



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2014 00598**

(22) Data de depozit: **06/08/2014**

(41) Data publicării cererii:  
**27/11/2015** BOPI nr. **11/2015**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL DE CHIMIE  
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI",  
ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ NR.41 A,  
IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:  
• **DARIE RALUCA NICOLETA, STR. HOTIN  
NR. 33, IAȘI, IS, RO;**  
• **LIPȘA RODICA, STR.NICOLINA 7, BL.A3,  
AP.5, IAȘI, IS, RO;**

• **NIȚĂ TUDORACHI, STR. DECEBAL  
NR. 14, BL. B3, SC. A, ET. 3, AP. 15, IAȘI,  
IS, RO;**  
• **STOLERU ELENA, STR. DR. SAVINI  
NR. 7, BL. R1, SC. B, ET. 3, AP. 13, IAȘI, IS,  
RO;**  
• **VASILE CORNELIA, STR. PANTELIMON  
NR. 29, BL. 308, SC. A, ET. 3, AP. 12, IAȘI,  
IS, RO;**  
• **SILVESTRU MUNTEANU BOGDĂNEL,  
STR. GRĂDINARI NR. 15, BL. B1-2, SC. A,  
ET. III, AP. 1, IAȘI, IS, RO**

(54) **PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE PENTRU OBTINEREA DE NOI  
BIONANOCOMPOZITE POLIMERICE BIOCOMPATIBILE, CU  
PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE ȘI ANTIOXIDANTE  
PENTRU UZ MEDICAL**

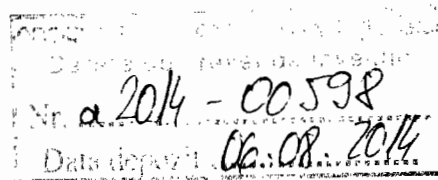
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un material bionanocompozit polimeric, cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante, pentru uz medical, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Materialul conform invenției cuprinde acid polilactic, ulei de soia epoxidat, colagen hidrolizat, vitamina E, agent de compatibilizare, nanoparticule de argint. Procedeu conform invenției constă în prelucrarea materiilor prime în topitură, la o temperatură de 175°C, timp de 10 min, urmată de o presare la o pre-

siune de 200 bar, din care rezultă un material sub formă de plăci omogene, cu o grosime de 1...4 +/- 0,05 mm, cu o alungire de 4,02...39,97 mm, având o rezistență la rupere de 14,88...30,76 MPa, activitate ridicată antimicrobiană și antioxidantă.

Revendicări: 2  
Figuri: 3





## **PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE PENTRU OBTINEREA DE NOI BIONANOCOMPOZITE POLIMERICE BIOCOMPATIBILE, CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE ȘI ANTIOXIDANTE PENTRU UZ MEDICAL**

**Invenția se referă la** compoziția unor noi materiale biocompatibile, cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante pentru aplicații în medicină, pe bază de amestecuri de polimeri, cum ar fi acid polilactic (PLA), un polimer natural – colagen, ulei de soia epoxidat, vitamina E și nanoparticule de argint și la un procedeu de obținere a acesteia.

Bionanocompozitele sunt materiale nanostructurate, de obicei hibride, care sunt formate prin combinarea polimerilor naturali cu solide anorganice, în care cel puțin una din dimensiuni este de ordinul nanometrilor. Similar cu nanocompozitele convenționale pe bază de polimeri sintetici, aceste materiale biohibride au proprietăți funcționale și structurale îmbunătățite: atât proprietățile inerente biopolimerilor (biocompatibilitate și biodegradabilitate, proprietăți de barieră la diferite gaze și agenți, etc.), dar și cele ale polimerilor sintetici (prelucrare convenabilă, reproductibilitatea proprietăților, posibilitatea de a fi prelucrați în forme cu geometrii complicate, etc.), de aceea prezintă un interes deosebit în diferite aplicații. Studiile de perspectivă pentru dezvoltarea acestor materiale hibride au indicat domenii specifice cu aplicații speciale, ca:

medicina regenerativă, nanocompozite pentru protecția mediului ambiant etc. Studiul bionanocompozitelor este privit ca un domeniu interdisciplinar interconectat cu subiecte de actualitate de deosebit interes, cum ar fi: procese de biomaterializare, materiale și sisteme biomimetice, iar dezvoltarea lor în viitor are șanse mari de reușită în variate aplicații datorită mării versatilități pe care o prezintă. Combinarea polimerilor bioresorbabili, biocompatibili și biodegradabili și a nanostructurilor deschide noi perspective în auto-asamblarea nanomaterialelor pentru aplicații biomedicale pentru biomateriale cu proprietăți mecanice, termice și electrice superioare.

Matricile polimerice moderne pentru bionanocompozite sunt clasificate astfel [Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S., Kenny J.M., *Polymer Degradation and Stability* 95: 2126-2146 (2010)]:

- materiale de proveniență naturală: polizaharide (amidon, alginat, chitina/chitosan și derivați) sau proteine (soia, colagen, geluri pe bază de fibrinogen, matase);
- polimeri sintetici: acid polilactic (PLA), acid poliglicolic (PGA), poli ( $\epsilon$ -caprolactonă) (PCL), poli(hidroxi-butilat) (PHB).

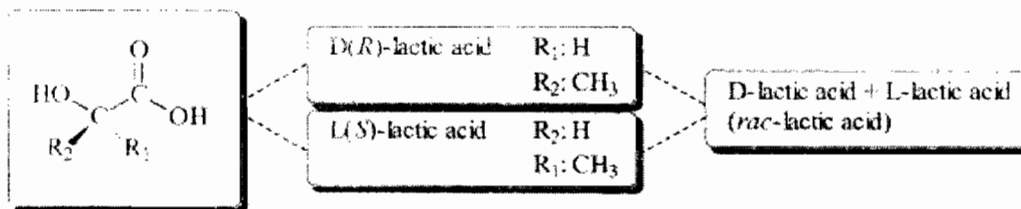
Aceste clase de materiale prezintă avantaje și dezavantaje. Polimerii sintetici prezintă rezistența mecanică bună, forma și gradul de degradare pot fi modificate ușor, însă suprafața lor este hidrofobă și nu au semnale de recunoaștere celulară. Polimerii de proveniență naturală au în principal avantajul recunoașterii celulare cu posibilitatea suportării adeziunii celulare, însă prezintă proprietăți mecanice inferioare. De asemenea, mulți din acești polimeri naturali au proprietăți dependente de proveniența lor, unele resurse sunt limitate și au un cost ridicat.

