încadrează în limitele generale ale valorilor de masă moleculară.

V.2.3. CONȚINUTUL DE CENUȘĂ

Conținutul de cenușă din chitosan reprezintă un parametru ce poate influența solubilitatea polimerului și de asemenea poate conduce la o vâscozitate scăzută, afectând și alte caracteristici importante ale produsului final de extracție. Conținutul de cenușă al chitosanului este o caracteristică ce se referă la puritatea produsul obținut, de care se ține cont în aplicațiile pentru realizarea formelor farmaceutice și în utilizările biomedicale. Procentul de cenușă se poate calcula folosind următoarea formulă de calcul [Monarul Islama S., 2011]:

$$\% \text{Cenușă} = \frac{m_{\text{reziduu}}}{m_{\text{probi}}} \times 100 \quad (\text{V.9})$$

Rezultate

Aplicând formula de calcul din ecuația (V.9) am obținut o valoare de cenușă de 2,23% pentru proba de chitosan CT 1 și respectiv, o valoare de 1,98%, pentru proba de chitosan CT 2. Conținutul în cenușă al fiecărui chitosan obținut prin extracție chimică este prezentat comparativ în Fig.V.10.

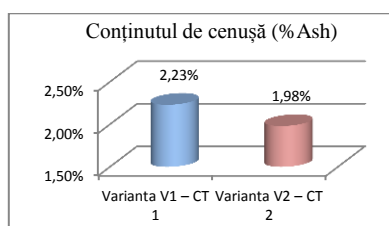


Fig.V.10. Conținutul în cenușă al probelor CT 1 și CT 2

V.2.4. CONȚINUTUL DE UMIDITATE

Chitosanul este un material de natură higroscopică, având o capacitate mult mai mare decât chitina de a forma legături de hidrogen cu moleculele de apă, legându-se atât de grupările hidroxil cât și de cele amino. Cantitatea de apă absorbită depinde de mai mulți factori, printre care: conținutul inițial de umiditate, condițiile de păstrare și în special temperatura ambientală și umiditatea relativă [Gocho H., 2000]. Masa de apă pierdută se determină prin folosirea ecuației (V.10) de mai jos [Yong H., 2002], prin cântărirea probei înainte și după uscarea la masă constantă, într-o etuvă încălzită la o temperatură de 65°C , timp de 24 de ore.

$$\% \text{Umiditate} = \frac{m_{\text{probi-umedă}} - m_{\text{probi-uscați}}}{m_{\text{probi-umedă}}} \times 100 \quad (\text{V.10})$$

Rezultatele obținute

Folosind ecuația (V.10) dată mai sus, am determinat conținutul de umiditate pentru fiecare tip de chitosan studiat și am obținut valori apropiate între cele două probe. Astfel, pentru proba CT 1 procentul de umiditate a fost de 8,54%, iar pentru CT 2 am obținut un procent de 8,35%. Procentul de umiditate al probelor de chitosan analizate este prezentat grafic mai jos, în Fig.V.12.

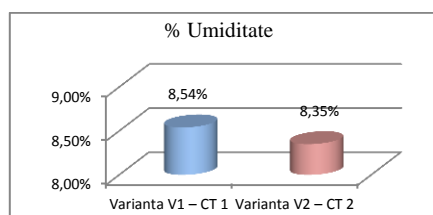


Fig.V.12. Procentul de umiditate al probelor de chitosan analizate

V.2.5. SOLUBILITATEA PROBELOR DE CHITOSAN

Solubilitatea chitosanului reprezintă un reper de calitate al polimerului obținut și anume, o solubilitate mai mare indică un chitosan mai calitativ și indicat în utilizarea proceselor farmaceutice și medicale. Am determinat procentul de solubilitate al probelor de chitosan folosind formula de mai jos [Fernandez-Kim., 2004]:

$$\% \text{Solubilitate} = \frac{(m_{\text{inițialatub}} + CT) - (m_{\text{finalatub}} + CT)}{(m_{\text{inițialatub}} + CT) - (m_{\text{inițialatub}})} \times 100 \quad (\text{V.11})$$

Rezultate

Procentul de solubilitate al chitosanilor obținuți prin variantele V1 și V2 de extracție chimică este prezentat în Fig.V.14:

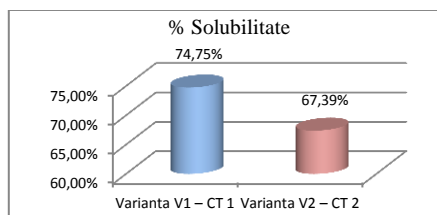


Fig.V.14. Procentul de solubilitate al chitosanilor obținuți prin variantele V1 și V2 de extracție chimică

Utilizând formula de calcul prezentată anterior în ecuația (IV.11) pentru ambele tipuri de chitosan extrase, am obținut un procent de solubilitate de 74,75% pentru proba de CT 1 și o valoare de 67,39% pentru CT 2.

V.2.6. VALOAREA pH-ului

Majoritatea proprietăților caracteristice ale chitosanului sunt datorate grupărilor amino primare cu un pKa de 6.3, ce se regăsesc în număr mare în lanțul polimeric. La un pH mic, ionii pozitivi ai grupării NH_3^+ transformă chitosanul într-un polielectrolit cationic solubil în apă. Atunci când valoarea pH-ului crește peste 6.0 încărcătura pozitivă a grupărilor amino se pierde și astfel chitosanul devine insolubil în apă [Pillai C.K.S., 2009].

Rezultate

În urma măsurătorilor efectuate, probele de chitosan studiate au prezentat următoarele valori de pH, apropiate de neutralitate: pentru proba CT 1 am obținut valoarea de 6,9, iar pentru proba de CT 2 o valoare de 6,7. Aceste valori sunt reprezentate comparativ în Fig.V.15.

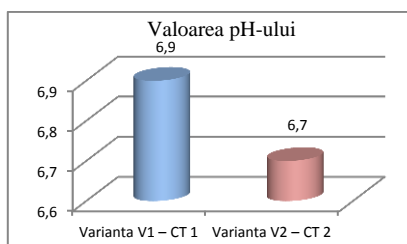


Fig.V.15. Valorile de pH ale chitosanilor studiați

V.2.7. ANALIZA TERMOGRAVIMETRICĂ (TGA)

Temperatura ridicată este deseori folosită pentru prepararea formulărilor pe bază de chitosan. Totuși, expunerea probelor la temperaturi înalte poate conduce la modificarea unor proprietăți ale polimerului, precum: solubilitatea, vâscozitatea și aspectul. S-a constatat că rata și nivelul de degradare al polimerului sunt accelerate cu creșterea temperaturii și timpului de încălzire [Howling S.E., 2010]. Degradarea termică a structurii chitosanului este măsurată folosind metoda termogravimetrică. Aceasta este o reacție complexă ce implică două sau chiar trei etape de degradare.

Rezultatele obținute

În condițiile experimentale date, chitosanul suferă o degradare termică (termooxidativă, în prezența oxigenului din aer) compusă din două procese (notate cu B și C) distinct observate pe dependența pierdere de masă – temperatură. Astfel, pentru fiecare dintre cele două probe de chitosan, se observă următoarele regiuni:

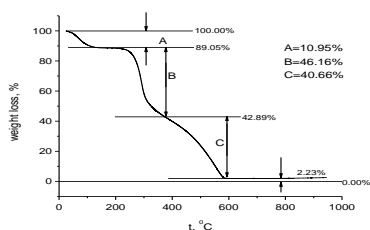


Fig.V.17. Termogrăma asociată pierderii de masă pentru proba de chitosan CT 1

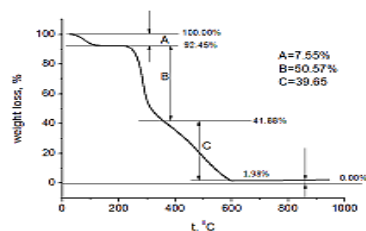


Fig.V.18. Termogrăma asociată pierderii de masă pentru proba de chitosan CT 2

Diferențele valorilor de temperatură de tranziție vitroasă se explică prin valorile diferite de masă moleculară ale chitosanilor analizați. În baza acestor rezultate, chitosanul se poate supune unor temperaturi sub valorile temperaturilor de tranziție vitroase fără să influențeze proprietățile fizico-chimice.

V.2.8. ANALIZA SPECTROFOTOMETRICĂ ÎN INFRAROȘU (FT-IR)

Analiza spectrofotometrică FT-IR s-a folosit pentru a identifica structura chimică a probelor de chitosan extrase chimic din crabul de piatră *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră. Spectrele rezultate au fost comparate cu cele ale chitosanului standard luat ca referință pentru confirmarea structurii chitosanilor extrași.

Rezultate obținute

Din analiza principalelor bande de absorbție ale celor doi chitosani obținuți în comparație cu spectrul chitosanului comercial standard luat ca referință am observat că cea mai mare absorbție pentru ambele probe de chitosan se observă între lungimile de undă 1020 cm^{-1} și 1220 cm^{-1} , ceea ce confirmă prezența grupărilor amino libere ($-\text{NH}_2$) din poziția C_2 a lanțului de glucozamină.

Această similitudine a spectrelor confirmă structura chitosanului extras chimic prin spectrele IR prezentate în Fig.V.20 și Fig.V.21 și centralizate în Tabelul V.4. Aceste rezultate sunt în concordanță cu valorile raportate de cercetătorii Yateendra și colaboratorii pentru chitosanul standard comercial luat ca referință în acest studiu [Yateendra S.P., 2012].

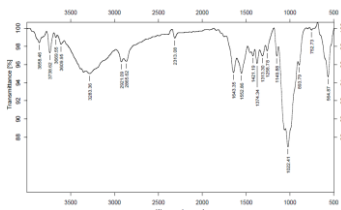


Fig.V.19. Spectrul FTIR pentru chitosanul standard



Fig.V.20. Spectrul FTIR pentru proba de chitosan CT 1

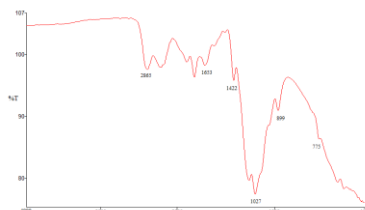


Fig.V.21. Spectrul FTIR pentru proba de chitosan CT 2

V.2.9. ANALIZA PRIN MICROSCOPIE ELECTRONICĂ (SEM)

Microscopia electronică s-a folosit pentru a studia morfologia și structura de suprafață a membranelor obținute din probele de chitosan (CT 1 și CT 2) extras prin metoda chimică prezentată anterior.

