

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244848 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **436027**

(22) Data zgłoszenia: **2020.11.20**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.05.23 BUP 21/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.03.11 WUP 11/2024**

(51) MKP:

C08G 63/133 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MAŁGORZATA LATOS-BRÓZIO, Julianów, PL

ANNA MASEK, Łódź, PL

MAŁGORZATA PIOTROWSKA, Zgierz, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Sposób otrzymywania poli(naringeniny)

PL 244848 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytworzenia poli(naringeniny), przeznaczonej do zastosowania jako stabilizator materiałów polimerowych, materiałów na bazie biopolimerów i polimerów przyjaznych środowisku, a także jako dodatek antymikrobiologiczny do polimerowych materiałów opakowaniowych.

Naringenina jest naturalnym polifenolem z grupy flawonoidów, występującym w owocach cytrusowych. Wykazano, że ten bioflawonoid posiada między innymi właściwości przeciwutleniające. Ze względu na zdolność do opóźnienia procesów utleniania, w literaturze naukowej proponuje się zastosowanie naringeniny jako środka stabilizującego materiały polimerowe, a nadto opisuje się właściwości biologiczne tego związku, między innymi działanie antybakteryjne.

Wartościowe właściwości polifenoli z grupy flawonoidów ściśle zależą od ich struktury chemicznej. Z danych literaturowych wynika, że polimeryczne formy flawonoidów mogą charakteryzować się silniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi, lepszą aktywnością przeciwdrobnoustrojową oraz wyższą stabilnością termiczną.

Znane są następujące reakcje polimeryzacji flawonoidów: polimeryzacja enzymatyczna, fotopolimeryzacja, polimeryzacja katalizowana kwasem HCl, autokondensacja, polimeryzacja ze związkiem sieciującym.

Znany jest również sposób otrzymywania polimerycznych form kwercetyny oraz jej glikozydu – rutyny, polegający na polimeryzacji ze związkiem sieciującym w postaci eteru diglicydyłowego glicerolu (GDE), z zastosowaniem L- α lecytyny jako środka powierzchniowo-czynnego, w środowisku cykloheksanu w przypadku otrzymywania poli(kwercetyny) lub w środowisku benzyny przy otrzymywaniu poli(rutyny). Gotowy produkt przemywa się cykloheksanem, a następnie mieszaniną wody z etanolem (czasopisma: *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* 452 (2014) 173–180 oraz *Materials Science and Engineering C* 44 (2014) 9–16).

Cząsteczka kwercetyny oraz rutyny, flawonoidów z grupy flawonoli, zawiera, jak większość flawonoidów, szkielet węglowy z grupą ketonową w pozycji 4, podczas gdy naringenina jest flawonoidem z grupy flawononów i w odróżnieniu od kwercetyny nie posiada w strukturze podwójnego wiązania w pierścieniu C. Ponadto w odróżnieniu od kwercetyny, naringenina nie posiada grupy orto-dihydroksylowej (katecholowej) w pierścieniu struktury B.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wytworzenia polimerycznej formy naringeniny.

Sposób otrzymywania poli(naringeniny), z wykorzystaniem metody polimeryzacji ze związkiem sieciującym w postaci eteru diglicydyłowego glicerolu (GDE), w obecności L- α lecytyny jako środka powierzchniowo-czynnego, w środowisku cykloheksanu, **według wynalazku** polega na tym, że w pierwszej kolejności sporządza się roztwór (+)-naringeniny w 1 M roztworze wodnym wodorotlenku sodu stosując 1 g (+)-naringeniny na 10 ml roztworu wodorotlenku. Następnie tak sporządzony roztwór dodaje się do 0,1 M roztworu lecytyny w cykloheksanie stosując 2,67 ml roztworu (+)-naringeniny na 100 ml roztworu lecytyny, po czym całość miesza się przez 2 godziny z szybkością 1000 obrotów/minutę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodaje się eter diglicydyłowy glicerolu (GDE) w ilości równomolowej w stosunku do ilości zastosowanej (+)-naringeniny i miesza całość z szybkością 1000 obrotów/minutę do całkowitego zużycia GDE, korzystnie 2 godziny, po czym otrzymaną poli(naringeninę) przemywa się dwukrotnie cykloheksanem z odwirowaniem z szybkością 6000 obrotów/minutę trwającym 30 minut, w temperaturze pokojowej i suszy w temperaturze 35°C przez 72 godziny.