Cateterul este dispozitiv medical, de obicei sub formă de tuburi, care sunt inserate în corp cu scopul de a îndepărta un fluid, pentru a crea o deschidere sau pentru a elibera un medicament. Cateterul urinar este folosit pentru a drena vezica urinară și în îngrijirea bolilor cronice. Cateterul urinar interior (indwelling) (IUC) sunt dispozitive de unică folosință constând în cateter, tuburi și pungi de drenaj care sunt utilizate în proporție de ~ 15-25% pentru pacienții spitalizați. Infecțiile tractului urinar (UTI) sunt cele mai frecvente infecții nosocomiale care constituie aproximativ 40% din infecțiile contractate în spitale și 80% dintre acestea sunt asociate cu utilizarea cateterelor urinare. *Biocompatibilitatea* cateterelor, ca și a altor dispozitive medicale, este definită ca fiind abilitatea dezvoltării funcției programate, fără efecte secundare, nedorite. Complicațiile legate de utilizarea cateterelor urinare se referă la: lezarea uretrei la

introduceri și scoateri repetate, depunerea de săruri minerale, formarea cheagurilor de sânge, obturarea cateterului, colonizarea bacteriană și infecția [Park K.D., Kim Y.S., Han D.K., Kim Y.H., Lee E.H., Suh H., Choi K.S., *Biomaterials*, 19: 851–9 (1998), Schierholz J.M., Yucel N., Rump A.F., Beuth J., Pulverer G., *Int J Antimicrob Agents*, 19: 511–6 (2002), Keane P.F., Bonner M.C., Johnston S.R., Zafar A., Gorman S.P., Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo. *Br J Urol*, 73: 687–91 (1994).]

Aceste complicații apar de obicei la suprafața de contact între uretră și cateter. Aderarea bacteriilor, infecția, depunerile de săruri și tromboza reprezintă o cascadă inițiată de adsorpția extensivă de proteine care joacă un rol esențial în dezvoltarea coloniilor bacteriene și a infecției.

PLA este un poli(α-hidroxiacid) alifatic termoplastic, semicristalin sau amorf (în funcție de configurația optică a monomerului utilizat în sinteză, (L-acid lactic) (L-AL) sau D,L-acid lactic (D,L-AL) [Sodergard A., Stolt M., *Prog. Polym. Sci.*, 27: 1123-1163 (2002)], fiind o alternativă a polimerilor convenționali ca: polietilena (PE), polipropilena (PP), poli(etilentereftalat) (PET) și polistiren (PS). Izomerul levo al acidului lactic L(+)-AL este considerat “GRAS” (“generally recognized as safe”), netoxic pentru a fi utilizat ca aditiv în medicină și industria alimentară, conform US FDA, dar izomerul dextro al acidului lactic D(-)-AL este nociv pentru organismul uman, producând acidoza și decalcifierea oaselor.



PLA este un polimer cu rezistența la impact scăzută, care nu modifică semnificativ efectul de seră, deoarece CO<sub>2</sub> generat prin biodegradarea PLA este echivalent cu cantitatea de CO<sub>2</sub> consumată prin creșterea plantelor (materii prime în sinteza acidului lactic-AL) [Gruber P., Keynote P. Massachusetts Green Chemistry Symposium, Cosponsored by National Environmental Technology Institute, UMASS and MA Executive Office of Environmental Affairs Toxic Use Reduction Institute, Amherst, MA (2001)]. PLA are temperatura de tranziție sticloasă Tg =55-59°C și temperatura de topire Tm =174-184°C, prezintă o bună rezistență mecanică, modul elastic ridicat, termoplasticitate și o bună prelucrabilitate [Garlotta D., *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2),63-84 (2002).]. Puritatea optică (OP) este o caracteristică

fizică importantă a polimerilor AL: cu scăderea valorii OP, cristalizarea devine imposibilă, PLA devine amorf pentru  $OP = 0,78$ .

PLA este un poliester hidrofob, instabil în condiții umede, care se degradează în organism în produși de degradare netoxici: *acid lactic*, *dioxid de carbon* și *apa*, care sunt eliminați prin ciclul Krebs și prin urină. Din acest motiv a fost acceptat în USA de către Food and Drug Administration (FDA). Mecanismul prin care PLA se degradează depinde de mediul biologic în care este expus. În organismul mamiferelor PLA se degradează prin hidroliză, iar oligomerii care se formează sunt metabolizați de către celule și enzime. Inițial are loc scindarea catenelor macromoleculare cu reducerea masei moleculare, ulterior acidul lactic este eliminat parțial în urină [Tsuji H., Yasufumi T., Kazunobu Y., *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, 43(9): 1064-1075 (2005)]. S-a demonstrat că degradarea PLA se realizează inițial în faza amorfă, determinând creșterea cristalinității, după care au loc procese de metabolizare și în faza cristalină [Li S., Vert M., *Macromolecules*, 27: 3107-3110. (1994)].

Utilizarea PLA în aplicații biomedicale este posibilă și datorită *biocompatibilității* sale (nu produce efecte toxice sau cancerigene asupra țesuturilor). S-a studiat biocompatibilitatea unor polilactide cu diferite mase moleculare, utilizând celule epiteliale de șobolani, fibroblaste umane și celule osteosarcoma în diferite condiții; rezultatele au demonstrat o bună biocompatibilitate celulară [Sliedregt van A., Radder A. M., deGroot K., van Blitterswijk C. A., *J. Mater. Sci. Mater. Med* 3, 365-370 (1992)]. Stenturile din PLLA (SR-PLLA) au fost biocompatibile, cu reacții tisulare adverse minime în jurul stentului în partea anterioară a uretrei, în timp ce stenturile din oțel au provocat reacții inflamatorii puternice [Kemppainen E., Talja M., Riihela M., Pohjonen T., Tormala P., Alfthan O., *Urol. Res.*, 21(3): 235-238 (1993)].

Primul stent biodegradabil uretral din PLLA a fost realizat în 1993 de către Kemppainen, ulterior s-au folosit și alte materiale polimerice pentru stenturi în urologie [Kemppainen E., Talja M., Riihela M., Pohjonen T., Tormala P., Alfthan O., *Urol. Res.*, 21(3): 235-238 (1993)]. Acest stent prezintă caracteristici favorabile pentru aceste aplicații, comparativ cu stentul din oțel, iar reacțiile tisulare au fost minime timp de 6 luni. Testele clinice au demonstrat că stentul autoranforsat din PLLA (SR-PLLA) se degradează după o durată mai mică de 1 an [Kemppainen E., Talja M., Riihela M., Pohjonen T., Tormala P., Alfthan O., *Urol. Res.*, 21(3): 235-238 (1993)]. iar cel din copolimerul poli(L-lactic acid-co-D-lactic acid) în mai puțin de 6 luni. [Pletas A., Talja M., Tammela T., Taari K., Valimaa T., Tormala P., *J. Urol.*, 80: 439-443 (1997)]. M.

Multanen și colab. au studiat utilizarea azotatului de Ag în amestec cu copolimer  $\epsilon$ -caprolactona/L-lactidă, în stenturi urologice din PLLA. S-a constatat că acoperirea cu azotat de Ag a prevenit aderența bacteriilor la stenturile de PLLA, reducând infecțiile bacteriene. De asemenea, acoperirea cu azotat de Ag a redus cantitatea de bacterii în urină [Multanen M., Talja M., Hallanvuoto S., Siitonen A., Valimaa T., Tammela T. L. J., Seppala J., Tormala P., *Urol. Res.*, 28: 327-331 (2000).].

În prezent este de preferat utilizarea unor antioxidanți mai puțin periculoși cum ar fi cei naturali ca *vitamina E*, cu solubilitate excelentă în poliolefine și stabilă în condiții de prelucrare, care are și o moleculă mare, de aceea este puțin mobilă.

