



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00876**

(22) Data de depozit: **22/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/10/2021** BOPI nr. **10/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(73) Titular:
• **ICPE BISTRIȚA S.A., STR. PARCULUI
NR. 7, BISTRIȚA, BN, RO**

(72) Inventatori:
• **RÂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3,
BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PREDĂ PETRUȚA, BD. 1 DECEMBRIE
NR. 52, BL. A2, SC. E, AP. 13, OLTEȚIȚA,
CL, RO;**
• **GROSU ELENA, STR. ALMAȘU MARE
NR. 13, BL. 57, SC. 2, ET. 2, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **LUNGU MARIA,
STR. GHEORGHE MOCEANU NR. 2-4,
ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **COROIU VIORICA,
STR. DEALUL ȚUGULEA NR.46-50, BL.12,
SC.B, AP.50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **VASILE CORNELIA, STR. PANTELIMON
NR.29, BL.308, SC.A, ET.3, AP.12, IAȘI, IS,
RO;**
• **DARIE-NIȚĂ RALUCA NICOLETA,
STR. VASILE LUPU NR. 112, BL. C2, SC. B,
ET. 3, AP. 3, IAȘI, IS, RO;**
• **DUMITRIU RALUCA PETRONELA,
STR.PROF. PAUL NR.11, BL.39/I, SC.B,
AP.2, IAȘI, IS, RO;**
• **CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BLEOTU CORALIA,
ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5,
SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 7597903 B2; D. A. WAHL, J. T.
CZERNUSZKA,
"COLLAGEN-HYDROXYAPATITE
COMPOSITES FOR HARD TISSUE
REPAIR", EUROPEAN CELLS AND
MATERIALS, VOL. 11, PP. 43-56, 2006**

(54) **COMPOZITE POLIMERICE PENTRU OBTINEREA UNUI TUB
DE DRENARE URINAR CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE,
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA**



Invenția se referă la compozite polimerice cu proprietăți antimicrobiene și la un procedeu pentru obținerea tubului de drenare urinar, de uz medical, din acestea.

Se cunosc drenuri urinare care sunt frecvent colonizate de bacterii uropatogenice care duc la formarea biofilmelor, asociate cu inițierea unui proces infecțios al țesuturilor înconjurătoare, situație care impune îndepărtarea dispozitivului medical (**Burton E., Gawande P. V., Yakandawala N., LoVetri K., Zhanel GG., Romeo T., Friesen AD., Madhyastha S. 2006. Antibiofilm Activity of GlmU Enzyme Inhibitors against Catheter-Associated Uropathogens. Antimicrobial agents and chemotherapy. 50: 1835-1840**). S-a estimat că riscul de a dobândi o infecție crește cu 5% în fiecare zi pentru un dren medical *in situ* (**Saint S., Wiese J., Amory JK., Bernstein ML., Patel UD., Zemencuk JK., Bernstein SJ., Lipsky BA., Fio fer TP. 2000. Are physicians aware of which of their patients have indwelling urinary catheters? Am J Med. 109: 476-480; Flumphreys H., Newcombe RG., Enstone J., Smyth ET., McIlvenny G., Fitzpatrick F., Fry C, Spencer RC., Hospital Infection Society Steering Group. 2008. Four country healthcare associated infection prevalence survey 2006: risk factor analysis. J Hosp Infect. 69: 249-257**), iar posibilitatea ca un pacient să dezvolte o infecție asociată cateterizării este de 35...39% (**Maki D.G., Tambyah PA. 2001. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. Emerg Infect Dis Mar. 7: 342-347**). Infecțiile tractului urinar asociate utilizării drenurilor medicale sunt dificil de tratat deoarece microorganismele incluse în matricea biofilmului sunt de zeci, sute și chiar până la o mie de ori mai rezistente la antibiotice decât omologii lor planctonici (**Ceri H., Olson M., Stremick C., Read RR., Morck D., Buret A. 1999. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. 37: 1771-1776; Kaali P., Stromberg E., Karlsson S. 2011. Prevention of Biofilm associated Infections and Degradation of Polymeric Materials used in Biomedical Applications. Pub. In Tech - Biomedical Engineering, Trends in Materials Science, Edited by Mr Anthony Laskovski, Cap. 22, pg. 513-540**).