Otrzymany proszek poli(naringeniny) charakteryzuje się podwyższoną odpornością na utlenianie oraz lepszą stabilnością termiczną w porównaniu z monomeryczną naringeniną i również wykazuje działanie antymikrobiologiczne. Poli(naringenina) może być zastosowana jako stabilizator materiałów polimerowych, materiałów na bazie biopolimerów i polimerów przyjaznych środowisku, a także jako dodatek antymikrobiologiczny do polimerowych materiałów opakowaniowych.

Przedmiot wynalazku ilustruje poniższy przykład z powołaniem się na rysunek, na którym fig. 1–3 ilustrują wyniki badań poli(naringeniny) otrzymanej w przykładzie.

Przykład

W pierwszej kolejności sporządzono roztwór 1 g (3,6 mola) (+)-naringeniny w 10 ml 1 M NaOH. Następnie 4 ml tak przygotowanego roztworu dodano do 150 ml 0,1 M roztworu lecytyny w cykloheksanie i całość mieszało przez 2 godziny z szybkością 1000 obrotów/minutę w temperaturze 20°C. Po tym czasie dodano 3,6 mmola eteru diglicydyłowego glicerolu (GDE). Po 2 godzinach mieszania z szybkością

1000 obrotów/minutę, otrzymany produkt przemyto dwukrotnie cykloheksanem z odwirowaniem z szybkością 6000 obrotów/minutę trwającym 30 minut, w temperaturze pokojowej, a następnie wysuszono w temperaturze 35°C w czasie 72 godziny. Otrzymano 0,85 g produktu – poli(naringeniny) w postaci proszku o ciemnopomarańczowej barwie.

W celu potwierdzenia, iż otrzymany produkt stanowi poli(naringenina) wykonano widmo w podczerwieni otrzymanego proszku. Dla porównania wykonano także widmo w podczerwieni referencyjnej monomerycznej (+)-naringeniny.

Wyniki przedstawiono na wykresach na fig. 1 rysunku. Widma w podczerwieni przedstawiono na wykresach na fig. 1 rysunku. Jak wynika z fig. 1 rysunku widmo w podczerwieni otrzymanego proszku różniło się od widma referencyjnej (+)-naringeniny, co potwierdziło fakt otrzymania z monomeru – (+)-naringeniny związku o odmiennej strukturze. Zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi widm w podczerwieni polimerycznych form flawonoidów (kwercetyny i rutyny), obecność następujących pasm w widmie w podczerwieni była charakterystyczna dla polimerycznej formy flawonoidu:

370–1250 cm^{-1} – drgania rozciągające aryłu,

3700–3000 cm^{-1} – szerokie pasma odpowiadające tworzeniu wolnego OH pochodzącego z GDE,

1061 cm^{-1} – C-CO-C w ketonach,

750–790 cm^{-1} i 800–900 cm^{-1} – epoksydy (od GDE).

Ponadto na widmie obecne były piki charakterystyczne dla grup funkcyjnych obecnych we flawonoidach:

2922 cm^{-1} – Ar-CH₃,

1560–1570 cm^{-1} i 1450–1500 cm^{-1} – drgania wibracyjne od pierścieni aromatycznych flawonoidu,

1165 cm^{-1} – C-OH.

Pojawienie się na widmie poli(naringeniny) pasm charakterystycznych dla polimerycznych form flawonoidów świadczyło o reakcji sieciowania (+)-naringeniny i otrzymaniu wielkocząsteczkowego/polimerycznego związku.

Otrzymany proszek poli(naringeniny) poddano analizie termogravimetrycznej TGA. Próbkę proszku ogrzewano w temperaturze od 25°C do 800°C przy dynamicznym przepływie argonu (50 ml/min). Dla porównania wykonano także analizę TGA referencyjnej (+)-naringeniny. Wyniki przedstawiono w poniższej tabelicy 1 oraz na termogramach przedstawionych na fig. 2 rysunku.

T a b l i c a 1

Próbka	T10	T50	T60
Naringenina	307	436	591
Poli(naringenina)	144	416	685

T10, T50, T60 oznaczają odpowiednio temperatury, w których nastąpił ubytek masy badanej próbki wynoszący 10% i 50% i 60%.

Monomeryczna naringenina rozkłada się jednoetapowo. W zakresie temperatur 290–380°C następuje 67% ubytek masy próbki.