*Nanoparticulele de metale nobile* (aur, argint sau platina) – prezintă proprietăți fizice, chimice și biologice distincte de matrice, acestea fiind influențate de forma și dimensiunea lor. În particular proprietățile optice, electrochimice și electronice depind de dimensiunea nanoparticulelor metalice [Peto G., Molnar G.L., Paszti Z., Geszti O., Beck A., Guczi L., *Mater Sci Eng C* 19: 95- 99 (2002).].

În prezent patogenii sunt rezistenți la antibiotice. *Argintul (Ag)* este un agent antimicrobian cu capacitate unică de a ataca și a omorî microorganismele care provoacă infecții [Frogolo J. A. *Agion Technologies (Wakefield, MA). Medical Devices and Diagnostic industry (MD+DI)*, 32(8): (2010).]. Siguranța este primul aspect care trebuie luat în considerare, deoarece agentul antimicrobian este eliberat pe/și în corpul pacientului după o perioadă de timp. Agentul antimicrobian trebuie să fie efectiv pentru o serie mare de microorganisme și trebuie să fie durabil și procesabil în materialul din care este fabricat dispozitivul. Argintul ionic satisface aceste cerințe în diferite aplicații. Argintul - coloidal sau ionic în soluție este un produs antimicrobian, iar microbii nu pot forma rezistență la acesta, nefiind un antibiotic chimic ca penicilina [[http://www.naturalnews.com/010761\\_colloidal\\_silver\\_ionic.html#ixzz287rlyW1Y](http://www.naturalnews.com/010761_colloidal_silver_ionic.html#ixzz287rlyW1Y)].

Argintul prezintă proprietăți antibacteriene bune, iar în ultimii ani s-a utilizat în dispozitive medicale de la regenerarea țesuturilor până la catetere urinare [Saint S., Elmore J.G., Sullivan S.D., Emerson S.S., Koepsell T.D., *Am J Med* 105(3):236-41 (1998); Greenfeld J.L., Sampath L., Popilskis S.J., Brunner S.R., Stylianou S., Modak S., *Crit. Care. Med.* 23: 894-900 (1995)]. Activitatea antibacteriană a argintului depinde de cationul de argint care se leagă cu grupe electron-donoare de moleculele biologice ce conțin sulf, oxigen sau azot. Ioni de argint acționează prin înlocuirea altor ioni metalici precum calciu și zinc [Schierholz J.M., Lucas L.J.,



Rump A., Pulverer G., Efficacy of silver-coated medical devices. *J. Hosp. Infect.*, 40: 257-62 (1998)]. Tratatamentul cu flux de ioni se utilizează pentru acoperiri cu argint [Suzuki Y., Kusakabe M., Akiba H., Kusakabe K., Iwaki M., *Jpn. J. Artif. Organs*.19: 1092-5 (1990).]. S-a stabilit de asemenea că în cazul cateterelor urinare acoperite cu argint, acesta reduce formarea de biofilme și colonizarea prin eliberarea de ioni de argint în tractul urinar [CEP, Centre for Evidence-Based Purchasing *Evidence Review: Bardex IC Foley Catheter. CEP 0600 (2006) 1*. London: NHS Purchasing and Supply Agency. <http://www.nhs.uk/evidence-based-purchasing/>]. Cu toate acestea, utilizarea aliajului de argint pentru catetere urinare rămâne sporadică datorită lipsei unor dovezi substanțiale și costului ridicat [Beattle M., Can silver alloy catheters reduce infection rates? *Nursing times.net*, 23 July, 2011, <http://www.nursingtimes.net/home/clinical-zones/continence/can-silver-alloy-catheters-reduce-infection-rates/5032940.article>].

Uleiul de soia conține acid palmitic (10 %), acid oleic (25 %), acid linoleic (51 %) și acid linolenic (7 %). Grupările nesaturate din uleiul de soia pot fi utilizate pentru a introduce grupări funcționale nesaturate de tipul epoxizilor. Uleiul de soia epoxidat (USE) este utilizat ca plastifiant și stabilizator pentru a micșora viteza de descompunere a PVC.

Noua generație de nanocompozite biomedicale trebuie să fie hibride, biofuncționale, inteligente și să conțină un component activ. Matricea polimeră a compozitelor are avantajul versatilității, permițând controlul proprietăților finale.

Bionanocompozitele pot fi produse pe baza unor cerințe specifice, utilizând o varietate foarte mare de matrici polimerice, materiale de întărire și metode de prelucrare. Sunt încă necesare studii aprofundate pentru definirea unei concluzii asupra efectului incluziunilor nano în sistemele polimerice. Combinarea polimerilor biodegradabili și a nanostructurilor deschide noi perspective în obținerea unor nano-dispozitive pentru aplicații biomedicale cu proprietăți mecanice, termice, morfologice și electrice prestabilite. Proprietățile antimicrobiene pot fi imprimate atât prin procedee fizice cât și chimice. Dezvoltarea unei noi tehnologii care să utilizeze acoperiri antimicrobiene și modificarea suprafeței cu biomateriale prezintă o oportunitate financiară pentru industrie și mai important, oportunitate pentru scăderea impactului negativ asupra sănătății pentru prevenirea infecțiilor asociate cu costuri mari de tratament și de îngrijire a sănătății.

**Invenția de față rezolvă problema** lipsei flexibilității, biocompatibilității, a caracterului antimicrobian și antioxidant al PLA prin încorporarea unui plastifiant natural modificat, uleiul de

soia epoxidat, a unui polimer natural, colagenul hidrolizat și a unor substanțe cu caracter antioxidant ca vitamina E și ioni de argint, care imprimă tot odată proprietăți specifice materialelor obținute.

**Compoziția conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea că** vitamina E, colagenul hidrolizat, și nanoparticulele de argint sunt încorporate în masa de PLA la o temperatură convenabilă la care își mențin activitatea, nu difuzează rapid în mediul ambiant, menținându-se în dispozitivul de uz medical și prin încorporarea simultană în compoziție a ingredientelor menționate se asigură controlul proprietăților și îndeplinirea cerințelor pentru aplicații medicale ca proprietățile fizico-mecanice convenabile și ajustabile, prelucrabilitate în fluxurile tehnologice cunoscute fără modificări majore și se imprimă funcționalități speciale ca acțiunea antimicrobiană și antioxidantă.

**Scopul invenției de față este** dezvoltarea unei noi clase de materiale și unui procedeu de obținere, caracterizare și prelucrare a acestor materiale în dispozitive medicale de tipul cateterelor. De aceea s-au selectat materiale convenabile sau noi pentru studiu: un polimer comercial ca acidul polilactic care este modificat prin obținerea unor bionanocompozite pentru a imprima proprietățile dorite, mai ales flexibilitatea prin adăugarea unui ulei de soia special modificat cu grupe epoxi; biocompatibilitatea s-a îmbunătățit considerabil prin încorporarea polimerului biologic colagenul hidrolizat care este accesibil din surse naturale și ușor de preparat, proprietăți antimicrobiene imprimate prin încorporarea nanoparticulelor de arginit obținute printr-o tehnică originală care împiedică aglomerarea lor și distribuția uniformă în matricea de PLA și în sfârșit pentru obținerea caracterului oxidativ se propune vitamina E, un antioxidant natural multifuncțional care are de asemenea acțiune benefică pentru sănătatea pacienților. Materialele sunt destinate obținerii de catetere și alte dispozitive medicale.