Se cunosc numeroase strategii cu privire la managementul infecțiilor asociate prezenței unui corp străin prin terapie cu antibiotice sau combinarea terapiei medicamentoase cu îndepărtarea chirurgicală a dispozitivului medical implantat și înlocuirea acestuia, dar acestea sunt aplicabile doar în cazul în care țesutul din locul de inserare al dispozitivului este în stare bună iar patogenul implicat în infecție nu face parte din microorganismele rezistente la terapie (**Trampuz A., Andreas F. W. 2006, Infections associated with orthopedic implants. Current Opinion in Infectious Diseases. 19: 349-356**). Îndepărtarea dispozitivelor medicale implantabile, indiferent de tipul acestora, este recomandată în situația instalării unei septicemii severe, a flebitei septice sau a șocului septic. De exemplu, la pacienții cateterizați care prezintă bacteriemie persistentă, pe o perioadă de 48...72 h, drenul trebuie îndepărtat (**von Eiff C, Jansen B., Kohnen W., Becker K. 2005. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. Drugs. 65: 179-214**). Terapia cu antibiotice profilactice este o procedură postoperatorie, curent utilizată în chirurgie, pentru a preveni colonizarea microbiană pe dispozitivul medical implantat. Cu toate acestea, au fost relatate cazuri în care pacienții au dezvoltat complicații infecțioase chiar și sub tratament cu antibiotice (**McCann M. T., Gilmore B. F., Gorman S. P. 2008. Staphylococcus epidermidis device-related infections: pathogenesis and clinical management. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 60: 1551-1571**). Oricum, cantitatea de medicament administrat poate fi insuficientă pentru a realiza un efect antimicrobian prelungit. Toate aceste măsuri de reducere a infecțiilor asociate utilizării drenurilor

urinare duc la creșterea morbidității și mortalității, precum și la prelungirea perioadei de	1
spitalizare a pacientului (Holroyd-Leduc J. M., Sen S., Bertenthal D., Sands L. P., Palmer	3
R. M., Kresevic D. M., Covinsky K. E., Seth Landefeld C. 2007. The relationship of	5
indwelling urinary catheters to death, length of hospital stay, funcțional decline, and	7
nursing home admission in hospitalized older medical patients. J. Am Geriatr Soc, 55:	9
227-233; Guidelines for the Prevention of Catheter associated Urinary Tract Infection.	11
Published on behalf of SARI by HSE Health Protection Surveillance Centre. 2011).	13
O metodă pentru reducerea acestor inconveniente constă în încorporarea directă a	15
unui agent antimicrobian într-o matrice polimerică. Astfel a apărut necesitatea dezvoltării	17
unor dispozitive medicale antimicrobiene care să inhibe aderența microbiană și implicit	19
dezvoltarea biofilmelor. Cu toate eforturile făcute este foarte dificil de obținut un material	21
complet antiaderent, deoarece <i>in vivo</i> orice tip de material este acoperit de un "film	23
condiționant" (Arciola C. R., Campoccia D., Gamberini S., Baldassarri L., Montanaro L.	25
2005. Prevalence of <i>cna</i>, <i>fnbA</i> and <i>fnbB</i> adhesin genes among <i>Staphylococcus aureus</i>	27
isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. FEMS	29
Microbiol Lett. 246: 81-86). În plus, materialele polimerice noi trebuie să fie biocompatibile,	31
să prezinte proprietăți fizico-mecanice adecvate și să fie sterile.	33
Au fost realizate numeroase studii dedicate proiectării de materiale antimicrobiene	35
(capabile de a preveni contaminarea de suprafață și/sau eradicarea biofilmelor microbiene)	37
prin diferite metode (nanotehnologie, acoperiri sau modificări de suprafețe).	39
De asemenea, se cunosc compozite pe bază de compuși antimicrobieni anorganici	41
(de exemplu: dioxid de titan, cupru, aur, galie, argint) și peptide antimicrobiene (de exemplu,	43
nisin, mersacidin, colicin, cecropin A etc.) (Ribeiro AMC, Barbassa L., Dias de Melo L.	45
2011. Antimicrobial Biomimetics. InTech Europe. 227-284).	47
Dintre agenții antimicrobieni studiați, argintul este cunoscut ca un metal cu un spectru	1
antimicrobian larg față de tulpini Gram pozitive, Gram negative, microfungi, protozoare și	3
virusuri, fiind utilizat de secole la tratarea arsurilor și rănilor cronice. Diferențele dintre	5
speciile bacteriene pot influența comportamentul față de agenții antimicrobieni. Peretele	7
celular al bacteriilor Gram pozitive conține de 3 până la 20 ori mai mult peptidoglican, în	9
comparație cu bacteriile Gram negative. În consecință, bacteriile Gram pozitive sunt, în	11
general, mai puțin sensibile la acțiunea ionilor de argint decât speciile Gram negative	13
(Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M., Uchida M. 2000. Antibacterial effect of silver-	15
zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. Dent Mater. 16: 452-5).	17
Nanoparticule de argint (AgNPs) sunt particule insolubile de dimensiuni mai mici de 100 nm	19
care pot fi obținute prin reducerea AgNO ₃ cu citrat (Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier	21
J. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal	23
gold. Discuss Faraday Soc. 11: 55-75). Recent s-au obținut bionanoparticule de argint prin	25
adăugarea în soluția apoasă de AgNO ₃ a unor extracte din plante. Biomoleculele din plante	27
induc reducerea ionilor de argint din AgNO ₃ la AgNPs (Sahayaraj K., Rajesh S. 2011.	29
Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. Formatex. Science against	31
microbial pathogens: communicating current research and technological advances.	33
228-244). Datorită suprafeței specifice mari, nanoparticulele de argint pot fi folosite în	35
concentrații mici, fără a modifica proprietățile mecanice ale materialului. Eliberarea ionilor de	37
argint depinde de natura și concentrația în argint din nanocompozite, precum și de matricea	39
polimerului. Mecanismul de acțiune al argintului asupra microorganismelor nu este încă bine	41
cunoscut, ca posibile mecanisme fiind descrise inducerea modificărilor morfologice și struc-	43
turale la nivelul celulelor microbiene (Rai M., Yadav A., Gade A. 2009. Silver nanoparticles	45