Poli(naringenina) rozkłada się dwuetapowo. Pierwszy etap rozkładu następuje około 250°C, a ubytek masy wynosi 10%. Drugi etap rozkładu następuje w zakresie temperatur 270–370°C. Etapowi drugiemu towarzyszy ubytek masy próbki wynoszący 36,2%. Rozkład poli(naringeniny) zaczyna się w niższej temperaturze niż rozkład naringeniny (T10 poli(naringeniny) = 144°C, T10 naringenina = 307°C). Temperatura połowicznego rozkładu poli(naringeniny) T50 jest o 20°C niższa od T50 monomerycznej naringeniny. Może to być spowodowane dodatkiem związku sieciującego GDE, który może obniżać wartości T10 i T50. Końcowa temperatura rozkładu polimerycznej naringeniny T60 jest wyższa o 94°C od T60 monomerycznej naringeniny, co oznacza wyższą stabilność termiczną polimerycznej formy naringeniny.

Otrzymany proszek poddano także różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC.

Próbki ogrzewano w temperaturze od -80 do 400°C z prędkością 10°C/minutę w atmosferze powietrza. Dla porównania wykonano także DSC monomerycznej naringeniny. Wyniki przedstawiono w poniższej tabelicy 2 oraz na termogramach na fig. 3 rysunku.

Tablica 2

Próbka	T _g [°C]	ΔH _m [J/g]	T _m [°C]	ΔH _o [J/g]	T _o [°C]
Naringenina	-	163,21	253,94	87,48	331,54 (endset)
Poli(naringenina)	-	425,09	45,12	594,39	345,33 (endset)

T_g oznacza temperaturę zeszklenia, ΔH_m – entalpię topnienia, T_m – temperaturę topnienia, ΔH_o – entalpię utleniania i degradacji, T_o – temperaturę utleniania i degradacji.

Poli(naringenina) charakteryzuje się niższą temperaturą topnienia niż monomeryczna naringenina. Jest to związane z dodatkiem związku sieciującego GDE, który może obniżać T_m. Entalpia topnienia poli(naringeniny) jest około 2,6-krotnie wyższa niż entalpia topnienia monomerycznej naringeniny. Poli(naringenina) posiada wyższą końcową temperaturę utlenienia T_o (o 13,79°C) oraz większą entalpię utleniania ΔH_o (około 6,8-krotnie). Polimeryczna forma naringeniny wykazuje więc większą odporność na utlenianie. Otrzymany proszek poli(naringeniny) zbadano także pod kątem aktywności antygrzybowej. Badania prowadzono metodą dynamiczną „flask shake methods”.

W badaniach wykorzystano szczepy testowe grzybów *Candida albicans* ATCC 10231 oraz *Aspergillus niger* ATCC 16404. Liczbę mikroorganizmów w próbkach po 24 godzinach inkubacji oznaczano metodą hodowlaną na pożywce MEA (grzyby). Ponadto w próbkach kontrolnych (tylko mikroorganizmy) określano liczebność na początku eksperymentu (t = 0). Wyniki podawano jako liczbę jednostek tworzących kolonie/ml pożywki (jtk/ml). Określono współczynniki zamierania mikroorganizmów D:

$$D = (\log \text{liczby mikroorganizmów } t=0 - \log \text{liczby mikroorganizmów } t=24).$$

Wyniki badań zestawiono w poniższej tablicy 3.

Tablica 3

Próbka	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
<i>Candida albicans</i>					
pożywka kontrolna		3,7×10 ⁶		6,57	1,29
(+) naringenina	1,9×10 ⁵	1,4×10 ⁶	5,28	6,15	0,87
poli(naringenina)		8,2×10 ⁵		5,91	0,64
<i>Aspergillus niger</i>					
pożywka kontrolna		2,4×10 ⁵		5,38	1,27
(+)naringenina	1,3×10 ⁴	2,3×10 ³	4,11	3,36	- 0,75
poli(naringenina)		1,5×10 ³		3,18	- 0,94

Po 24 godzinach inkubacji obserwowano przyrost liczby wszystkich organizmów w pożywce kontrolnej bez związków polifenolowych.