Pentru obținerea bionanocompozitelor **descrie în invenția de față** s-au utilizat:

- Acid polilactic (PLA) transparent (denumire comercială: PLA 2002D) procurat sub formă de granule de la NatureWorks LLC, UK cu un indice de topire de 5-7 g/10 min (la 210°C/2.16 kg). Acest material este obținut din resurse regenerabile anuale și are un conținut de 4% din izomerul D (conținut de 96% de L-lactidă).

- Uleiul de soia a fost epoxidat cu acid peracetic și apă oxigenată în prezență de acid acetic glacial/toluen [F. Mustata, N. Tudorachi, D. Rosu, *Composites: Part B*, 42: 1803-1812 (2011)]. Acidul peracetic a fost obținut *in situ* din apa oxigenată și acid acetic glacial, în absență de



catalizatori. Uleiul de soia epoxidat (USE) a avut echivalentul epoxi 270 g/echivalent. Echivalentul epoxi a fost determinat utilizând o metodă din literatură [Cașcaval C. N., Mustata F., Rosu D., *Angew. Makromol. Chem.*, 209: 157-166 (1993)].

- Colagen hidrolizat obținut din tendon bovin are caracteristicile date în Tabelul 1.

- Vitamina E în forma (±)  $\alpha$ -Tocoferol sintetic cu masa moleculară de 430,71 g/mol, densitate de 0.95 g/mL la 20°C și o puritate > 96% (determinată prin HPLC) furnizată de Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania.

- AgNO<sub>3</sub> utilizat ca sare de argint, diclorometan (DCM, extra pur), N,N-dimetilformamida (DMF, 99%), metanol (extra pur), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) au fost cumparate de la Sigma-Aldrich. Apa utilizată a fost distilată ultrapura (Milli-Q).

- Pluronic F127 (Mw = 1.26x10<sup>4</sup> g/mol) a fost procurat de la BASF și a fost utilizat fără purificare ulterioară.

Prepararea nanoparticulelor de argint (NP) s-a efectuat prin reducere în dimetilformamidă (DMF). Incorporarea nanoparticulelor în polimerul PLA s-a realizat prin amestecarea simultană a amestecului DMF/AgNP cu soluția de PLA în diclorometan (DCM). Prin metoda evaporării solventului s-a obținut amestecul PLA/AgNP care ulterior a fost considerat ca masterbatch la prelucrarea materialelor supuse invenției în plastograful Brabender în scopul dispersării uniforme a particulelor de Ag. AgNO<sub>3</sub> a fost amestecat timp de 5 minute în DMF și în continuare amestecat cu soluția de 15 wt% PLA în DCM. În acest proces reducerea argintului de către DMF poate fi observată vizual prin schimbarea culorii soluției.

DMF și DCM au fost utilizați în raportul volumetric 3/7 (v/v). Concentrația de nitrat de argint a fost calculată astfel încât conținutul de argint final în sistem să fie 1.5 wt% în raport cu polimerul PLA.

**Procedul de obținere** a unor noi materiale cu flexibilitate îmbunătățită, biocompatibile cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene pe bază de amestecuri de materiale polimerice pentru dispozitive medicale, **conform invenției, constă în aceea că** prelucrarea în topitură s-a realizat prin utilizarea unui mixer Brabender echipat cu o cameră de amestecare de 30 cm<sup>3</sup> și cu doi rotorii contrarotativi. Amestecarea sistemelor în topitură a avut loc timp de 10 minute, la o temperatură de 175 °C și viteza rotorilor de 60 rotații/minut. Cantitatea de colagen utilizat în matricea PLA a fost de 15 % în procente masice, vitamina E fiind încorporată în procent de 5%.

Deoarece PLA se poate degrada prin hidroliza legăturii esterice, uscarea granulelor de PLA se realizează de obicei înainte de etapa de prelucrare. Astfel, înainte de amestecare, PLA a fost uscat timp de 24 ore la temperatura de 60°C, iar colagenul hidrolizat s-a uscat timp de 4 ore la 30°C într-o etuvă de vid.

După evacuarea materialelor din camera de amestecare, acestea au fost introduse în interiorul unei prese Carver 4594, încălzite la 175 °C, pre-topite timp de 3 minute și apoi presate sub formă de plăci timp de 3 minute, presiunea utilizată fiind de 200 bar. După presare, se răcește matrița și se obțin plăci cu grosimea de 1 mm ± 0,05 mm. După presare, materialul a fost inspectat pentru a observa dispersarea particulelor și ulterior pregătite pentru testele mecanice. O dispersie bună s-a observat în toate cazurile.

**Invenția prezintă avantajul că** se obțin bionanocompozite cu proprietăți speciale, pe bază de PLA, colagen, ulei de soia epoxidat, conținând sau nu vitamina E sau nanoparticule de Ag, ce se pot utiliza ca materiale pentru fabricarea unor dispozitive medicale.

În continuare se dau 5 **exemple de realizare a invenției**, cu referire și la datele prezentate în Tabelele 1-6 și Figurile 1-3 unde sunt redate comportarea mecanică, termică și reologică a materialelor obținute, gradul de inhibare a unor microorganisme ca de exemplu *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* și *Salmonella typhimurium*, precum și date privind caracterul antioxidant ale materialelor pe bază de PLA conținând uleiul de soia epoxidat ca plastifiant și/sau Pluronic ca agent de compatibilizare, un polimer natural – colagenul hidrolizat ca biocompatibilizator și/sau nanoparticule de Ag și/sau vitamina E ca agenți antimicrobieni și respectiv antioxidanți.

### **Metode de caracterizare**

*Proprietăți mecanice: Testarea la tracțiune* – caracteristicile evaluate la testele de tracțiune (modulul lui Young, rezistența la rupere, alungirea la rupere) au fost înregistrate conform standardului SR EN ISO 527-2/1996, utilizând un aparat Instron 3345, având viteza de testare de 10 mm/min, lungimea epruvetei fiind de 40 mm. Toate epruvetele au fost inițial condiționate la 23°C și 50% umiditate relativă. Au fost testate 5 epruvete și s-au luat în considerație valorile medii ale rezultatelor.

*Studiile de reologie* s-au realizat cu un Reometru Physica MCR 301 (Anton Paar) echipat cu un sistem de măsurare format din plăci paralele cu diametrul de 25 mm, la o distanță de 1 mm.

Experimentele s-au realizat la temperatură constantă ( $175 \pm 0,1$  °C). Testele de baleiaj al frecvenței s-au realizat pe domeniul de frecvență 0,01-1000 1/s, la o amplitudine determinată anterior de 5% (regiunea liniar viscoelastică).

#### Metode termice

- *Determinările DSC* au fost realizate cu ajutorul unui aparat NETZSCH DSC 200F3 (Netzsch - Germania). O cantitate constantă din fiecare proba (3,5 mg) a fost încălzită într-un creuzet închis de aluminiu și supusă unui program de încălzire între 20 °C și 200 °C, cu o viteză de încălzire și de răcire de 10 °C/min. Experimentele s-au realizat în atmosferă de azot, cu un flux de 50 ml/min.