as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 27: 76-83) prin: interacțiunea argintului cu grupele tiol (-SH) din structura enzimelor implicate în respirația celulară (Klasen HJ. 2000. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses. *Burns*, 30: 1-9); inhibarea procesului de replicare ADN, prin inducerea condensării moleculei de ADN (Liau S.Y., Read D.C., Pugh W.J., Furr J.R., Russell A.D. 1997. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*. 25: 279-283); degradarea proteinelor intracelulare și a acizilor nucleici (Knetsch MLW., Koole LH. 2011. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*. 3: 340-366), generarea speciilor reactive de oxigen (ROS), ca radicalii de oxigen (O_2) sau hidroxil (HO) (Danilczuk M., Lund A., Saldo J., Yamada H., Michalik J. 2006. Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochim. Acta A*. 63: 189-191), transferul direct de ioni de argint, fără intermediul unui solvent de la nanoparticulele oxidate la țintele biologice (ca membrana celulei) (Knetsch MLW., Koole LH. 2011. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*. 3: 340-366).

Compozitele polimerice care conțin argint reprezintă un interes major pentru domeniul academic și industrial. Caracterul biocid, pe termen lung, stabilitatea termică și volatilitatea scăzută sunt factori decisivi în aplicațiile medicale. Au fost dezvoltate trei tehnici pentru prepararea nanocompozitelor antimicrobiene: (i) nanoparticulele de argint sunt amestecate cu polimerul sau sunt distribuite în matricea polimerului gazdă; (ii) nanoparticulele sunt sintetizate în timpul polimerizării, o tehnică care necesită utilizarea unor polimeri activi electronic care să permită reducerea sărurilor de argint la nanoparticule de argint, și (iii) dispersia nanoparticulelor în monomer, în acest caz polimerizarea este inițiată în prezența nanoparticulelor care sunt prinse simultan în rețeaua polimerului (Bălan L., Schneider R., Loughnot D.J. 2008. A new and convenient route to polyacrylate/ silver nanocomposites by light-induced cross-linking polymerization. *Prog Org Coat*. 62: 351-357).

Prin tratarea policlorurii de vinil (PVC) cu NaOH și $AgNO_3$ a rezultat un compozit care a inhibat complet aderența microbiană și colonizarea *P. aeruginosa*, pe o perioadă de 72 h (Balazs D.J., Triandafillu K., Wood P., Chevolot Y., van Delden C, Harms H., Hollenstein C, Mathieu HJ. 2004. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials*. 25: 2139-2151).