Przeanalizowano wzrost liczby komórek drożdży *Candida albicans* w hodowli monomerycznej naringeniny i poli(naringeniny). Współczynnik zamierania mikroorganizmów D w hodowli poli(naringeniny) wynosił 0,64 wartości logarytmu, co oznaczało, że próbka poli(naringeniny) wykazuje aktywność bakteriostatyczną. Referencyjna monomeryczna naringenina nie wykazała takiej aktywności.

Liczba komórek pleśni *Aspergillus niger* po 24 godzinach wzrosła o ponad jeden rząd jedynie w próbce kontrolnej bez polifenoli. W pozostałych próbkach, zawierających monomeryczną naringeninę i poli(naringeninę) odnotowano obniżenie liczby komórek w hodowlach z obydwoma związkami, co oznacza, że wykazują one aktywność przeciwgrzybową. Monomeryczna naringenina i poli(naringenina) wykazują porównywalną aktywność antygrzybową.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób otrzymywania poli(naringeniny), z wykorzystaniem metody polimeryzacji ze związkim sieciującym w postaci eteru diglicydyowego glicerolu, w obecności L- α lecytyny jako środka powierzchniowo-czynnego, w środowisku cykloheksanu, **znamienny tym**, że w pierwszej kolejności sporządza się roztwór (+)-naringeniny w 1 M roztworze wodnym wodorotlenku sodu stosując 1 g (+)-naringeniny na 10 ml roztworu wodorotlenku, następnie tak sporządzony roztwór dodaje się do 0,1 M roztworu lecytyny w cykloheksanie stosując 2,67 ml roztworu (+)-naringeniny na 100 ml roztworu lecytyny i całość miesza się przez 2 godziny z szybkością 1000 obrotów/minutę w temperaturze pokojowej, po czym dodaje się eter diglicydyowy glicerolu w ilości równomolowej w stosunku do ilości zastosowanej (+)-naringeniny i miesza całość przez 2 godziny z szybkością 1000 obrotów/minutę i w końcu otrzymaną poli(naringeninę) przemywa się dwukrotnie cykloheksanem z odwirowaniem z szybkością 6000 obrotów/minutę trwającym 30 minut, w temperaturze pokojowej i suszy w temperaturze 35°C przez 72 godziny.