Rezultatele analizei

Imaginile obținute prin microscopia electronică pentru studiul suprafețelor membranelor de chitosan (Fig.V.22) arată că structura membranelor compuse din CT 2 sunt mai poroase decât cele obținute din proba de CT 1.

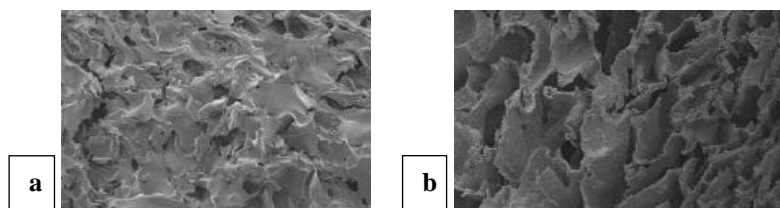


Fig.V.22. Imaginile SEM ale suprafețelor membranelor de chitosan obținute;
a. – CT 1/acid acetic; b. – CT 2/acid acetic.

Acest fapt se datorează diferenței de mase moleculare ale chitosanilor, dar și vâscozității gelurilor formate prin dizolvarea în soluția de acid acetic. Gelul format din CT 2 a prezentat o vâscozitate mult mai ridicată decât gelul format din CT 1. La examinarea probelor prin microscopie electronică, chitosanul a prezentat o suprafață neomogenă și rugoasă cu șanțuri fine și pori, ceea ce a creat un efect ridat suprafeței de chitosan. Caracteristicile de suprafață ale probelor de chitosan preparate din crabii de piatră *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră sunt în corelație cu literatura de specialitate.

V.2.10. ANALIZA SPECTROFOTOMETRICĂ ÎN UV-VIS

Rezultatele analizei

Datorită rezonanței plasmonice de suprafață nanoparticulele de argint prezintă un peak intens de absorbantă și astfel de poate detecta formarea acestor nanoparticule în soluțiile analizate prin spectrofotometria în UV-VIS [Starowicz M., 2006].

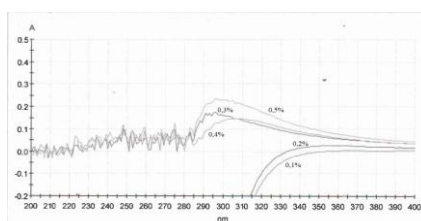


Fig.V.24. Spectrele UV-VIS al soluțiilor de chitosan

În Fig.V.24 sunt prezentate spectrele UV-VIS obținute pentru nanoparticulele de argint preparate cu diferite concentrații de chitosan. Din analiza spectrelor se poate observa că intensitatea absorbantelor soluțiilor analizate crește cu creșterea concentrației în chitosan. Astfel, chitosanul acționează ca un bun agent stabilizant pentru nanoparticulele de argint formate în soluție.

V.3. DISCUȚII PRIVIND ANALIZELE FIZICO-CHIMICE EFECTUATE

Rezultatele comparative între principalii parametri analizați pentru cele două tipuri de chitosani obținuți prin variantele de extracție (V1 și V2) pe care le-am folosit în acest studiu sunt reprezentate în Tabelul V.5.

Tabelul V.5. Rezultate comparative ale parametrilor principali pentru probele de chitosan obținute

Parametru fizico-chimic	Varianta V1 – CT 1	Varianta V2 – CT 2
Gradul de dezacetilare (DD)	71,5%	60,1%
Masa Moleculară (Mw)	$8,98 \times 10^5$ g/mol	$9,56 \times 10^5$ g/mol
Valoare de cenușă (%Ash)	2,23%	1,98%
Valoarea de pH	6,9	6,7
% Umiditate	8,54%	8,35%
Solubilitate	74,75%	67,39%

CAPITOLUL VI FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN

Obiectivul acestui capitol este de a prepara diferite forme farmaceutice semisolide cu aplicație topică, sub formă de creme, unguente și geluri, dar și membrane și pelicule absorbabile pe bază de chitosan și în asociere cu substanțe ce prezintă acțiune antimicrobică, antiseptică și regenerantă și cu substanțe de origine naturală, precum algele marine. Din aceste alge s-au realizat extracte alcoolice care s-au încorporat în

preparatele farmaceutice semisolidе alături de chitosan. Formele farmaceutice realizate sunt studiate din punct de vedere reologic pentru a determina influența pe care o exercită celelalte substanțe active asociate asupra comportării reologice și vâscozității acestor preparate.

VI.2. STUDII PRIVIND COMPORTAREA REOLOGICĂ A UNOR FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN CU DIVERSE ALTE SUBSTANȚE ACTIVE

Tipurile de forme farmaceutice pe care le-am realizat în cadrul acestui studiu au ca și compus principal chitosanul extras din crabii de piatră, specia *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră. Preparatele realizate au fost formulate ca și creme, unguente, geluri, membrane și bureți.

Cremele preparate sunt pe bază de lanolină, în diverse asocieri cu acid hialuronic și sulfadiazină de argint, unguentele au ca bază o formulare de unguent emulgator de tip U/A și sunt asociate cu ketoconazol (acțiune antimicrobică) și cu extracte alcoolice de alge marine, precum *Cystoseira barbata* și *Ulva lactuca*. Gelurile sunt realizate din chitosan asociat cu extracte din trei tipuri de alge, două specii de alge verzi (*Ulva lactuca*, *Cladophora vagabunda*) și o specie de algă brună (*Cystoseira barbata*). Din aceste formulări de gel au fost realizate și membrane pentru aplicație topică. Am folosit chitosanul extras sub formă de pulbere și pentru impregnarea ca atare în pansamente.

CARACTERIZAREA REOLOGICĂ A UNOR NOI FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN

Determinările au fost realizate pe fiecare din probele rezultate pentru a determina influența unui component adițional asupra vâscozității formei farmaceutice. Am folosit două vâscozimetre, unul model HAAKE Viscotester 550 VT (Fig.VI.2), folosind sistemul de senzori MV1, și unul VISCOSTAR R Viscosimeter (Fig.VI.3). În cazul experimentului efectuat cu reovâscozimetru HAAKE temperatura a fost menținută constantă la 25 ± 0.1 °C utilizând o baie de apă Lauda E100 conectată la aparat. Viteza de forfecare a fost aplicată pe domeniul $0-300$ s⁻¹ mai întâi crescător, apoi descrescător. La analiza reologică cu VISCOSTAR R am ales pivoții R6 și R7 în funcție de intervalul de vâscozitate ce a fost determinat, deoarece fiecare pivot corespunde unei valori constante care a fost folosită pentru a calcula viteza de forfecare (D) în corelație cu viteza selectată (ω), în rpm, după formula (VI.3):

$$D = \omega \cdot R \quad (VI.3)$$

VI.2.2 STUDIUL REOLOGIC AL CREMELOR PE BAZĂ DE CHITOSAN

Experimentele reologice s-au realizat cu vâscozimetru VISCOSTAR R, prezentat în Fig.VI.3. Intervalele de timp dintre determinări și durata fiecărei măsurători au fost de 10 secunde. Măsurătorile s-au realizat prin creșterea vitezei de rotație de la 4 rpm. la 200 rpm., respectiv prin descreșterea vitezei de rotație de la 200 rpm. la 4 rpm. Din măsurătorile de reologie a acestor creme pe bază de chitosan au rezultat reogramele și curbele de vâscozitate prezentate în continuare.

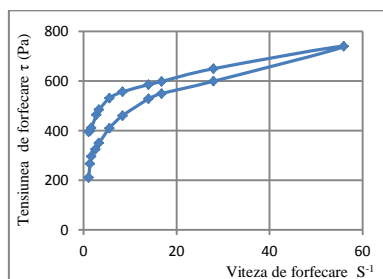


Fig.VI.5. Reograma pentru proba C1 la creșterea și scăderea vitezei de forfecare

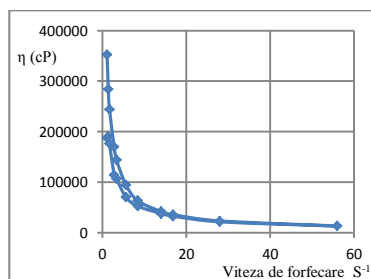


Fig.VI.6. Dependența vâscozității de viteza de forfecare pentru proba C1

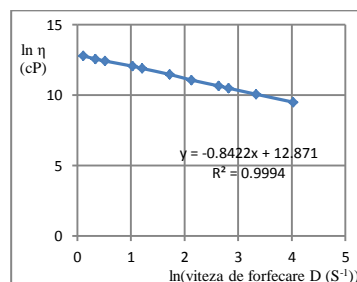


Fig.VI.7. Linearizarea curbei de vâscozitate ascendente pentru proba C1

În Fig.VI.5, Fig.VI.6, Fig.VI.7 sunt prezentate rezultatele grafice pentru studiul reologic al probei de cremă C1. Rezultatele obținute în urma studiului reogramelor conduc la observarea unui caracter newtonian, pseudoplastic și tixotrop al probelor de cremă analizate. În cazul tuturor probelor analizate s-a observat un caracter reologic pseudoplastic, prezentând o scădere a vâscozității aparente cu creșterea

vitezelor de forfecare. După linearizarea curbelor de curgere peste o anumită valoare a vitezei de forfecare, formulările preparate își mențin aceeași structură.

VI.2.4 STUDIUL REOLOGIC AL UNGUENTELOR PE BAZĂ DE CHITOSAN

Experimentele reologice s-au realizat cu vâscozimetrul VISCOSTAR R, prezentat în Fig.VI.3. Intervalele de timp dintre determinări și durata fiecărei măsurători au fost de 10 secunde. Măsurătorile s-au realizat prin creșterea vitezei de rotație de la 4 rpm. la 200 rpm., respectiv prin descreșterea vitezei de rotație de la 200 rpm. la 4 rpm. În urma măsurătorilor de vâscozitate a probelor de unguent am obținut reogramele și curbele de vâscozitate prezentate mai jos. În Fig.VI.24, Fig.VI.25, Fig.VI.26 sunt prezentate rezultatele grafice pentru studiul reologic al probei de unguent U1.