S-a demonstrat că prin amestecarea PLA cu polimeri naturali se pot îmbunătăți proprietățile de biocompatibilitate, deoarece aceștia permit o atașare mai bună a celulelor umane la substratul polimeric. Colagenul este un polimer natural, foarte des utilizat în ingineria de refacere osoasă (Wahl D.A. and Czernuszka J.T., 2006. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *European cells and Materials*. 11: 43-56), la fabricarea sistemelor de eliberare controlată de medicamente (Ruszczaka Z., Friess W. 2003. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* doi:10.1016/j.addr.2003.08.00703). Se cunoaște utilizarea colagenului la obținerea unor fire de policlorură de vinil de uz medical cu biocompatibilitate ridicată (RO 113648 B1).

Se cunoaște o metodă și compoziție pentru acoperirea unui dispozitiv medical cu ajutorul unei soluții formate dintr-un polimer hidrofob, de tipul polizaharidelor și un agent de reticulare de tipul aldehidelor (US 7597903 B2).

Dezavantajul metodei de acoperire a matricilor polimerice hidrofobe cu agenți antimicrobieni constă în faptul că aceste matrici polimerice nu prezintă grupe chimice active capabile să interacționeze cu un agent antimicrobian. După tratamentul suprafeței matricii polimerice, agentul antibacterian nu poate fi legat de matricea polimerică și în consecință nu furnizează un efect de eliberare a agentului antimicrobian.	1 3 5
Din US 7314857 B2 se cunoaște o compoziție antimicrobiană pentru inhibarea formării biofilmului care cuprinde o glicoproteină care captează fierul, o polipeptidă cationică și un agent de chelare sau o glicoproteină cu rol de captare a fierului și o polipeptidă cationică. În plus, agenții activi de suprafață și compușii cuaternari de amoniu pot fi combinați avantajos cu glicoproteine cu rol de captare a fierului într-o compoziție antimicrobiană.	7 9
Din brevetul US 8747882 B2 se cunoaște utilizarea unei sări a unui acid organic (benzoat sau sorbat) pentru obținerea unei soluții de acoperire antimicrobiană a unui cateter urinar hidrofilic, pentru prevenirea infecției bacteriene. pH-ul soluției antimicrobiene de acoperire poate fi controlat cu ajutorul unui citrat sau a unei soluții tampon fosfatată.	11 13
Se cunoaște de asemenea, obținerea unui cateter urinar care asigură, atât pe termen scurt cât și lung, efecte microbiocidale asupra tulpinilor de microorganisme rezistente la antibiotice. Acest cateter este constituit din poliuretan hidrofobic, polietilen vinii acetat hidrofilic și o sare de argint (US 8173151 B2).	15 17
Problema pe care o rezolv invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere a unui bionanocompozit polimeric pe bază de acid polilactic, hidrolizat de collagen și nanoparticule de argint printr-un procedeu specific.	19 21
Procedeu de obținere conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se prelucrează în topitură la o temperatură de 170°C, timp de 7 min și o viteză de rotație a șneclului de 60 rpm un amestec pe bază de 75,6...79,6% în greutate acid polilactic, 7,56...7,96% în greutate plastifiant, 11,34...11,94% în greutate polietilenglicol, 0...5% în greutate hidrolizat de collagen și 0...0,5% în greutate nanoparticule de argint, amestecul rezultat este trecut prin extruder cu șnecl, prevăzut cu o doză care are diametrul ϕ de 4 mm și un dorn cu diametru ϕ de 3 mm, la o temperatură de 135...150°C, viteza de rotație de 30...60 rpm, obținându-se un tub urinar cu diametrul interior de $3 \pm 0,1$ mm și diametrul exterior de $4 \pm 0,1$ mm, având rezistența la rupere de 16...32 MPa, alungirea la rupere de 126,5...216,8%, modul de elasticitate de 1891...2058 MPa, are o proliferare celulară de 88,96...98,77%, rezistență la formarea de biofilm/activitate fungică față de <i>Candida albicans</i> ATCC10231, stabile pe termen scurt, având pierdere de masă de 1,2...2,9% și fiind degradabile după un timp mai îndelungat.	23 25 27 29 31 33
Prin aplicarea invenției, conform descrierii de mai sus, se obțin următoarele avantaje:	35
- se utilizează materiale prietenoase mediului;	
- se obțin materiale biocompatibile și antimicrobiene;	37
- procedeul de obținere a compozitelor antimicrobiene și a tuburilor de dren are loc prin prelucrarea în topitură, fără un consum energetic mare, pe utilaje specifice polimerilor tradiționali;	39
- compozitele polimerice obținute prezintă caracteristici fizico-mecanice, de biocompatibilitate și caracter antimicrobian adecvate utilizării propuse.	41
Prezenta invenție înlătură dezavantajele datorate utilizării solvenților și a polimerilor nebiodegradabili, soluția tehnică constând în obținerea prin prelucrarea în topitură la o temperatură de 170°C, timp de 7 min și o viteză de 60 rpm a unui amestec pe bază de 75,6...79,6% în greutate acid polilactic (PLA) tip 2003D (NatureWorks), 7,56...7,96% în greutate masterbatch Lapol 108 (LAPOL, LLC, USA), 11,34...11,94% în greutate PEG BioUltra 4000 (Sigma), 0...5% în greutate hidrolizat de collagen (Sigma-Aldrich) și 0...0,5%	43 45 47