- *Degradarea termică* a polimerilor a fost realizată utilizând un sistem de analiză termogravimetrică TG/DSC. model STA 449 F1 Jupiter (Netzsch - Germania). Probele a caror masă a variat între 7-10 mg au fost încălzite de la 25 °C la 600 °C, cu o viteză de încălzire de 10 °C/min sub purja de gaz inert ( $N_2$  puritate minimă de 99,999 %, 50 ml/min și 20 ml/min purja de protecție pentru microbalanță). Probele au fost încălzite în creuzet deschis de  $Al_2O_3$ , iar ca material de referință s-a utilizat un creuzet din același material. Temperatura și sensibilitatea echipamentului s-a calibrat pe domeniul de la -38,5 °C la 660 °C funcție de tranziția punctelor de topire a unor metale standard (fig, Ga, Sn, Zn, Al). Achiziționarea și prelucrarea datelor s-a făcut cu ajutorul unui soft Proteus<sup>®</sup>.

*Teste antimicrobiene* - pentru determinarea gradului de inhibare a unor microorganisme s-au utilizat metode bacteriologice procedurate conform standardelor în vigoare și anume:

- SR ISO 16649-2/2007 – Metoda orizontală pentru enumerarea bacteriilor din genul *Escherichia coli*  $\beta$  - glucuronidaza pozitivă. Tehnica numărării coloniilor la 44°C, utilizând mediul 5-bromo-4-cloro-3 Indolyl  $\beta$ -D-glucuronid;
- SR EN ISO 11290-1:2000/A1:2005 - Metoda orizontală pentru detectarea și numărarea *Listeria monocytogenes*. Partea 1: Metode de detecție;
- SR EN ISO 6579/2003/AC/2004/AC/2006, 2007- Metoda orizontală pentru detectarea bacteriilor din genul *Salmonella spp.*

*Activitatea antioxidantă:* Activitatea de captare a radicalilor procentuală (RSA%) pentru fiecare probă a fost evaluată prin testul cu DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). Evaluarea activității antioxidante a fost efectuată pentru fiecare material supus invenției prin evaluarea captării radicalilor liberi DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) în soluție de metanol. Amestecul de reacție a constat în adăugarea a 3 ml supernatant, 6 ml de metanol absolut și 1 ml soluție de radicali

DPPH 0,5mM în metanol. DPPH este redus când reacționează cu un compus antioxidant care poate dona un hidrogen. Modificarea culorii (din violet în galben pal) (absorbanța) a fost citită la 511 nm după 60 minute de reacție, cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis (Cary 60-UV-Vis Spectrophotometer, USA). Soluția de control a fost preparată prin amestecarea a 9ml metanol cu 1 ml soluție de radicali DPPI.

### Exemplul 1

Într-un pahar Berzelius se amestecă 26,01 g acid polilactic și 3,802 g ulei de soia epoxidat. Amestecul solid preformat se introduce în camera de amestecare având un volum de 30 cm<sup>3</sup> a unui mixer Brabender, echipat cu doi rotoți contrarotativi și încălzit la 175 °C. Se amestecă în topitură amestecul preformat timp de 10 minute, la o temperatură de 175 °C și o viteză a rotorilor de 60 rotații/minut. Amestecul omogen obținut se evacuează în stare topită din camera de amestecare și se introduce între două plăci de metal acoperite cu pânză de teflon într-o presă Carver 4394, încălzită la 175 °C. După o pretopire de 3 minute, materialul se presează la 200 bar timp de alte 2 minute, la finalul cărora se răcește matrița și se obține o placă omogenă, semitransparentă, cu grosimea de  $1 \pm 0,05$  mm, având rezistența la rupere de 30,76 MPa și o valoare a modulului Young de 2708,33 Mpa, temperaturi de topire și de cristalizare, cristalizare la „rece” mai ridicate decât ale polimerului matrice PLA. Alungirea la rupere are o valoare de 39,97 mm, de ~ **2327 % mai mare** decât referința PLA, temperatura de tranziție sticloasă mai ridicată, stabilitatea termică este îmbunătățită, dar nu posedă caracter antimicrobian, iar cel antioxidant este de numai 0,98%.

### Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul 1, dar folosind un amestec cu următoarea compoziție: 24,48 g acid polilactic și 3,802 g ulei de soia epoxidat. Se adaugă în plus la amestecare 1,211 g vitamina E. Se obține o placă uniformă semitransparentă - ușor gălbuie cu o rezistența la rupere de 24,87 MPa și o valoare a modulului Young de 2414,32 MPa. Materialul astfel obținut are o alungirea la rupere de 29,25 mm de **1710,5 % mai mare**, temperatura de tranziție sticloasă mai ridicată, comparativ cu referința, temperaturi de topire și de cristalizare, cristalizare la „rece” mai ridicate decât ale polimerului matrice PLA. Sistemul prezintă stabilitate termică satisfacătoare, iar activitatea antioxidantă este de 5,88%.

### Exemplul 3

Se procedează ca în exemplul 1, dar folosind un amestec cu următoarea compoziție: 19,89 g acid polilactic, 3,802 g ulei de soia epoxidat și 1,211 g vitamina E. Se mai adaugă în plus la amestecare 1,148 g colagen hidrolizat. Se obține o placă uniformă, semitransparentă - ușor gălbuie, cu o rezistență la rupere de 17,93 MPa, modulul Young de 2336,39 MPa și o valoare a alungirii la rupere de 4,02 mm. cu **235,1 % mai mare** comparativ cu referința. Sistemul nu prezintă activitate antimicrobiană, temperaturi de topire și de cristalizare, cristalizare la „rece” mai ridicate decât ale polimerului matrice PLA, prezintă stabilitate termică satisfăcătoare, iar activitatea antioxidantă este de **100%**

### Exemplul 4

Se procedează ca în exemplul 1, dar folosind un amestec cu următoarea compoziție: 18,36 g acid polilactic, 3,802 g ulei de soia epoxidat, 1,211 g vitamina E și 1,1475 g colagen hidrolizat. Se mai adaugă în plus la amestecare 0,6375 g Pluronic F127. Se obține o placă uniformă semitransparentă - ușor maronie cu o valoare a rezistenței la rupere de 21,65 MPa și modulul Young de 2243,75 MPa. Comparativ cu referința, materialul astfel obținut are o alungirea la rupere de 23,04 mm, de **1347,4 % mai mare și prezintă o inhibare de 100%** față de *E. Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, după o expunere de 48 ore, iar **activitatea antioxidantă este de 100%**. Sistemul prezintă stabilitate termică satisfăcătoare temperaturi de topire și de cristalizare, cristalizare la „rece” mai ridicate decât ale polimerului matrice PLA.