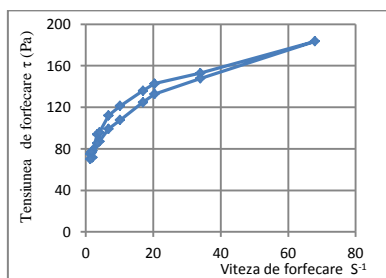


Fig.VI.24. Reograma pentru proba U1 la creșterea și scăderea vitezei de forfecare

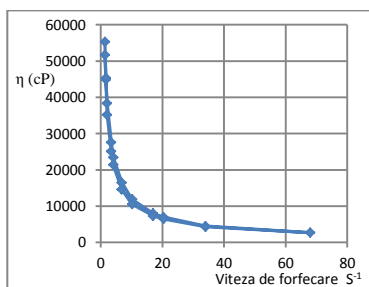


Fig.VI.25. Dependența vâscozității de viteza de forfecare pentru proba U1

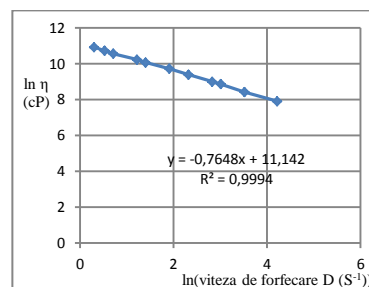


Fig.VI.26. Linearizarea curbei de vâscozitate ascendente pentru proba U1

Rezultatele obținute evidențiază un caracter newtonian, pseudoplastic și tixotrop al probelor de unguent studiate. Toate probele analizate au avut un caracter reologic pseudoplastic, prezentând o scădere a vâscozității aparente cu creșterea vitezelor de forfecare.

VI.3.2 REOLOGIA UNGUENTELOR CU CHITOSAN ȘI EXTRACT DE ALGE MARINE

Studiul reologic al acestor forme farmaceutice semisolide a fost efectuat cu vâscozimetrul HAAKE (Fig.VI.2). Temperatura a fost menținută constantă la 25 ± 0.1 °C utilizând o baie de apă Lauda E100 conectată la aparat. Viteza de forfecare a fost aplicată pe domeniul $0-300$ s⁻¹ mai întâi crescător, apoi descrescător. Probele de unguent cu extract de algă, cu excepția probei UC3, prezintă fenomenul invers tixotropiei și anume, reopexia. De asemenea, probele UC2 și UC3 au o comportare diferită la viteze de forfecare mici, de până la 20 s⁻¹, tensiunea de forfecare crescând mult mai repede cu viteza de forfecare. Din acest motiv vâscozitatea acestor probe s-a determinat din fitarea punctelor experimentale obținute doar pe acest domeniu de viteze de forfecare. Reogramele pentru probele UC1, UC4 și UC5 sunt prezentate în Fig.VI.56, Fig.VI.57, Fig.VI.58 de mai jos alături de gradul de reopexie.

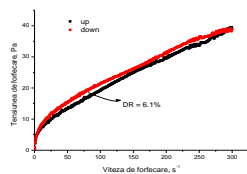


Fig.VI.56. Reograma obținută la creșterea vitezei de forfecare (negru) și la scăderea vitezei de forfecare (roșu) pentru proba UC1

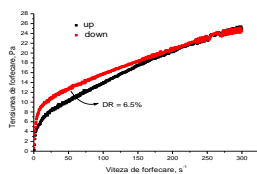


Fig.VI.57. Reograma obținută la creșterea vitezei de forfecare (negru) și la scăderea vitezei de forfecare (roșu) pentru proba UC4

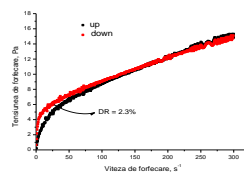


Fig.VI.58. Reograma obținută la creșterea vitezei de forfecare (negru) și la scăderea vitezei de forfecare (roșu) pentru proba UC5

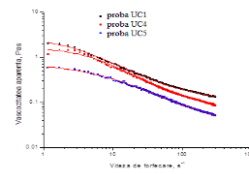


Fig.VI.59. Dependența vâscozității aparente de viteza de forfecare pentru probele UC1, UC4 și UC5

Deoarece domeniul de pseudoplasticitate începe de la viteze de forfecare de sub 10 s⁻¹ aceste probe de unguent prezintă un grad mai mare de pseudoplasticitate. Scăderea vâscozității aparente cu viteza de forfecare pentru probele UC1, UC4 și UC5 este redată în Fig.VI.59.

VI.3.4 COMPORTAREA REOLOGICĂ A GELURILOR PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI ALGE MARINE

Analiza reologică a formelor farmaceutice semisolide tip gel a fost efectuată cu vâscozimetrul HAAKE. Temperatura a fost menținută constantă la 25 ± 0.1 °C utilizând o baie de apă Lauda E100 conectată la aparat. Viteza de forfecare a fost aplicată pe domeniul $0-300$ s⁻¹ mai întâi crescător, apoi descrescător. Pentru probele de gel pe bază de chitosan și extract de alge marine s-au trasat reograme sub forma dependenței tensiunii de forfecare (τ) de viteza de forfecare ($\dot{\gamma}$). Adăugarea unui extract de alge peste proba de gel simplu de chitosan (G1), modifică comportarea la curgere, fără a modifica semnificativ gradul de tixotropie, care rămâne aproximativ 3-3.5%. În schimb, caracterul pseudoplastic se accentuează de la proba G1, la proba G3, apoi la proba G2 (Fig.VI.67).

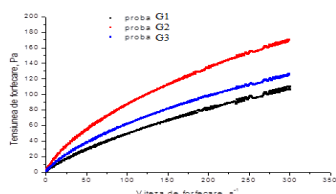


Fig.VI.67. Reogramele obținute la creșterea vitezei de forfecare pentru probele G1-G3

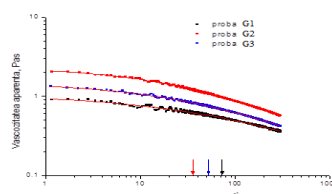


Fig.VI.68. Dependența vâscozității aparente de viteza de forfecare pentru probele G1-G3

În figura Fig.VI.68 s-a reprezentat dependența vâscozității aparente, (adică raportul dintre tensiunea de forfecare și viteza de forfecare) de viteza de forfecare pentru probele G1-G3. Modelul Cross modelează relativ bine datele experimentale, parametrii de fitare fiind redați în Tabelul VI.7, alături de coeficienții de determinare, R^2 . Din analiza datelor experimentale observăm că proba G1 are cea mai mică vâscozitate și, de asemenea, este cel mai puțin pseudoplastică ($m = 0.47$, comparativ cu 0.54 și 0.64 pentru proba G3, respectiv proba G2). Ambele extracte de alge măresc vâscozitatea și caracterul pseudoplastic al probelor de gel pe bază de chitosan, creșterea fiind mai importantă în cazul extractului adăugat în proba G2.

VI.3.5 PELICULE/MEMBRANE DE CHITOSAN CU ALGE MARINE

O caracteristică foarte importantă a chitosanului este capacitatea sa de a forma cu ușurință pelicule sau membrane [Fernández de Castro L., 2016]. Formarea peliculelor se datorează interacțiunilor intermoleculare din timpul procesului de uscare, precum legătura electrostatică și de hidrogen [Becerra J., 2017]. În Fig.VI.69 sunt prezentate peliculele obținute din gelurile de chitosan în asociere cu extractele de alge marine.

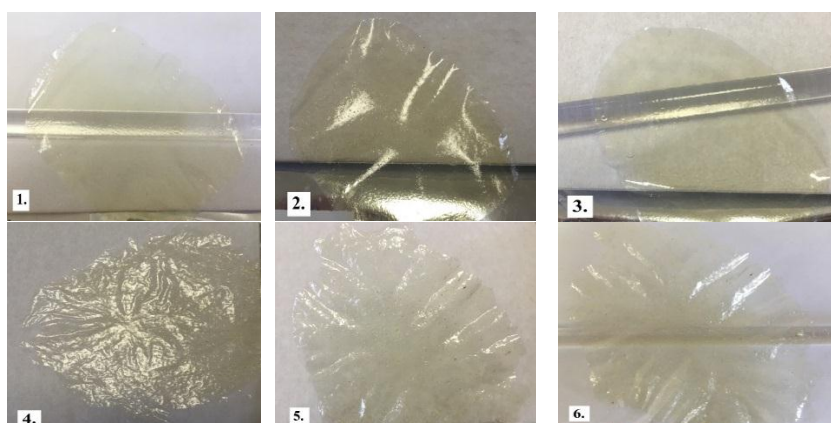


Fig.VI.69. Peliculele de Chitosan cu extracte de alge marine:

1. CT 1 + *Ulvae*, 2. CT 1 + *Cladophora*, 3. CT 1 + *Cystoseira*, 4. CT 2 + *Ulvae*, 5. CT 2 + *Cladophora*, 6. CT 2 + *Cystoseira*.

Aspectul peliculelor obținute este diferit, prezentând colorații diferite în funcție de extractul de algă din compoziție. Culoarea pe care o prezintă probele obținute nu este uniformă pe toată suprafața peliculelor deoarece grosimile gelurilor au fost neuniforme la etalarea pe foliile de polietilenă. De asemenea, aspectul peliculelor obținute din chitosanul CT 1 este lucios și neted, pe când suprafața peliculelor formate din chitosanul CT 2 este ușor grunjoasă și striată, prezentând mai multe bule de aer. S-a observat că adăugarea de

extracte alcoolice în formele de chitosan modifică proprietățile fizice ale preparatelor de chitosan datorită interacțiunii dintre moleculele de apă, chitosan și polifenolii prezenți în extracte [Abdollahi M., 2012]. S-au obținut membrane de chitosan cu alge marine. Membranele au prezentat o elasticitate și o bioadezivitate foarte bună. Gradul de transparență a fost bun pentru toate probele, membranele prezentând claritate satisfăcătoare, fără zone opace.