1 în greutate nanoparticule de argint (US Research Nanomaterials, Inc.), cu dimensiunea
particulelor de 20 nm, Ag 99,99% acoperit cu 0,2% polivinil pirolidonă (PVP). Bionanocom-
3 pozitele obținute în cadrul invenției prezintă rezistență la tracțiune, alungire la rupere, bio-
compatibilitate și activitate antimicrobiană, ceea ce le recomandă pentru obținerea tuburilor
5 de dren.

Procedeul de obținere a tubului de drenare, conform invenției, constă în aceea că,
7 într-un extruder de laborator cu un singur șneac se extrude la o temperatură de 139...150°C
și o viteză de 30...60 rpm 75,6...79,6% în greutate acid polilactic (PLA), 7,56...7,96% în
9 greutate masterbatch Lapol 108, 11,34...11,94% în greutate PEG, 0...5% în greutate
hidrolizat de collagen și 0...0,5% în greutate nanoparticule de argint.

11 Compozitele obținute au fost caracterizate prin determinarea proprietăților fizico-
mecanice, a proliferării celulare, comportarea la formarea biofilmului și degradabilitatea *in*
13 *vitro*. Tuburile de dren au fost caracterizate prin determinarea sterilității cu oxid de etilena.
Rezultatele sunt prezentate în tabelele 1...3 și fig. 1...3 pe care se bazează formularea
15 exemplilor de realizare a invenției. Rezultatele sunt discutate comparativ cu amestecul de
referință și anume acidul polilactic (80%) plastifiat cu masterbatch Lapol 108 (8%) și PEG
17 4000 (12%).

Se dau, în continuare, 3 exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...3 care
19 reprezintă:

- fig. 1, aspectul morfologic al culturii celulare în contact cu biocompozitele polimerice;
- 21 - fig. 2, evaluarea degradabilității *in vitro* timp de 30 zile a biocompozitelor polimerice;
- fig. 3, evaluarea macroscopică *in vivo* a biocompozitelor polimerice.

23 Exemplul 1

Se amestecă în topitură pe un Plastograf Brabender, la temperatura de 170°C, timp
25 de 7 min și 60 rpm, 38 g PLA tip 2003D, 3,8 g masterbatch Lapol 108, 5,7 g PEG cu masa
moleculară 4000 g/mol și 2,5 g hidrolizat de collagen. Înainte de utilizare, acidul polilactic și
27 masterbatch-ul se usucă într-o etuvă cu circulație de aer la temperatura de 60°C, timp de
24 h. De asemenea, hidrolizatul de collagen se usucă într-o etuvă cu circulație de aer la
29 temperatura de 40°C timp de 6 h. Compozitul format din PLA plastifiat și componentul pentru
îmbunătățirea biocompatibilității - hidrolizat de collagen are următoarea compoziție de
31 masă: 76% PLA, 7,6% masterbatch Lapol 108, 11,4% PEG și 5% hidrolizat de collagen.

Amestecul rezultat se prelucrează pe un extruder cu un șneac, la o temperatură de
33 150°C, viteza de rotație de 30 rpm. Extruderul este prevăzut cu o duză care are dimensiunea
 $\phi = 4$ mm și un dorn cu dimensiunea de 3 mm, utilizate pentru obținerea unui tub cu
35 diametrul interior $3 \pm 0,1$ mm și diametrul exterior $4 \pm 0,1$ mm.