### Exemplul 5

Se procedează ca în exemplul 1, se menține raportul dintre componenți ca în exemplul 4, la care se adaugă nanoparticule de argint. Astfel, se folosește un amestec cu următoarea compoziție: 17,901 g acid polilactic, 3,802 g ulei de soia epoxidat, 1,211 g vitamina E și 1,1475 g colagen hidrolizat și 0,6375 g Pluronic F127. Se mai adaugă în plus la amestecare 0,38 g Ag. Placa uniformă opacă de culoare maro obținută prezintă o rezistență la rupere de 14,88 MPa și modulul Young de 1929,06 MPa. Alungirea materialului obținut prin adăugarea Ag a scăzut la o valoare de 8 mm, comparativ cu exemplul 5, însă această caracteristică este de **467,8 % mai mare** față de valoarea alungirii la rupere a referinței. Acest material prezintă o **inhibare de**

100% față de *E. Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, după o expunere de 48 ore, **activitatea antioxidantă este 100%**, iar sistemul prezintă stabilitate termică satisfăcătoare. temperaturi de topire și de cristalizare, cristalizare la „rece” mai ridicate decât ale polimerului matrice PLA.

Din rezultatele obținute la testarea reologică în modul dinamic a materialelor supuse invenției se observă efectul prezenței componentilor asupra comportării la curgerea în topitură a matricei (referinței) PLA. Prezența uleiului de soia epoxidat a condus la îmbunătățirea curgerii materialelor, această comportare fiind intensificată la adăugarea Vitaminei E. O creștere a valorilor modulilor de stocare ( $G'$ ) și de pierdere ( $G''$ ) a fost remarcată la creșterea frecvenței de oscilație, deoarece la frecvențe mici este destul timp pentru dezlegarea lanțurilor, acestea relaxându-se încet. Când lanțurile polimerice au fost deformate la frecvențe mari, catenele înlanțuite nu au timp suficient pentru a se reorienta, conducând la creșterea modulilor. În Figura 2 sunt prezentate evoluțiile modulilor  $G'$  și  $G''$  și a viscozității complexe, observându-se apariția unui „umăr” în cazul materialelor supuse invenției, aceasta variație a caracteristicilor reologice fiind datorată inducerii unei elasticități suplimentare în material odată cu încorporarea uleiului de soia epoxidat și a celorlalți componenți, această modificare fiind mai evidentă în cazul Exemplului 2 (PLA/USE/VE). Scăderea viscozității dinamice în prezența colagenului poate fi atribuită scăderii rigidității acidului polilactic odată cu încorporarea unor aditivi mai amorfi.

În Tabelul 3 sunt prezentate rezultatele analizei DSC efectuate pentru referința PLA și materialele supuse invenției. Se constată că valoarea  $T_g$  a unor materiale, cât și a PLA plastifiat este ușor mai crescută comparativ cu a referinței (în cazul celui de-al doilea ciclu de încălzire); deci prin introducerea compusului natural (colagen hidrolizat) și a celorlalți aditivi (Pluronic, ulei de soia epoxidat, vitamina E) scade volumul liber, distrugându-se domenii din zona amorfă a PLA. Valorile temperaturilor de topire ( $T_m$ ) ale compozitelor sunt de asemenea ușor mai crescute comparativ cu ale referinței PLA, sugerând de asemenea dispariția zonelor amorfe și a cristalitelor imperfecte în cazul compozitelor și a PLA plastifiat. Temperatura de cristalizare la rece  $T_{cc}$  are valori ușor mai crescute în cazul compozitelor și a PLA plastifiat. Acest rezultat este în concordanță cu valorile obținute pentru  $T_m$ , sugerând o perfectare a cristalitelor și o scădere a zonelor amorfe în cazul compozitelor PLA/colagen, obținute în topitură. Rezultatele sunt în

concordanță cu datele din literatură.[ Yang X., Yuan M., Li W., Zhang G., *Journal of Applied Polymer Science*, 94: 1670-1675 (2004)].

Rezultatele înregistrate la *degradarea termică* a referinței și a materialelor obținute în cadrul invenției sunt prezentate parțial în Tabelul 4. S-a constatat că stabilitatea termică nu se modifică semnificativ comparativ cu referința PLA.

Din rezultatele înregistrate pentru *evaluarea activității antioxidante* și prezentate în Tabelul 6 se constată o inhibare de 100% a radicalilor liberi pentru Exemplele 2, 3, 4 și 5, această comportare fiind explicată de prezența vitaminei E în materialele menționate, care are rol de agent antioxidant. Exemplul 1, care nu prezintă Vitamina E în compoziție, inhibă doar un procent de 5.88 % din radicalii liberi.

## PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE PENTRU OBTINEREA DE NOI BIONANOCOMPOZITE POLIMERICE BIOCOMPATIBILE, CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE ȘI ANTIOXIDANTE PENTRU UZ MEDICAL

### REVEDICĂRI

1. Material bionanocompozit polimeric biocompatibil, cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante pentru uz medical **caracterizat prin aceea că** este constituit din 58,5...85% acid polilactic, 15% ulei de soia epoxidat, 15% un polimer natural – collagen hidrolizat, 5% vitamina E, 5% Pluronic F127 și 1,5% nanoparticule de argint.

2. Procedeu de obținere a materialului definit la revendicarea 1 **caracterizat prin aceea că** materiile prime se prelucrează în topitură la o temperatură de 175 °C într-un dispozitiv echipat cu o cameră de amestecare de 30 cm<sup>3</sup> și cu doi rotori contrarotativi având o viteză de 60 rotații/minut, timp de 10 minute, urmată de presare la 175 °C, la o presiune de 200 bar, din care rezultă un material sub formă de plăci omogene cu o grosime de 1...4 ± 0,05 mm, având flexibilitate marită, cu o alungire de 4,02... 39,97 mm, un modul de elasticitate de 1929,06... 2708,33 MPa, rezistența la rupere de 14,88... 30,76 Mpa, , temperatura de tranziție sticloasă mai mare decât a PLA, temperaturi de topire și de cristalizare cristalizare la „rece” mai ridicate decât ale polimerului matrice PLA, stabilitate termică satisfăcătoare, gradul de inhibare după 48 ore de acțiune a unor microorganisme ca *Listeria monocytogenes* de 100%, *Escherichia coli* de 100% și *Salmonella typhimurium* de 100% și prezintă 100% activitate antioxidantă.