CAPITOLUL VII

STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE A NOILOR FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN

Obiectivele studiului. În acest experiment s-au studiat 4 tipuri de alge marine, pregătite ca și extracte alcoolice. S-a determinat pentru fiecare algă conținutul total de polifenoli prin metoda spectrofotometrică, iar pentru speciile de algă verde *Ulva lactuca* și algă brună *Cystoseira barbata*, s-a analizat conținutul în fenoli prin metoda cromatografică HPLC. Chitosanul extras chimic în Capitolul IV din carapacele dorsale ale speciei de crab de piatră *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră a fost analizat pentru proprietățile antioxidante prin testarea a trei metode și mecanisme de acțiune, precum: puterea reducătoare cu FeCl_3 , capacitatea de captare a radicalilor DPPH și a radicalilor hidroxil. A fost determinată capacitatea antioxidantă totală a unui compozit sub formă de hidrogel, obținut din chitosanul extras de noi în laborator, collagen și extract de alge marine, prin metoda chemiluminescenței. S-a evidențiat influența componentelor asociate în compozit asupra capacității antioxidante totale.

VII.3. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A CHITOSANULUI

Activitatea antioxidantă a chitosanului a fost testată prin diferite metode de analiză, precum:

- Puterea reducătoare cu clorura ferică (FeCl_3)
- Capacitatea de captare a radicalilor 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH
- Capacitatea de captare a radicalilor hidroxil

Rezultate și discuții

Analiza rezultatelor obținute ne arată că s-a produs un viraj de culoare în cazul soluțiilor de probe pregătite, de la galben la verde. Cea mai mare valoare înregistrată (0,26 nm) la 700 nm a fost pentru proba de amestec de concentrație 10 mg/mL. O valoare ridicată a absorbanței indică o capacitate mai mare a puterii reducătoare a probei. Fig.VII.26 prezintă absorbanțele înregistrate la citirea probelor de amestec de chitosan de diferite concentrații. Graficul prezentat în Fig.VII.26 arată că absorbanțele citite pentru probele analizate au crescut gradual cu creșterea concentrației de chitosan din amestec. O valoare mai mare a absorbanței indică o putere reducătoare mai pronunțată.

VII.3.2. CAPACITATEA DE CAPTARE A RADICALULUI 2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL – METODA DPPH

Rezultate și discuții

Capacitatea chitosanului extras chimic din *Pachygrapsus marmoratus*, de captare a radicalilor DPPH este prezentată în graficul din Fig.VII.27. Rezultatele obținute au arătat că soluția de chitosan analizată își pierde din intensitatea culorii violet pe măsură ce crește concentrația. Gruparea amină din chitosan a reacționat cu radicalii DPPH și a format molecule stabile. Cea mai mare valoare a capacității de captare a DPPH a fost obținută pentru concentrația de 10 mg/mL a soluției de chitosan. Acest rezultat indică o capacitate mai pronunțată de captare a DPPH cu creșterea concentrației de chitosan, adică o reducere semnificativă a moleculelor de radical DPPH.

VII.3.3. CAPACITATEA DE CAPTARE A RADICALILOR HIDROXIL

Rezultate și discuții

Fig.VII.28 arată capacitatea chitosanului extras de captare a radicalilor hidroxil. Se observă că această capacitate crește cu creșterea concentrației de chitosan din probe. Chitosanul are capacitatea de a capta radicalii hidroxil datorită prezenței grupărilor hidroxil din lanțul polimeric. Grupările OH și NH_2 din lanțul chitosanului sunt dificil de asociat și reacționează cu radicalul hidroxil. Ionii de Fe^{3+} se produc atunci când sulfatul de fier (FeSO_4) reacționează cu peroxidul de hidrogen. Chitosanul are abilitatea de a preveni complexarea ionilor de fier cu radicalul hidroxil.

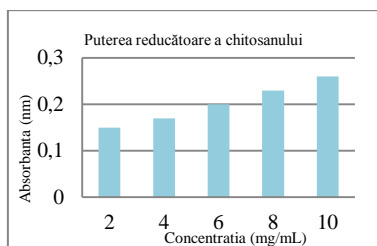


Fig.VII.26. Puterea reducătoare a chitosanului extras din *Pachygrapsus marmoratus* la diferite concentrații

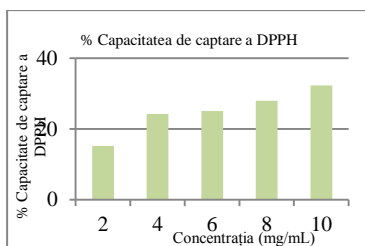


Fig.VII.27. Capacitatea chitosanului extras de captare a radicalilor DPPH (%) la diferite concentrații

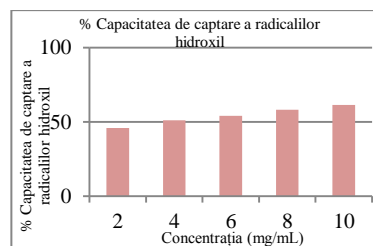


Fig.VII.28. Capacitatea chitosanului extras din *Pachygrapsus marmoratus* de captare a radicalilor hidroxil

VII.4.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A COMPOZITULUI MARIN PRIN METODA CHEMILUMINESCENȚEI

Am obținut forme compozite tip hidrogel având în compoziție doi chitosani de mase moleculare diferite (CT 1 și CT 2) și două concentrații diferite de extract algal marin (10% și 20%).

Rezultate și discuții

Din analiza rezultatelor obținute se poate observa creșterea acțiunii antioxidante cu creșterea concentrației. Astfel, în cazul tuturor probelor, cele mai mici valori s-au înregistrat pentru concentrația de 5 μL , crescând progresiv până la concentrația de 20 μL . Pentru probele având concentrația de 20 μL s-au înregistrat cea mai bună activitate antioxidantă. Cele mai ridicate valori pentru activitatea antioxidantă s-au înregistrat pentru probele de hidrogel compozit formate din chitosanul CT 2, acesta având o masă moleculară mai mare. Graficele din Fig.VII.33 – Fig.VII.36 de mai jos arată creșterea activității antioxidante totale în funcție de concentrație pentru fiecare probă de compozit analizată.

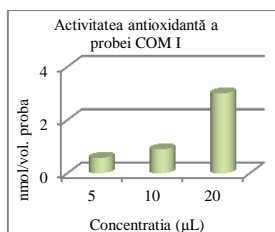


Fig.VII.33. Variația activității antioxidante în funcție de concentrație pentru COM I

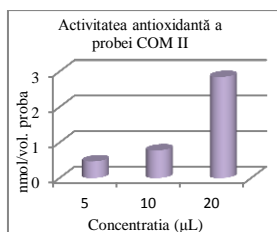


Fig.VII.34. Variația activității antioxidante în funcție de concentrație pentru COM II

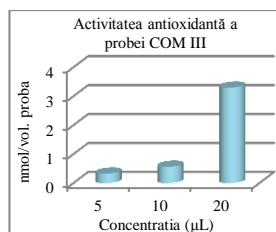


Fig.VII.35. Variația activității antioxidante în funcție de concentrație pentru COM III

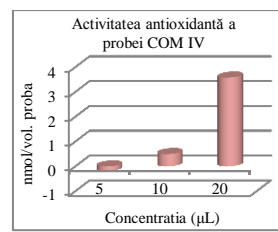


Fig.VII.36. Variația activității antioxidante în funcție de concentrație pentru COM IV

CAPITOLUL VIII

CERCETĂRI PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A COMPUSILOR FARMACEUTICI CU CHITOSAN

Obiectivele studiului sunt de a testa acțiunea antimicrobiană a chitosanului și a formelor farmaceutice preparate în asociere cu alte substanțe de origine marină asupra unor bacterii gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*), bacterii gram-negative (*Escherichia coli*) și unei specii de fungi (*Candida albicans*) prin evidențierea influenței parametrilor funcționali, concentrației și volumului de soluție de chitosan folosit.

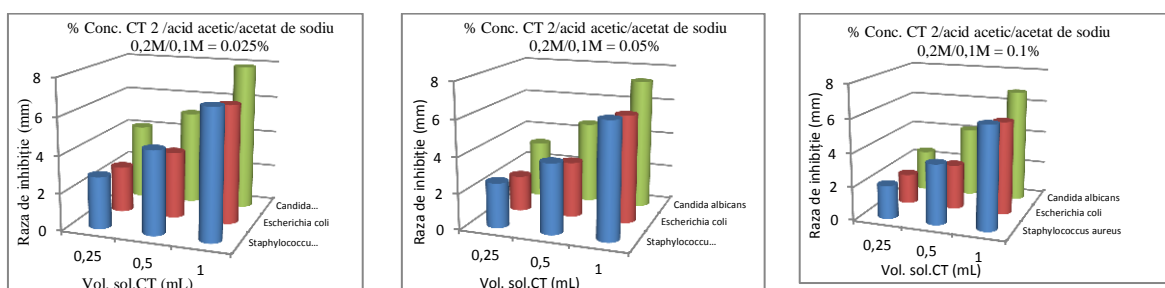
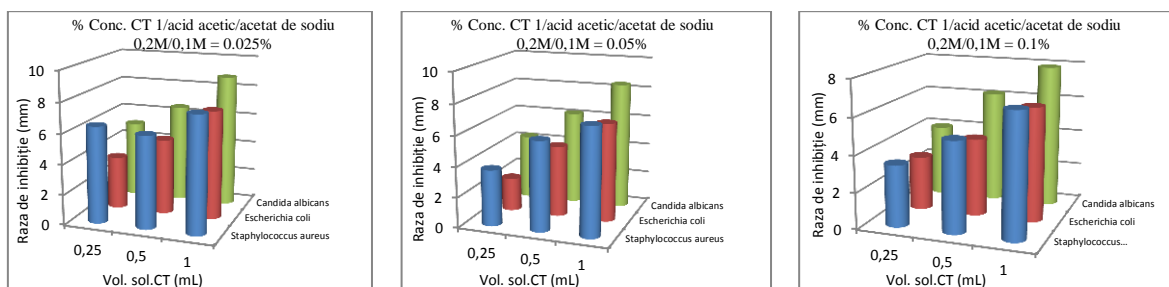
VIII.3. ANALIZA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A CHITOSANULUI

Materialie

Am lucrat în triplicat, pe cei doi chitosani de mase moleculare diferite, obținuți prin metoda chimică, și anume, un chitosan CT 1 cu $M_w = 8,98 \times 10^5$ g/mol și un chitosan CT 2 cu $M_w = 9,56 \times 10^5$ g/mol. Am lucrat pe două tipuri de bacterii: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P - Gram-pozitiv, *Escherichia coli* ATCC 10536- Gram-negativ, pe o specie de ciupercă, *Candida albicans* ATCC 90028.