Amestecul rezultat prezintă o viabilitate celulară de 88,9% - tabelul 1, o tendință mai
37 mare de formare a biofilmului de 18821,1 CFU/ml față de 18210,9 CFU/ml a probei martor -
tabelul 2, o rezistență la tracțiune de 16 MPa, alungire la rupere 128% iar modul Young 1970
39 MPa - tabelul 3. Amestecul nu se degradează semnificativ după 30 zile de menținere în PBS,
pierderea de masă fiind de 8%, iar pe termen scurt, înregistrează o pierdere de masă de
41 2,9% - fig. 2. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea la 8 săptămâni a țesutului
subcutanat al șoarecilor din jurul locului de implantare a materialului - fig. 3, iar tubul de dren
43 obținut este steril.

Exemplul 2

45 Se procedează conform procedurii descris în exemplul 1 și se amestecă 37,8 g PLA
tip 2003D, 3,78 g masterbatch Lapol 108, 5,67 g PEG cu masa moleculară 4000 g/mol, 2,5 g
47 hidrolizat de collagen și 0,25 g nanoparticule de argint cu dimensiunea particulelor de 20 nm
se amestecă în topitură pe un Plastograf Brabender, la temperatura de 170°C, timp de 7 min

și 60 rpm. Nanocompozitul rezultat conținând biocompatibilizator, agent de creștere a biocompatibilității, cât și agent antimicrobian - nanoparticule de argint are următoarea compoziție de masă: 75,6% PLA, 7,56% masterbatch Lapol 108, 11,34% PEG, 5% hidrolizat de colagen, 0,5% nanoparticule de argint. Amestecul rezultat se prelucrează pe un extruder cu un șneac, la o temperatură de 145°C, viteză de rotație de 40 rpm, pentru obținerea unui tub cu diametrul interior $3 \pm 0,1$ mm și diametrul exterior $4 \pm 0,1$ mm.

Nanocompozitul rezultat prezintă o viabilitatea celulară de 93,6% - tabelul 1, o tendință mai redusă de formare a biofilmului de 12393,4 CFU/ml față de 18210,9 CFU/ml a probei martor - tabelul 2, o rezistență la tracțiune de 14,1 MPa, alungire la rupere 126,6% iar modul Young 1891 MPa - tabelul 3. El nu se degradează semnificativ după 30 zile de menținere în PBS, pierderea de masă fiind de 8%, iar pe termen scurt, înregistrează o pierdere de masă de 2,6% - fig. 2. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea la 8 săptămâni a țesutului subcutanat al șoarecilor din jurul locului de implantare a materialului fig. 3, iar tubul de dren obținut este steril.

Exemplul 3

Conform procedeului descris în exemplul 1 se amestecă, 39,8 g PLA tip 2003D, 3,98 g masterbatch Lapol 108, 5,97 g PEG cu masa moleculară 4000 g/mol și 0,25 g nanoparticule de argint cu dimensiunea particulelor de 20 nm. Nanocompozitul rezultat conținând atât biocompatibilizator cât și agent antimicrobian nanoparticule de argint are următoarea compoziție: 79,6% PLA, 7,96% masterbatch Lapol 108, 11,94% PEG și 0,5% nanoparticule de argint. Amestecul rezultat se prelucrează pe un extruder cu un șneac, la o temperatură de 139°C, viteză de rotație de 60 rpm pentru obținerea unui tub cu diametrul interior $3 \pm 0,1$ mm și diametrul exterior $4 \pm 0,1$ mm. Nanocompozitul rezultat prezintă o viabilitate celulară de 98,8% - tabelul 1, o tendință mai redusă de formare a biofilmului de numai 8187,9 CFU/ml față de 18210,9 CFU/ml a probei martor - tabelul 2, o rezistență la tracțiune de 32 MPa, alungire la rupere 216,8% iar modul Young 2058 MPa - tabelul 3. El nu se degradează semnificativ după 30 zile de menținere în PBS, pierderea de masă fiind de 5%, iar pe termen scurt înregistrează o pierdere de masă de 1,2% - fig. 2. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea la 8 săptămâni a țesutului subcutanat al șoarecilor din jurul locului de implantare a materialului fig. 3, iar tubul de dren obținut este steril.

Metode de caracterizare

Din amestecurile polimerice obținute conform procedeelor descrise mai sus s-au obținut prin presare plăci cu dimensiunea de (150 x 150 x 1) mm și filme cu dimensiunea de (150 x 150 x 0,1) mm în vederea caracterizării fizico-mecanice și biologice. Parametrii de presare sunt: presiune de lucru: 147 bar; temperatura de presare: 175°C, timp de preîncălzire 3...5 min; timp de presare: 5...10 min; timp de răcire: 45...50 min. Spre comparație s-a utilizat o probă martor care conține 80 g PLA 2003D, 8 g masterbatch Lapol 108 și 12 g PEG BioULTRA 4000, atât sub formă de placă și film cât și de tub, realizată în aceleași condiții ca și compozitele de mai sus.