06-08-2014

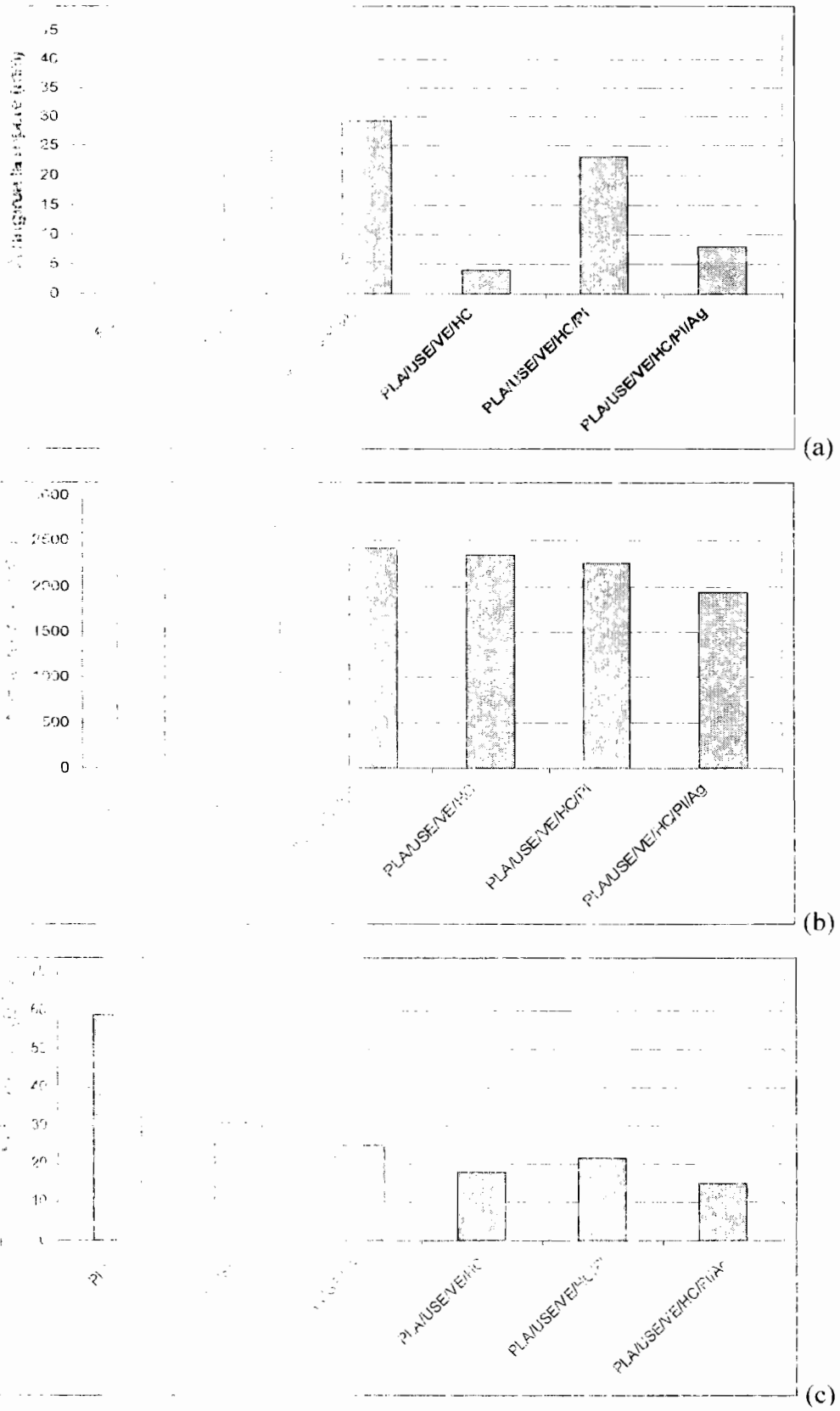


Figura 1. Valorile (a) rezistenței la rupere, (b) modulului lui Young și (c) rezistenței la rupere pentru referința PLA și materialele modificate (b) obținute prin prelucrare în plastograful Brabender

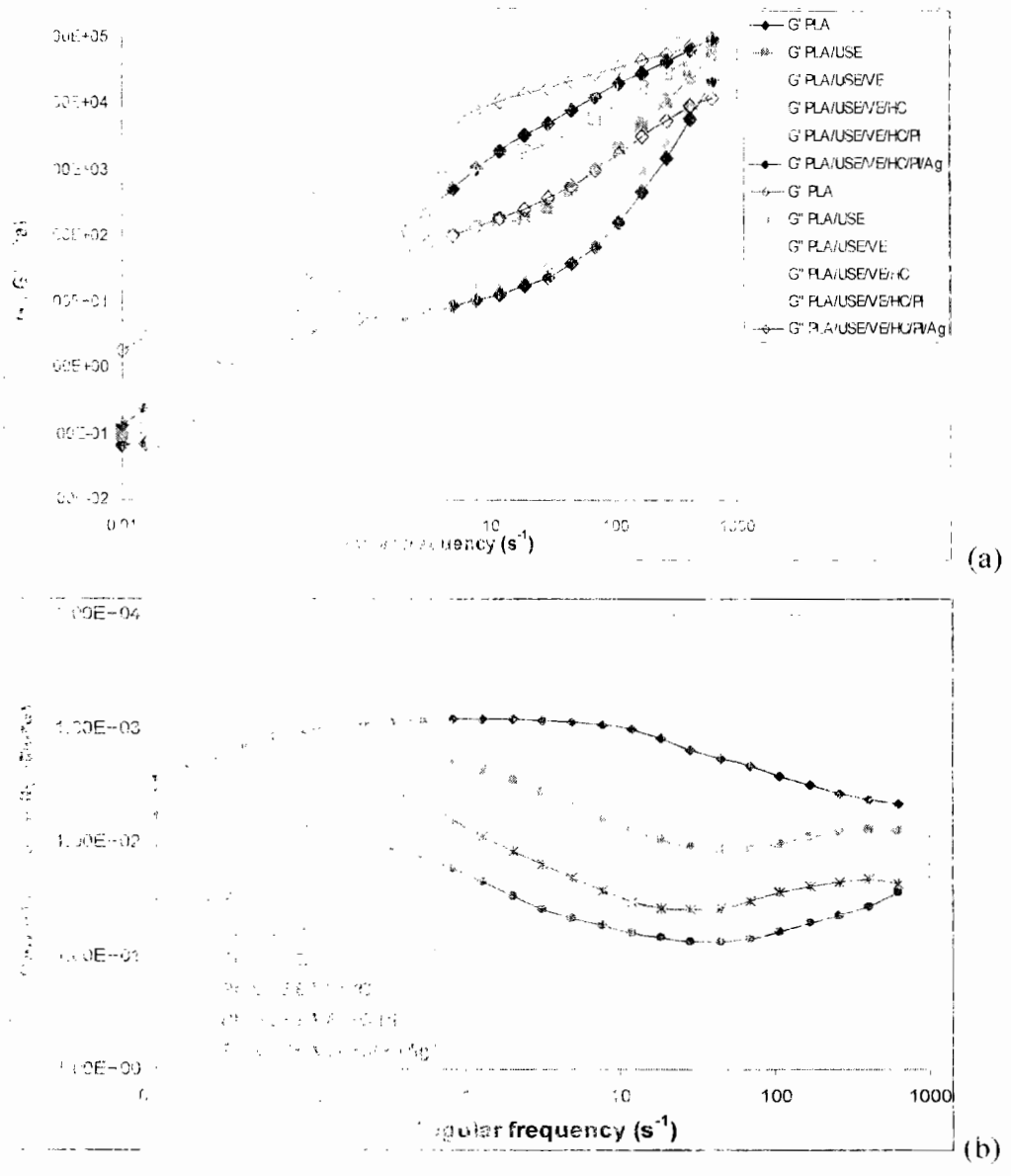


Figura 2. Vârstația (a) a modulului de elasticitate ( $G'$ ) și a modulului de pierdere ( $G''$ ) și (b) viscozității compozițiilor de PLA cu diferite concentrații de aditivi în funcție de frecvența unghiulară de oscilație la 175 °C