Rezultate

Graficele din Fig.VIII.11 și Fig.VIII.12 reprezintă dependența razelor de inhibiție de volumul de soluție de chitosan adăugat pentru fiecare concentrație (0,025%, 0,05% și 0,1%) și tip de probă (CT 1 și CT 2). Rezultatele au arătat că acțiunea antimicrobiană a chitosanului depinde atât de parametrii fizico-chimici ai polimerului, cât și de tipul de microorganism cu care interacționează.



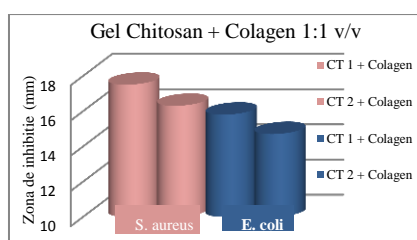
VIII.5. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A FORMULĂRILOR REALIZATE CU CHITOSAN

Asocierea diferitelor substanțe ce prezintă acțiune în același domeniu de interes a dovedit o sporire a eficienței în utilizarea lor în variate forme farmaceutice. În acest studiu, am preparat forme farmaceutice semisolid, pentru aplicare topică, sub formă de geluri și membrane biodegradabile pe bază de chitosan asociat cu alte substanțe naturale de origine marină, ce au dovedit în mod individual acțiune antimicrobiană bună. Am testat acțiunea de inhibare a dezvoltării microbiene pe două tulpini de bacili diferiți, unul gram-pozitiv și unul gram-negativ, a substanțelor de interes, întâi separat și apoi în formulările preparate din combinațiile acestora, astfel: a) formulări simple ale substanțelor individuale, b) formulări compuse din asocieri ale acestor substanțe, c) compozitul formulat sub formă de gel și membrane.

VIII.5.2. ANALIZA ANTIMICROBIANĂ A PREPARATELOR COMPUSE PE BAZĂ DE CHITOSAN

FORMULARE TIP GEL COMPUSĂ DIN CHITOSAN ȘI COLAGEN

Analiza rezultatelor din figura de mai jos (Fig.VIII.23) a arătat faptul că o influență majoră asupra proprietății antifungice a gelului format din chitosan și collagen o are tipul de chitosan folosit, și anume valoarea masei moleculare a polimerului. Astfel, gelurile formate cu chitosan CT 1 prezintă o acțiune mai bună față de gelurile preparate cu chitosan CT 2.



FORMULARE TIP GEL COMPUSĂ DIN CHITOSAN ȘI EXTRACT DE ALGE

Fig.VIII.25 și Fig.VIII.26 prezintă reprezentarea grafică a acțiunii antimicrobiene a formulărilor tip gel, compuse din chitosan CT 1 și CT 2, de mase moleculare diferite și extractele de alge marine (*Cladophora vagabunda*, *Ulva lactuca*, *Cystoseira barbata*) asupra bacililor gram-pozitivi (*S. aureus*) și gram-negativi (*E. coli*).

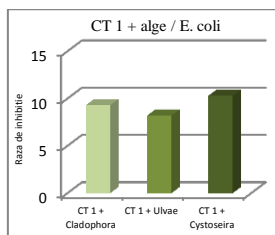


Fig.VIII.25. Reprezentarea grafică a acțiunii antimicrobiene a gelurilor formate din chitosan și alge marine asupra *E. coli*

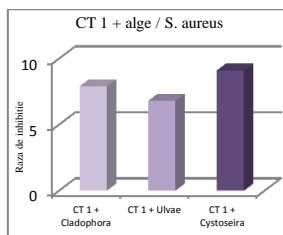
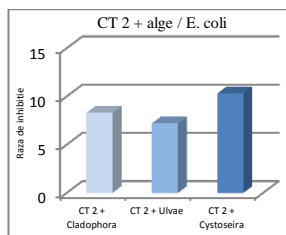
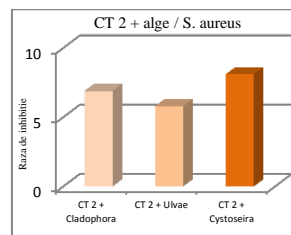


Fig.VIII.26. Reprezentarea grafică a acțiunii antimicrobiene a gelurilor formate din chitosan și alge marine asupra *S. aureus*



FORMULARE COMPOZIT TIP GEL FORMATĂ DIN EXTRACT DE ALGE, COLAGEN ȘI CHITOSAN

Așa cum reiese din graficele prezentate în Fig.VIII.28, compozitul marin format din chitosan CT 1 + Colagen + extract alge 20% prezintă cea mai puternică acțiune antimicrobiană, deoarece componentele acestui preparat acționează sinergic pentru îmbunătățirea caracteristicilor antibacteriene. Fiecare component utilizat exercită o proprietate antimicrobiană proprie, dar împreună, în acest compozit puterea antimicrobiană s-a accentuat printr-un sinergism de potențare.

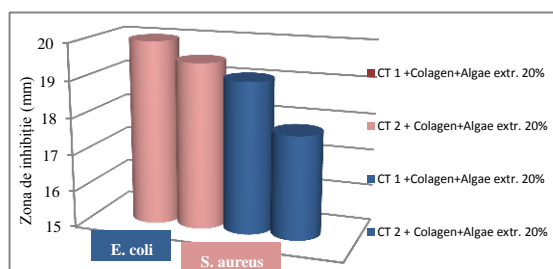
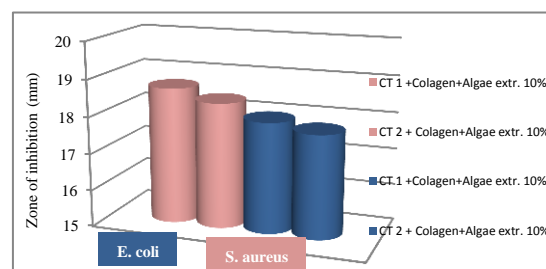


Fig.VIII.28. Rezultate comparative ale activității antimicrobiene a compozitului marin pe bacteriile studiate



FORMULĂRI TIP MEMBRANE (PELICULE) OBTINUTE DIN AMESTECUL COMPOZIT

Fig.VIII.29 prezintă plăcile de agar nutritiv și razele de difuziune formate în jurul membranelor, pentru fiecare din bacilii bacterieni analizați.

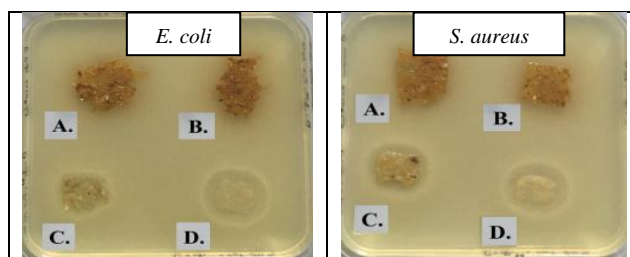


Fig.VIII.29. Activitatea antimicrobiană a membranelor de compozit marin pe bază de chitosan CT1+Colagen+Algă extr.20% B.CT1+Colagen+Algă extr.20% C. CT2+Colagen+Algă extr.10% D.CT2+Colagen+Algă extr.10%

Halourile formate în jurul membranelor nu au fost la fel de clare precum gelurile turnate în godeuri. Cu toate acestea, se observă o acțiune antimicrobiană bună pe care o exercită aceste formulări tip membrană pe fiecare din culturile bacteriene testate.

CAPITOLUL IX

STUDII FARMACO-CINETICE *IN VITRO* PE FORMULĂRI SEMISOLIDE CU CHITOSAN

S-au făcut cercetări *in vitro* pentru a studia cinetica de cedare a substantelor medicamentoase din formulări farmaceutice cu chitosan. Pentru studiul cedării substanțelor s-au pregătit probe de forme semisolide reprezentate de unguente tip U/A în care s-au încorporat două tipuri de chitosan, de două mase moleculare diferite, în 4 concentrații și o substanță de referință, ketoconazolul, care s-a menținut la o concentrație constantă de 2% în fiecare probă. S-a analizat profilul de cedare al ketoconazolului în funcție de influența concentrației de chitosan din fiecare tip de formulare.

IX.3. REZULTATELE EXPERIMENTALE

Tabelul IX.14 și Fig.IX.15 prezintă rezultatele cumulate pentru formularea FI, reprezentând viteza de cedare a ketoconazolului în funcție de concentrația de chitosan.

Tabelul IX.14. Parametrii de cedare ai ketoconazolului din formularea FI

Parametru	FI-10%	FI-20%	FI-30%	FI-40%
Viteză de cedare <i>in vitro</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$)	20,98	7,33	10,84	17,94
Latență ($\text{min}^{0.5}$)	-4,61	-12,17	-1,13	1,56
Coefficient de corelație (R^2)	0,9992	0,9944	0,9935	0,9943

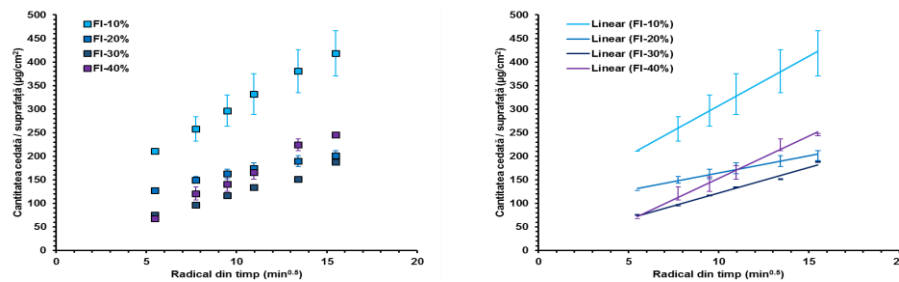


Fig.IX.15. Reprezentare a cantității recuperate la nivelul compartimentului donor, raportată la unitatea de suprafață, în funcție de radical din timp pentru toate concentrațiile de chitosan din FI

Tabelul IX.15 și Fig.IX.16 prezintă rezultatele cumulate pentru formularea FII, reprezentând viteza de cedare a ketoconazolului în funcție de concentrația de chitosan.