Rezultate obținute

Evaluarea *in vitro* a citotoxicității biocompozitelor polimerice

Biocompatibilitatea *in vitro* a fost evaluată determinând citotoxicitatea biocompozitelor polimerice studiate, în acord cu standardul SR EN ISO 10993-5:2009, folosind metoda contactului direct cu linia celulară stabilizată obținută din fibroblaste de șoarece (linia celulară NCTC clone L929). Au fost evaluate viabilitatea și morfologia celulelor L929 tratate cu biocompozitele polimerice.

Viabilitatea celulară a fost evaluată prin analiza MTT-(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Cuantificarea viabilității celulare se realizează prin metoda spectrofotometrică și se bazează pe convertirea de succinat dehidrogenază a sării de terazoliu de tipul MTT-(3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) în formazan. Cantitatea de formazan este direct proporțională cu numărul de celule viabile și este determinată spetrofotometric, după dizolvarea într-un solvent adecvat.

Morfologia celulară a fost analizată prin colorarea celulelor cu Hematoxilina-Eozina, după contactul direct al celulelor cu probele secționate cu suprafață de 0,5 cm².

Prin metoda MTT a fost pusă în evidență viabilitatea celulelor fibroblaste stabilizate L 929, tratate 24 h și respectiv 48 h cu filmele rezultate. Determinarea viabilității celulare a fost efectuată în scopul stabilirii caracterului necitotoxic al materialelor, în funcție de care s-a stabilit biocompatibilitatea materialelor. Rezultatele viabilității celulare sunt prezentate în tabelul 1.

Viabilitatea celulară pentru linia celulară NCTC clone L929 tratată cu biocompozitele polimerice comparativ cu celulele martor, la 24 h și 48 h

Tabelul 1

Cod proba	MTT 24 h, %	MTT48 h,%
Martor de cultură (Mc)	100	100
PLA/MB/PEG (referința)	957	814
Exemplul 1	889	845
Exemplul 2	936	865
Exemplul 3	988	919
Apă oxigenată (M+)	110	67

Viabilitatea celulară a probelor investigate a fost de peste 80%, comparativ cu martorul de cultură, ceea ce sugerează că acestea nu au exercitat efect citotoxic asupra celulelor fibroblaste, deci materialele sunt biocompatibile. Celulele tratate cu bionanocompozitul PLA/MB/PEG/AgNPs au înregistrat cel mai mare procent de viabilitate celulară de 98,8% și respectiv 91,9%, după 24 h și respectiv 48 h de contact.

Morfologia celulară a fost analizată prin colorarea celulelor cu Hematoxilina-Eozina, după contactul direct al celulelor cu probele secționate cu suprafață de 0,5 cm. Caracterul necitotoxic al materialelor a fost confirmat și de aspectul morfologic al celulelor tratate cu bionanocompozitele enunțate anterior. Aspectul morfologic al culturii celulare, după 48 h de contact cu bionanocompozitele este prezentat în fig. 1.

Martorul de cultură. Cultura celulară utilizată ca atare în experiment a fost cea de fibroblaste dermale de șoarece, linie celulară stabilizată - NCTC (L929 clone), al cărei aspect morfologic este dat de celule cu formă rotundă și poligonală, nucleu circular conținând 2...3 nucleoli și granulație intracitoplasmatică fină; la 48 h de experiment cultura celulară NCTC a fost preponderent în fază subconfluentă (fig. 1f).

Aspectul celulelor aflate în contact timp de 48 h cu probele pe bază de PLA de compoziții diferite au prezentat o morfologie asemănătoare matorului de cultură, ceea ce sugerează caracterul biocompatibil al tuturor acestor probe studiate. S-au observat însă diferențe ale densității celulare în cultură, proliferarea celulelor fiind influențată de compoziția specifică fiecărei probe. Un grad mai redus de proliferare comparativ cu matorul de cultură

s-a observat la celulele puse în contact cu proba PLA plastifiată (fig. 1a), în timp ce cultura celulară aflată în contact cu proba PLA/MB/PEG/AgNPs (fig. 1d) a avut densitatea celulară apropiată de cea a matorului de cultură. Studiarea biofilmului depus pe suprafața materialelor obținute - activitate antifungică.