Rysunki

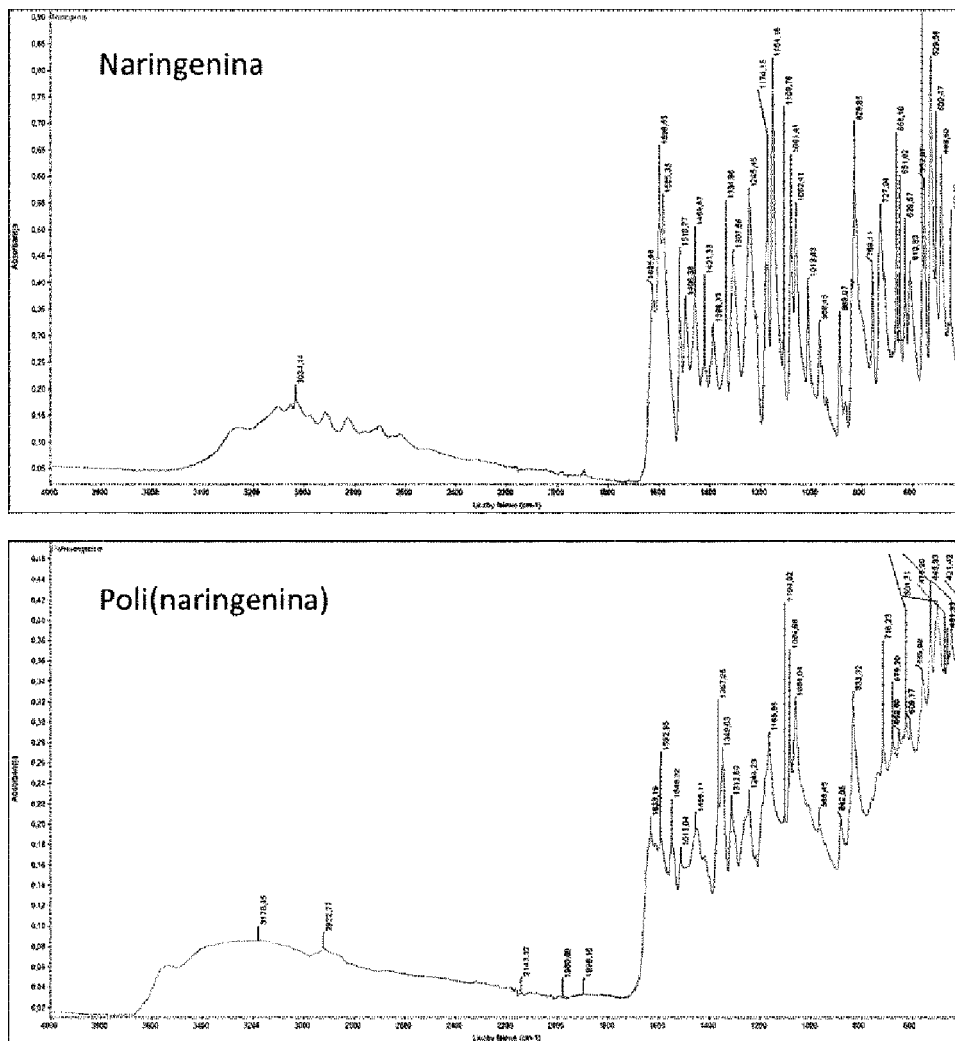


Fig. 1

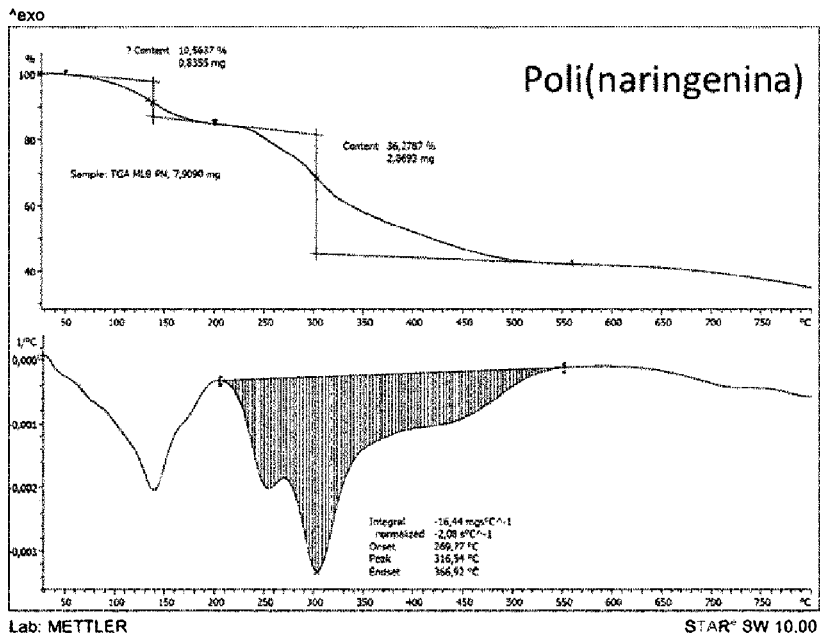
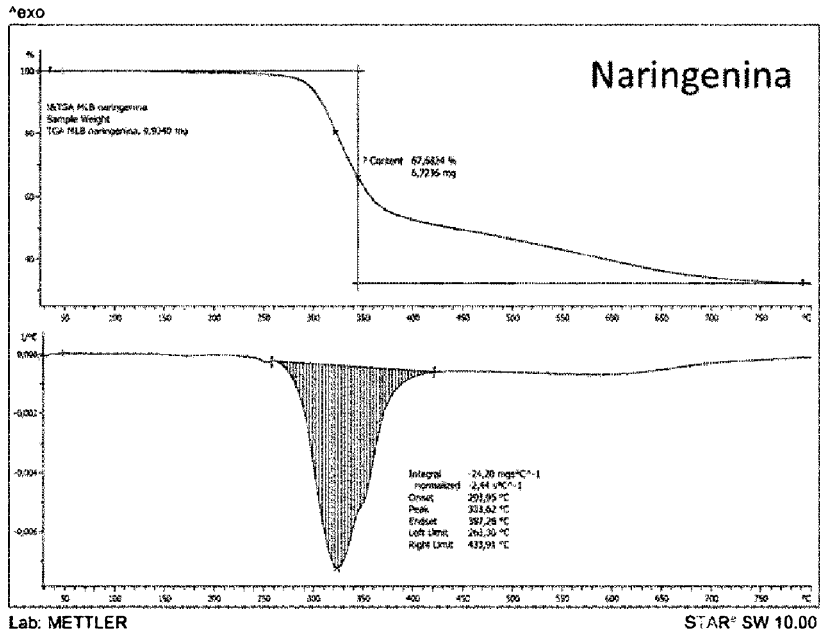