Tabelul IX.15. Parametrii de cedare ai ketoconazolului din formularea FII

Parametru	FII-10%	FII-20%	FII-30%	FII-40%
Viteză de cedare <i>in vitro</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$)	116,68	108,94	101,75	50,15
Latență ($\text{min}^{0.5}$)	3,79	2,89	2,82	3,96
Coefficient de corelație (R^2)	0,9974	0,9926	0,9991	0,9915

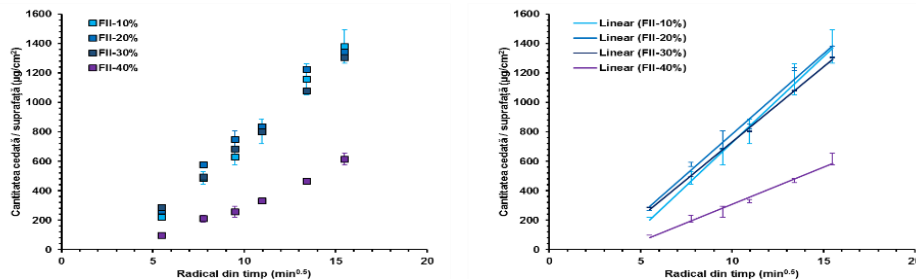


Fig.IX.16. Reprezentare a cantității recuperate la nivelul compartimentului donor, raportată la unitatea de suprafață, în funcție de radical din timp pentru toate concentrațiile de chitosan din FII

IX.4. DISCUȚIILE STUDIULUI DE CEDARE

Se constată că masa moleculară a celor doi chitosani luați în studiu influențează vizibil viteza de cedare. Astfel, formulările FII au înregistrat viteze de cedare precizabil mai mari decât formulările FI. Acest lucru este explicabil prin diferențe între mărimea lanțului polimeric al polizaharidului care este mai mare la formulările FII față de formulările FI. Se constată că la ambele formulări FI și FII cele mai mari viteze de cedare ale substanței active se înregistrează la concentrațiile de 10% chitosan față de cele de 20, 30, 40% explicabil prin vâscozitățile formelor de 10% mai mici comparativ cu celelalte.

CONCLUZII GENERALE

În urma studiilor originale prezentate pe parcursul a 6 capitole se pot trage următoarele concluzii generale care rezultă din fiecare capitol descris:

OBȚINEREA CHITOSANULUI DIN RESURSĂ MARINĂ DIN MAREA NEAGRĂ

Se pot evidenția următoarele:

- Am obținut chitosanul prin extracție chimică din carapacele dorsale ale crabilor de piatră, specia *Pachygrapsus marmoratus*, din Marea Neagră, folosind două variante de extracție. Am obținut doi chitosani diferiți ca masă moleculară, proprietăți și caracteristici funcționale.
- S-a constatat că gradul de dezacetilare este influențat de eficiența etapei de deproteinizare. S-a observat că deproteinizarea probelor are un rezultat mai bun în cazul variantei V1 de extracție, deoarece se utilizează o concentrație mai mare de NaOH (4%) și o temperatură de reacție mai ridicată (90 °C). Cu toate că timpul de reacție este mai lung în cazul variantei V2 pentru aceeași etapă de deproteinizare, temperatura și concentrația mai mare de reactiv alcalin conduc la un randament mai bun al eliminării proteinelor și zaharurilor din compoziția probelor.
- În etapa de decolorare am folosit aceeași temperatură pentru ambele variante de extracție. Diferența a constat în utilizarea soluțiilor cu acțiune de înlăturare a pigmentilor. Astfel, în varianta V1, proba a fost supusă unui tratament cu permanganat de potasiu, reacție ce s-a observat a fi mult prea severă datorită caracterului puternic oxidant al permanganatului. Acest tratament a influențat valoarea randamentului, deoarece a dus la pierderea unei proporții de chitină și implicit la obținerea unei cantități mai mici de chitosan. În varianta V2 de extracție decolorarea cu un amestec format din acetonă și eter etilic a condus la rezultate de randament mai bune, soluția decolorantă acționând doar asupra pigmentilor și coloranților din compoziția probei, neinfluențând structura polimerică a probei.
- Având în vedere rezultatele pentru fiecare din variantele de extracție analizate, putem concluziona că varianta V1 a condus la obținerea unei probe de chitosan mai calitativ, având aspectul unei pulberi fine, de culoarea alb-gălbuie, care în comparație cu varianta V2 necesită un timp mai scurt de reacție, la aproximativ aceleași temperaturi.
- Valorile ridicate de randament obținute sugerează că ambele tipuri de chitosan pe care i-am extras din crabii de piatră *Pachygrapsus marmoratus*, din Marea Neagră sunt o sursă convenabilă și economică de obținere al chitosanului datorită disponibilității și costului foarte mic al materiei prime.

CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A CHITOSANULUI OBȚINUT DIN *PACHYGRAPSUS MORMORATUS*

S-a constatat că:

- Chitosanul prezintă o variabilitate intrinsecă și poate avea proprietăți diferite în funcție de procesul și metoda de extracție chiar și când se pornește de la aceeași sursă de obținere. De menționat este faptul că acest biomaterial are un caracter foarte complex ce este greu de controlat.
- Toți parametrii funcționali ai chitosanului depind de cantitatea de grupări amino protonate din cadrul lanțului polimeric, adică de proporția dintre unitățile acetilate și ne-acetilate de D-glucozamină.
- Pentru chitosanul CT 1 am obținut o valoare mai mare a gradului de dezacetilare (71,5%) datorită temperaturii și concentrației mai ridicate de NaOH folosite în etapa de dezacetilare. Masa moleculară pentru CT 1 a fost mai mică decât cea a CT 2, fapt de a influențat și solubilitatea acestor probe, în sensul că proba CT 1 prezintă o solubilitate mai mare.
- Structura și morfologia chitosanului extras chimic din crabii *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră a fost confirmată prin analizele spectrofotometrice (FT-IR, UV-VIS), termice (TGA) și de microscopie electronică (SEM) efectuate în acest capitol.

- Rezultatele obținute pentru probele de chitosan CT 1 și CT 2 s-au încadrat în intervalele de valori standard și sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate.

FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN. STUDII PRIVIND COMPORTAREA REOLOGICĂ A UNOR FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN CU DIVERSE ALTE SUBSTANȚE ACTIVE

Aceste studii au evidențiat următoarele:

- Preparatele farmaceutice pentru aplicație topică pe care le-am pregătit au în compoziție chitosanul extras chimic ca substanță principală, la care am asociat acidul hialuronic, pentru efectul de regenerare a țesutului, sulfadiazina de argint, pentru efectul antiseptic, ketoconazolul, pentru acțiunea antimicotică și extracte alcoolice din alge marine, verzi și brune, pentru efectul lor antioxidant și antimicrobian.
- Am realizat aceste formulări asociate cu scopul de a obține preparate cu o eficiență de acțiune mărită și potențată de fiecare din componente în procesul de vindecare al rănilor cutanate.
- Algele marine prezintă atât un efect antioxidant cât și o acțiune antimicrobiană bună. Preparatele ce conțin un amestec al acestor două substanțe naturale au o acțiune mult mai pronunțată în prevenția infecțiilor bacteriene și cicatrizarea rănilor și conduc la obținerea unor forme farmaceutice sigure, cu toleranță ridicată, lipsite de toxicitate și reacții adverse. Efectul terapeutic este îmbunătățit datorită sinergismului de potențare al acțiunii dintre cele două componente.
- Am obținut membrane pe bază de chitosan și alge marine ce prezintă o elasticitate bună și o bioadezivitate similară celor comerciale. Datorită elasticității și rezistenței mecanice corespunzătoare permit tăierea la dimensiunea și forma dorită pentru aplicațiile topice.
- În urma studiilor reologice efectuate pentru formele farmaceutice semisolide au rezultat reograme ce prezintă tensiunea de forfecare în funcție de viteza de forfecare și evidențiază faptul că vâscozitatea aparentă pentru probele de cremă, scade cu creșterea vitezei de forfecare.
- Aceste rezultate evidențiază un caracter newtonian, pseudoplastic și tixotrop al probelor de cremă și unguent pe bază de chitosan.
- Toate probele analizate au avut un caracter reologic pseudoplastic, prezentând o scădere a vâscozității aparente cu creșterea vitezelor de forfecare.
- În cazul preparatelor sub formă de unguent pe bază de chitosan și extract de alge, reogramele obținute au evidențiat un fenomen de reopexie, cu excepția probei UC3. Probele UC2 și UC3 au o comportare diferită la viteze de forfecare mici, în comparație cu restul probelor.
- Probele de unguent cu chitosan și alge marine au evidențiat un grad mare de pseudoplasticitate, vitezele de forfecare pentru acest domeniu începând de la valori mai mici de 10 s^{-1} . Pseudoplasticitatea probelor nu este modificată semnificativ de concentrația de 2% a chitosanului și de prezența extractelor de alge, dar vâscozitatea scade. Această scădere a vâscozității la adăugarea de chitosan poate să indice o micșorare a interacțiunilor intermoleculare din probele respective. Vâscozitatea probelor scade și mai mult cu adăugarea extractului de alge, cel mai probabil din cauza diluării probei.
- Pentru formulările tip gel din chitosan, analiza reogramelor obținute evidențiază un comportament pseudoplastic pentru proba de gel G1. Reograma prezintă cele două curbe obținute la creșterea și descreșterea vitezei de forfecare, care aproape se suprapun, conducând la un caracter mai puțin tixotrop. Incorporarea extractului de algă în proba G1 nu modifică semnificativ gradul de tixotropie, influențând doar comportarea la curgere.
- Formele farmaceutice pe care le-am realizat în acest studiu au evidențiat un caracter newtonian, pseudoplastic și tixotrop al probelor analizate și sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate.

STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE TOTALE A NOILOR FORME FARMACEUTICE PE BAZĂ DE CHITOSAN

Din aceste studii din acest capitol se trage următoarele concluzii:

- S-a investigat proprietatea antioxidantă a chitosanului extras chimic din specia de crab de piatră *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră. Analiza s-a efectuat atât pe chitosan ca substanță propriuzisă de studiu, cât și pe combinații ale acestui polimer cu alte substanțe de origine marină.
- Am luat în studiu 4 tipuri de alge marine (*Ulva lactuca*, *Cystoseira barbata*, *Ceramium rubrum* și *Cladophora vagabunda*), pregătite ca și extracte alcoolice. Am determinat pentru fiecare algă conținutul total de polifenoli prin metoda spectrofotometrică, iar pentru speciile de algă verde *Ulva lactuca* și algă brună *Cystoseira barbata*, s-a analizat continuul în fenoli prin metoda cromatografică HPLC.