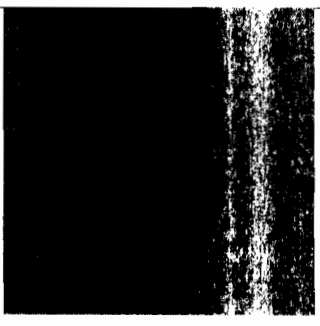
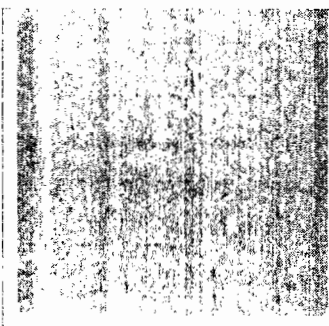
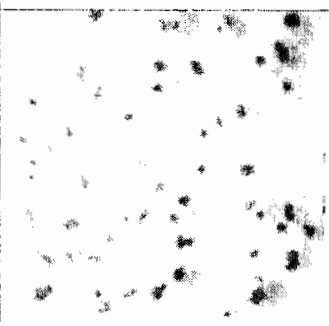
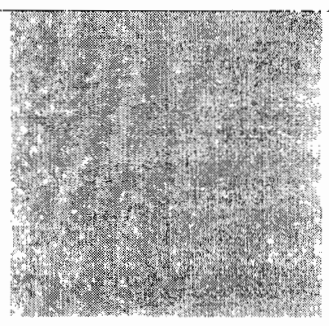

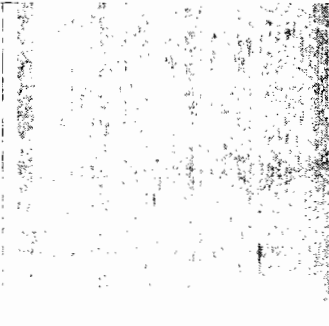
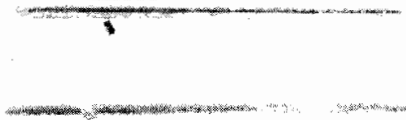
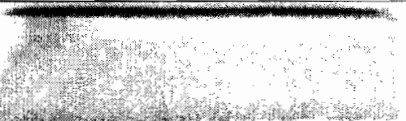
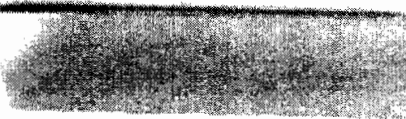
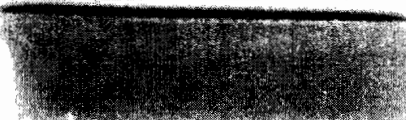


Inhibare <i>Salmonella typhimurium</i>		Inhibare <i>Escherichia coli</i>	
			
Referința (PLA)	Exemplele 4 și 5	Referința (PLA)	Exemplele 4 și 5
Inhibare <i>Listeria monocytogenes</i>			
			
Referința (PLA)	Exemplele 4 și 5		

Fig. 1. Inhibarea bacteriană a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* și *Salmonella typhimurium* în condiții de referință PLA, după o expunere de 48 ore

Tabel 1. Caracteristicile analitice ale colagenul extras din tendon bovin

<b>Analiza</b>	<b>Procedeeul enzimatic</b>
Azot total (g/100g)	14,14
Proteine totale (g/100g)	84,36
Hidroxirolina (g/100g)	8,98
Colagen (g/100g)	81,00
Zaharuri neuter (g/100g)	2,50
Hexozamine (g/100g)	12,50
Greutatea moleculara medie (Da)	301,000

Tabel 2. Descrierea, denumirea și aspectul materialelor (Exemplilor 1-5) obținute prin prelucrarea în plastograful Brabender

Denumirea probei	Descriere	Aspect probe
Referința	Acidul polilactic (PLA)	
Exemplul 1	Acidul polilactic și 15 % ulei de soia epoxidat (PLA/USE)	
Exemplul 2	Acidul polilactic, 15 % ulei de soia epoxidat și 5% vitamina E (PLA/USE/VE)	
Exemplul 3	Acidul polilactic, 15 % ulei de soia epoxidat, 5% vitamina E și 15 % colagen hidrolizat (PLA/USE/VE/HC)	
Exemplul 4	Acidul polilactic, 15 % ulei de soia epoxidat, 5% vitamina E, 15 % colagen hidrolizat și 5% Pluronic (PLA/USE/VE/HC/PI)	
Exemplul 5	Acidul polilactic, 15 % ulei de soia epoxidat, 5% vitamina E, 15 % colagen hidrolizat, 5% Pluronic și PLA-Ag (PLA/USE/VE/HC/PI/Ag)	

Tabel 3. Rezultatele DSC din al doilea ciclu de incalzire pentru unele materiale supuse invenției

<b>Proba</b>	<b>Tg (°C)</b>	<b>Tcc (°C)</b>	<b>ΔHcc (J/g)</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>ΔHm (J/g)</b>
PLA	52,84	116,22	-3,86	143,95	5,33
Exemplul 1	59,09	128,00	-7,33	155,60	6,61
Exemplul 3	55,08	123,49	-20,43	151,67	16,50
Exemplul 5	52,86	120,95	-27,93	151,33 155,76	21,07

Tg – temperatura de tranziție sticloasa; Tcc - temperatura de cristalizare la rece; ΔHcc - entalpia corespunzătoare procesului de cristalizare la rece; Tm – temperatura de topire; ΔHm - entalpia corespunzătoare procesului de topire

Tabel 4. Rezultatele descompunerii termogravimetrice (TG/DTG) pentru unele materiale supuse invenției

<b>Material</b>	<b>T<sub>onset</sub></b> <b>°C</b>	<b>W<sub>rez</sub></b> <b>%</b>	<b>T<sub>10</sub></b> <b>°C</b>	<b>T<sub>50</sub></b> <b>°C</b>
Referința (PLA)	321	1.08	325	346
Exemplul 1	329	1.86	326	346
Exemplul 2	311	1.33	310	340
Exemplul 3	320	1.83	324	339
Exemplul 4	307	3.25	311	325
Exemplul 5	308	3.40	314	327

T<sub>onset</sub> - temperatura corespunzătoare începerii degradării termice; W<sub>rez</sub>- procent pierderi reziduale;  
T<sub>10</sub> - temperatura corespunzătoare pierderii de 10% ; T<sub>50</sub> - temperatura corespunzătoare pierderii de 50%

Tabel 5. Rezultatele testării proprietăților antimicrobiene pentru unele materiale supuse invenției

<b>Material</b>	<b>Inhibare 24h (%)</b>	<b>Inhibare 48h (%)</b>
<b><i>E. Coli</i> (ATCC 25922)</b>		
Exemplul 4	89	100
Exemplul 5	91	100
<b><i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)</b>		
Exemplul 4	87	100
Exemplul 5	93	100
<b><i>Salmonella typhymurium</i> (ATCC 14028)</b>		
Exemplul 4	82	100
Exemplul 5	88	100



Tabel 6. Rezultatele activității antioxidante pentru referința și materialele supuse invenției

<b>Material</b>	<b>Absorbanta (la 511 nm)</b>	<b>RSA [%] 30 min</b>
Control DPPH	0,102	
PLA	0,101	0,98
Exemplul 1	0,096	5,88
Exemplul 2	0	100,00
Exemplul 3	0	100,00
Exemplul 4	0	100,00
Exemplul 5	0	100,00