Fig. 2

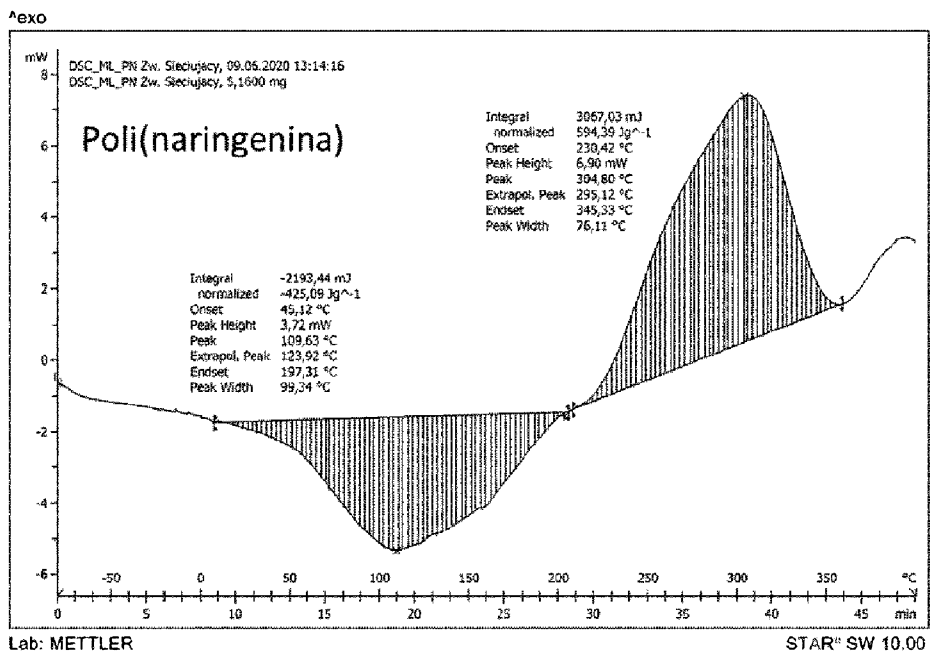
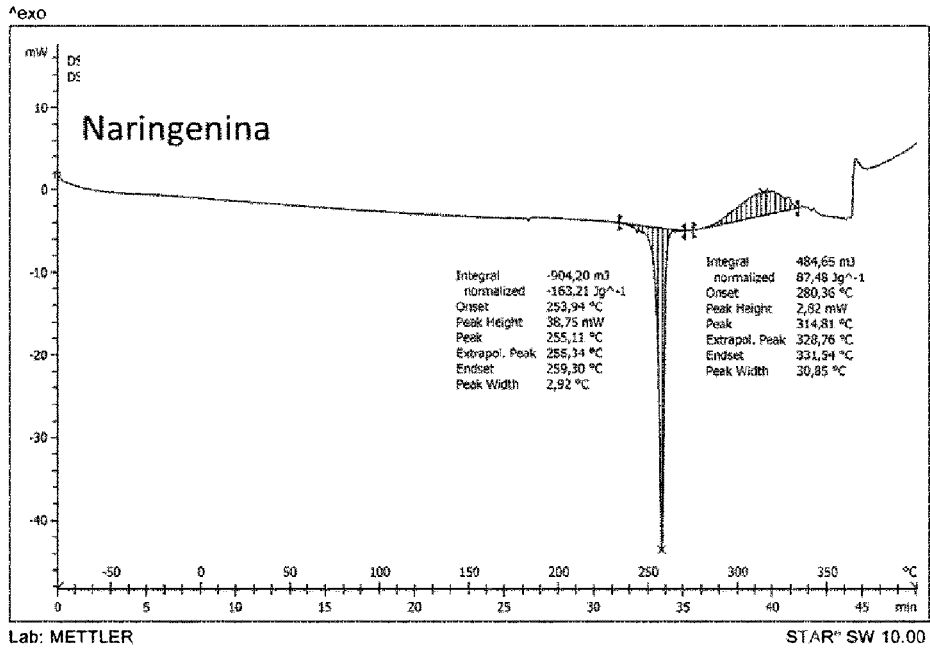


Fig. 3