- Putem relata că studiul efectuat pe algele marine a evidențiat un conținut bogat în polifenoli, rezultat ce susține activitatea antioxidantă a acestor substanțe.
- Rezultatele obținute arată faptul că proprietățile antioxidante ale chitosanului extras din *Pachygrapsus marmoratus* din Marea Neagră au crescut cu creșterea concentrației de chitosan din probele analizate.
- Prin testarea puterii reducătoare cu FeCl_3 s-a evidențiat de fapt puterea reducătoare a chitosanului, ce acționează prin reducerea ionului Fe^{3+} la Fe^{2+} . Puterea reducătoare a chitosanului a prezentat valori relativ mari comparativ cu datele obținute pentru chitosanul comercial.
- Rezultatele obținute pentru testarea capacității de captare a radicalilor DPPH au evidențiat de asemenea o creștere a acțiunii antioxidante cu creșterea concentrației de chitosan din probele analizate.
- De asemenea, și în cazul testării capacității de captare a radicalilor liberi, s-au înregistrat cele mai bune rezultate în cazul probelor cu concentrațiile cele mai mari.
- Prin aceste studii s-a evidențiat faptul că activitatea antioxidantă a chitosanului este dependentă de concentrația de polimer din compoziția probelor, crescând proporțional cu aceasta.
- Rezultatele înregistrate pentru aceste probe de compozit marin arată aceeași tendință de creștere a activității antioxidante cu creșterea concentrației compozitului.
- Rezultatele obținute pentru determinarea activității antioxidante a chitosanului și compozitului de origine marină au evidențiat o dependență a capacității antioxidante de concentrația chitosanului din compoziția probelor. Puterea antioxidantă a crescut progresiv și liniar cu creșterea valorilor concentrației.
- Atât chitosanul cât și algele marine prezintă proprietăți antioxidante bune și asocierea acestora în diverse forme farmaceutice conduce la potențarea acestei acțiuni, ce generează obținerea unui efect terapeutic îmbunătățit și complex.

CERCETĂRI PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A COMPUSILOR FARMACEUTICI CU CHITOSAN

Din acest capitol se poate concluziona că:

- Rezultatele obținute în cazul chitosanului au arătat că acțiunea antimicrobiană a acestuia este influențată de mai mulți factori, precum: masa moleculară, gradul de dezacetilare, pH-ul, concentrația și volumul de soluție folosit, dar și de tipul microorganismului pe care acționează. Astfel:
- Masa moleculară are o influență majoră asupra dezvoltării și multiplicării microorganismelor. Efectul inhibitoriu este mai pronunțat cu cât valoarea masei moleculare este mai mică.
- Gradul de dezacetilare prezintă o influență mai mică decât masa moleculară. Rezultatele au arătat că o valoare mică a gradului de dezacetilare conduce la un efect antimicrobian mai bun al chitosanului.
- Creșterea concentrației conduce la o scădere a puterii de inhibiție a chitosanului, pe când creșterea volumului de soluție influențează pozitiv acțiunea inhibitorie asupra dezvoltării microbiene.
- Chitosanul, fiind o substanță cu caracter cationic, acționează mai eficient asupra bacteriilor gram-pozitive decât asupra bacililor gram-negativi, datorită interacțiunii electrostatice de la nivelul peretelui celular al bacteriei.
- Studiile efectuate au demonstrat eficacitatea și caracterul antimicrobian al chitosanului asupra diferitelor microorganisme, și anume: o bacterie de tip gram-pozitiv (*S. aureus*), un bacil gram-negativ (*E. coli*) și o ciupercă (*C. albicans*).
- S-a observat o potențare a acțiunii de inhibiție a chitosanului la asocierea cu alte substanțe ce prezintă aceleași caracteristici. Atât în cazul preparatului simplu de chitosan, cât și în cazul formulărilor compuse, se observă un efect antimicrobian superior la preparatele ce conțin tipul de chitosan CT 1, cu masă moleculară mai mică. Ambii parametri funcționali afectează această proprietate în mod independent și în același sens, adică o scădere a valorii acestora conduce la creșterea activității antimicrobiene.
- Formulările tip gel pe bază de chitosan și collagen au exercitat un efect mai bun asupra bacililor gram-pozitiv de *S. aureus*, decât pe *E. coli*. Adăugarea collagenului în formulare a condus la mărirea efectului antimicrobian, deoarece acest polimer acționează predominant pe bacilii gram-pozitivi, la fel ca și chitosanul.
- La adăugarea extractelor de alge marine în formulările compozite pe bază de chitosan și collagen, am observat o potențare a efectului inhibitoriu asupra ambelor tipuri de microorganisme analizate. Cel mai bun efect antibacterian s-a observat în cazul formulării tip compozit pe bază de chitosan CT 1, collagen și extracte de algă 20% asupra bacilului *S. aureus*.
- Formulările studiate și combinațiile de substanțe pe care le-am realizat au dezvăluit o acțiune superioară antibacteriană pe toate culturile patogene studiate, evidențiind sinergismul de potențare pe care îl exercită.
- Având la bază numai componente de origine naturală, biocompatibile și biodegradabile, ce prezintă o toxicitate aproape nulă, aceste formulări reprezintă o alternativă inovativă pentru realizarea unor noi forme farmaceutice naturale în industria farmaceutică și nu numai.

STUDII FARMACO-CINETICE IN VITRO PE FORMULĂRI SEMISOLIDE CU CHITOSAN

Din prezentele studii s-au tras următoarele concluzii:

- S-a analizat profilul de cedare al ketoconazolului în funcție de influența concentrației de chitosan din fiecare tip de formulare.
- Se constată că masa moleculară a celor doi chitosani luați în studiu influențează vizibil viteza de cedare. Astfel, formulările FII (cu chitosanul cu masa moleculară mai mare) au înregistrat viteze de cedare precizabil mai mari decât formulările FI (cu chitosanul cu masa moleculară mai mică). La ambele formulări FI și FII cele mai mari viteze de cedare ale substanței active se înregistrează la concentrațiile de 10% chitosan față de cele de 20, 30, 40% explicabil prin vâscozitățile formelor de 10% mai mici comparativ cu celelalte.
- În cazul formulărilor FI cu chitosan cu masă moleculară mai mică se înregistrează o variație atipică a vitezei de cedare, scădere-creștere, cu concentrația de chitosan. Dependența vitezei de eliberare de concentrația de chitosan este mai degrabă parabolică. O scădere urmată de o creștere. La toate concentrațiile apare un time-lag, probabil necesar pătrunderii solventului în matrice.
- Pentru formularea FII eliberarea decurge în general în două faze. O primă fază este de cedare burst sau dimpotrivă de întârziere a cedării. Această comportare s-ar putea explica prin existența unei fracții libere de ketoconazol la concentrații mai mici de chitosan, fracție care scade cu creșterea concentrației chitosanului.
- La concentrația cea mai mare (40%), ketoconazolul este legat complet și eliberarea lui necesită o îmbibare a matricii. Viteza scade și ea cu creșterea concentrației de chitosan.
- Diferența foarte mare de viteză între cele două tipuri de chitosan, se datorează probabil unor diferențe de structură ale unguentului format și/sau de tăria legăturii între chitosan și ketoconazol.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Abdollahi M., Rezaei M., Farzi G., A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *J. Food Eng.*, 111, p. 343–350, 2012.
- Alsarra I. A., Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45:p. 16–21, 2009.
- Andreu-Navarro A., Fernandez-Romero J. M., Gomez-Hens A., Determination of antioxidant additives in foodstuffs by direct measurement of gold nanoparticle formation using resonance light scattering detection. *Analytica Chimica Acta*, 695: p. 11–17, 2011.
- Anthony R., Sharara M.A., Runge T.M., Anex R.P., Life cycle comparison of petroleum- and bio-based paper binder from distillers grains (DS), *Ind.Crops Prod.*, 96:p. 1–7, 2017.
- Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras Á., Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, (3): p. 203-230, 2009.
- Azuma K., Izumi R., Osaki T., Ifuku S., Morimoto M., Saimoto H., Minami S., Okamoto Y., Chitin, chitosan and its derivatives for wound healing: old and new materials, *J. Funct. Biomater.*, (6): p. 104–142, 2015.
- Bano I., Arshad M., Yasin T., Ghauri M.A., Younus M., Chitosan: A potential biopolymer for wound management, *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: p. 380–383, 2017.
- Becerra J., Sudre G., Royaud I., Montserret R., Verrier B., Rochas C., Delair T., David L., Tuning the hydrophilic/hydrophobic balance to control the structure of chitosan films and their protein release behaviour, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 18: p. 1070–1083, 2017.
- Bedian L., Villalva-Rodríguez A.M., Hernández-Vargas G., Parra-Saldivar R., Iqbal H.M.N., Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – a review, *Int. J. Biol. Macromol.*, 98: p. 837–846, 2017.
- Bedian L., Villalva-Rodríguez A.M., Hernández-Vargas G., Parra-Saldivar R., Iqbal H.M.N., Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – a review, *Int. J. Biol. Macromol.*, 98: p. 837–846, 2017.
- Benson H.A.E., Watkinson A.C., *Topical and Transdermal Drug Delivery: Principles and Practice* (John Wiley and Sons). 2012.
- Berker K. I., Gueclue K., Tor I., Demirata B., Apak R., Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method. *Food Analytical Methods*, 3: p. 154–168, 2010.
- Brück W.M., Slater J.W., Carney B.F., Chitin and chitosan from marine organisms, in: S.K. Kim (Ed.), *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, Biological Activities and Applications*, CRC Press and Taylor & Francis Group, Florida, p. 11–23. 2011.
- Cazón P., Velázquez G., Ramirez J.A., Vázquez M., Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: a review. *Food Hydrocolloids*, (68): p. 136–148, 2017.
- Chandrasekara A., Shahidi F., Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: p. 6706–6714, 2010.

- Chan-Eam S., Teerasong S., Damwan K., Nacapricha D., Chaisuksant R., Sequential injection analysis with electrochemical detection as a tool for economic and rapid evaluation of total antioxidant capacity. *Talanta*, 84: p. 1350–1354, 2011.
- Czechowska-Biskup R., Jarosińska D., Rokita B., Ulański P., Rosiak J. M., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, (7): p. 5-20, 2012.
- De la Fuente M., Ravina M., Paolicelli P., Sanchez A., Seijo B., Alonso M.J., Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, (62): p. 100-17, 2010.
- Dreifke M.B., Jayasuriya A.A., Jayasuriya A.C., Current wound healing procedures and potential care, *Mater. Sci. Eng., C* 48: p. 651–662, 2015.
- Dudhani A.R., Kosaraju S.L., Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydr. Polym.*, 81, p. 243–251, 2010.
- Eaton P., Fernandes J.C., Pereira E., Pintado M.E., Malcata F.X., Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108: p. 1128–1134, 2008.
- Ferdous J., Kolachalama V.B., Shazly T., Impact of polymer structure and composition on fully resorbable endovascular scaffold performance. *Acta Biomater.*, 9, p. 6052–6061, 2013.
- Fernández de Castro L., Mengibar M., Sánchez A., Arroyo L., Villarán M. C., Díaz de Apodaca E., Heras A., Films of chitosan and chitosan-oligosaccharideneutralized and thermally treated: effects on its antibacterial and other activities, *LWT-Food Sci. Technol.*, 73: p. 368–374, 2016.
- FR.X., Farmacopeea Română, Ediția a X-a, Agenția Națională a Medicamentului, 2013.
- Gong Y., Plander S., Xu H., Simandi B., Gao Y., Supercritical CO₂ extraction of oleoresin from marigold (*Tagetes erecta* L.) flowers and determination of its antioxidant components with online HPLC-ABTS+ assay. *J. Sci. Food*, 91: p. 2875–2881, 2011.
- Hajjia S., Younesa I., Ghorbel-Bellaaja O., Hajjib R., Rinaudoc M., Nasria M., Jellouli K., Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65: p. 298–306, 2014.
- Haripriya S., Kanayairam V., Ramanibai R., Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107: p. 662–667, 2018.
- Hettiarachchi M.A., Wickramarachchi P.A.S.R., Synthesis of chitosan stabilized silver nanoparticles using gamma ray irradiation and characterization. *J. Sci. Univ., Kelaniya*, (6): p. 65–75, 2011.
- Hossain M. S., Iqbal A., Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *J. Bangladesh Agril. Univ.*, 12(1): p. 153–160, 2014.
- Isik E., Sahin S., Demir C., Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111: p. 119–124, 2013.
- Jepps O.G., Dancik Y., Anissimov Y.G., Roberts M.S., Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65: p. 152–168, 2013.
- Jiahua M., Chao X., Chengjia T., Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: p. 547–556, 2015.
- Jiang Q.M., Tan C.J., Ma J.H., Yang M., Screening of active fraction of anti-benign prostatic hyperplasia from *Catharsius molossus* (I), *Pharmacol. Clin. Chin. Mater. Med.*, 28: p. 100–103, 2012.
- Kedare S. B., Singh R. P., Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48: p. 412–422, 2011.
- Khan F.I., Rahman S., Queen A., Ahamad S., Ali S., Kim J., Hassan M.I., Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101: p. 3513–3536, 2017.
- Kulikov S.N., Lisovskaya S.A., Zelenikhin P.V., Bezrodnykh E.A., Shakirova D.R., Blagodatskikh I.V., Tikhonov V.E., Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: molecular weight-activity relationship, *Eur. J. Med. Chem.*, 74: p. 169–178, 2014.
- Kulikov S.N., Tikhonov V.E., Bezrodnykh E.A., Lopatin S.A., Varlamov V.P., Comparative evaluation of antimicrobial activity of oligochitosans against *Klebsiella pneumoniae*, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 41: p. 57–62, 2015.
- Kumari S., Annamareddy Sri Hari K., Abanti S., Rath P. K., Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104: p. 1697–1705, 2017.
- Lagarto A., Merino N., Valdes O., Dominguez J., Spencer E., de la Paz N., et al., Safety evaluation of chitosan and chitosan acid salts from *Panurilus argus* lobster, *Int. J. Biol. Macromol.*, 72: p. 1343–1350, 2015.
- Li Z., Yang F., Yang R., Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups, *Int. J. Biol. Macromol.*, 75: p. 378–387, 2015.
- Liu C.H., Chang F.Y., Hung D.K., Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: Effects of terpenes and cosurfactants. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 82: p. 63–70, 2011.
- Lizardi - Mendoza J., Monal W.M.A., Valencia F.M.G., Chemical characteristics and functional properties of chitosan, in: S. Bautista-Banos, G. Romanazzi, A. Jiménez-Aparicio (Eds.), *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, Academic Press, Elsevier Inc., Cambridge, p. 3–31, 2016.
- Ma J.H., Tan C.J., Zhao Y.S., He F.Y., Yang M., Establishment of fingerprint of active fraction from dried body of *Catharsius molossus* by capillary electrophoresis and analysis by its total quantum statistical moment, *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 44: p. 1263–1266, 2013.
- Maragoni V., Dasari A., Alle M., Nagati V. B., Guttena V., A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Appl. Nanosci.*, (4): p. 113–119, 2014.

- Matet M., Heuzey M.C., Pollet E., Ajji A., Avérous L., Innovative thermo plastic chitosan obtained by thermo-mechanical mixing with polyol plasticizers, *Carbohydr. Polym.*, 95:p. 241–251. 2013.
- Melillas C., Valdés A., Ramos M., Burgos N., Garrigós M.C., Jiménez A., Active edible films: current state and future trend, *J. Appl. Polym. Sci.*, 133:p. 42631–42645. 2016.
- Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., Okamoto Y., Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing, *Carbohydrate Polymers*, (67): p. 640–644. 2007.
- Mogoşanu G. D., Grumezescu A. M., Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, (463): p. 127–136. 2014.
- Monarul Islama Shah., Md. Masumb., Mahbubur Rahma-na. M., Md. Ashraful Islam Mollab., Preparation of Chitosan from Shrimp Shell and Investigation of Its Properties. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 11(1): p. 116-130. 2011.
- Montenegro C., Carbone G., Puglisi G., Vehicle effects on *in vitro* release and skin permeation of octylmethoxycinnamate from microemulsions, *Int. J. Pharm.*, 405, p. 162-168. 2011.
- Musa K. H., Abdullah A., Kuswandi B., Hidayat M. A., A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 141: p. 4102–4106. 2013.
- Ocloo F.C.K., Quayson E.T., Adu-Gyamfi A., Quarcoo E.A., Asare D., Serfor-Armah Y., Woode B.K., *J. Radiat. Phys. Chem.*, (80): p. 837–841. 2011.
- Ozyürek M., Güngör N., Baki S., Güçlü K., Apak R., Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *Analytical Chemistry*, 84: p. 8052–8059. 2012.
- Ragubeer N., Beukes D. R., Limson J. L., Critical assessment of voltammetry for rapid screening of antioxidants in marine algae. *Food Chemistry*, 121: p. 227–232. 2010.
- Rodríguez-Núñez J.R., Madera-Santana T.J., Sánchez-Machado D.I., López-Cervantes J., Soto-Valdez H., Chitosan/hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties, *J. Polym. Environ.*, 22:p. 41–51. 2014.
- Ruocco N., Constantini S., Guariniello S., Constantini M., Polysaccharides from the marine environment with pharmacological, cosmeceutical and nutraceutical potential, *Molecules*, 21:) p. 551. 2016.
- Saad B. Q., Shehriar H., Ying H., Maksym P., Deineka V., Lyndin M., Rawlinson A., Ihtesham U. R., In-vitro and in-vivo degradation studies of freeze gelled porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications, *Polymer Degradation and Stability*, (136): p. 31-38. 2017.
- Sayari N., Sila A., Abdelmalek B.E., Abdallah R.B., Ellouz-Chaabouni S., Bougateg A., Balti R., Chitin and chitosan from the Norway lobster by products: antimicrobial and anti-proliferative activities, *Int. J. Biol. Macromol.*, 87: p. 163–171. 2016.
- Severino R., Ferrari G., Vu K.D., Donsi F., Salmieri S., Lacroix M., Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils: modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on greenbeans, *Food Control* 50: p. 215–222. 2015.
- Shahidi F., Zhong Y., Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18: p. 757–781. 2015.
- Silva T.H., Alves A., Ferreira B.M., Oliveira J.M., Reis L.L., Ferreira R.J.F., Sousa R.A., Silva S.S., Mano J.F., Reis R.L., Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest, *Int. Mater. Rev.* 57: p. 276–306. 2012.
- Soumya S., Sajesh K.M., Jayakumar R., Nair S.V., Chennazhi K.P., Development of a phytochemical scaffold for bone tissue engineering using *Cissus quadrangularis* extract. *Carbohydr. Polym.*, 87(2): p. 1787–95. 2012.
- Tao J., Roshan J., Sangamesh G.K., Cato T.L., Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. (5): p. 91-111. 2014.
- Toskas G., Heinemann S., Heinemann C., Cherif C., Hund R.D., Roussis V., et al. Ulvan and ulvan/chitosan polyelectrolyte nanofibrous membranes as a potential substrate material for the cultivation of osteoblasts. *Carbohydr. Polym.*, 89(3): p. 997–1002. 2012.
- Venkatesham M., Ayodhya D., Madhusudhan A., Veera Babu N., Veerabhadram G., A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies, *Appl Nanosci.*, 4: p. 113–119. 2014.
- Vergou T., Hauser M., In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Skin Res. Technol.*, 18: p. 364–369. 2012.
- Verlee A., Mincke S., Stevens C.V., Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr. Polym.* 164: p. 268–283. 2017.
- Yateendra S. P., Saikishore V., Sudheshnababu S., Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9): p. 258-263. 2012.
- Yuan G., Lv H., Tang W., Zhang X., Sun H., Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific whiteshrimp during iced storage, *Food Control*, 59:p. 818–823. 2016.
- Zapata P. A., Rojas D. F., Atehortua L., “Production of biomass, polysaccharides, and ganoderic acid using nonconventional carbon sources under submerged culture of the lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst., (higher basidiomycetes),” *International Journal of Medicinal Mushrooms*, (12)2: p. 197–203, 2012.
- Ziyatdinova G., Salikhova I., Budnikov H., Coulometric titration with electrogenerated oxidants as a tool for evaluation of cognac and brandy antioxidant properties. *Food Chemistry*, 150: p. 80–86. 2014.