Dezvoltarea biofilmelor monospecifice a fost realizată folosind modelul static, în plăci cu 24 de godeuri. Probele sub formă de bucăți cu suprafața de 1 cm x 1 cm (secționare din plăcile polimerice) au fost sterilizate prin expunere la oxid de etilena. Probele au fost repartizate în godeuri iar apoi au fost acoperite complet cu 1,5 ml inocul microbian cu densitate standard, preparat pentru tulpina microfungică *Candida albicans* ATCC 10231 în Sabouraud lichid (Merck, Germania). După pregătire, plăcile au fost incubate 24 h la 37°C. După 24 h, etapa de preaderență, probele au fost spălate de trei ori cu PBS (Phosphate Buffered Saline) (Biochrom), cu scopul de a îndepărta celulele neaderate, apoi su fost replasate în mediu TSB proapăt (Tryptic Soy Broth - un mediu de uz general, folosit pentru cultivarea unei mare varietăți de microorganisme, inclusiv fungi, bacterii aerobe, anaerobe) și incubate pentru alte 24, 48 și 72 h. Cuantificarea biofilmelor formate a fost realizată cantitativ prin metoda de numărare a celulelor viabile, și anume de determinare a UFC/ml (Unități Formatoare de Colonii/ml).

După fiecare perioadă de incubare, 24 h, 48 h și respectiv 72 h, probele au fost spălate ușor cu PBS steril, pentru a nu se distruge biofilmul și apoi plasate în tuburi Eppendorf de 2 ml, care conțin câte 1 ml PBS, urmate apoi de vortexare 1 min, cu scopul de a dispersa în suspensie celulele din biofilmul format. Din suspensia formată s-au realizat microdiluții seriale succesive, apoi s-au spotat câte 10 μL, în triplicat, pe mediu agarizat de PCA (Plate Count Agar)/Sabouraud, pentru determinarea numărului de celule viabile.

Numărul de celule microbiene viabile (UFC) se determină cu relația (1):

$$UFC/ml = N \times 1/D \times 10^2 \quad (1)$$

unde:

N = media coloniilor numărate la nivelul celor trei spoturi,

10^2 = factorul de corecție a volumului,

D = diluția la care s-a efectuat citirea.

Activitatea antibiofilm a bionanocompozitelor polimerice a fost evaluată față de tulpina microfungică de referință *Candida albicans* ATCC 10231 (densitate ~ 0^5 - 10^6 UFC/ml). Biofilmul monospecific dezvoltat pe suprafața materialelor a fost evaluat la 24 h, 48 h și 72 h (tabelul 2).

Numărul de celule viabile desprinse din biofilmul de Candida albicans ATCC 10231 dezvoltat pe PLA plastifiată, biocompozit și bionanocompozite la 24 h, 48 h și 72 h

Tabelul 2

Cod proba	24 h	48 h	72 h
PLA/MB/PEG (referința)	182109	108124	87032
Exemplul 1	18821,1	8705,2	6615,5
Exemplul 2	12393,4	9752,1	6305,4
Exemplul 3	8187,9	10753,4	4025,2

Rezultatele obținute din evaluările biofilmelor au arătat că materialele obținute prezintă efect antifungic, manifestat atât asupra procesului de colonizare a substratului, cât și asupra dezvoltării unui biofilm fungic matur (tabelul 2). De asemenea, în cazul acestor "materiale s-a observat că dezvoltarea biofilmului matur de 48 h și respectiv 72 h este mai redusă, comportament dovedit de numărul mic de celule viabile incluse în biofilm.

Determinarea proprietăților mecanice de tracțiune

Proprietățile de tracțiune (rezistența la rupere, alungirea la rupere, modulul lui Young) au fost determinate conform ISO 527-2:2012. Pentru testarea epruvetelor tip halteră cu grosimea de 1 mm (plăci) a fost utilizată mașina de tracțiune INSTRON (USA) cu soft încorporat. Rezultatele raportate reprezintă valoarea medie a cinci epruvete și deviația standard.

Efectul collagenului hidrolizat și al AgNPs asupra comportamentului mecanic al PLA (rezistența la tracțiune, alungirea la rupere la tracțiune și modulul lui Young) sunt ilustrate în tabelul 3.

Proprietățile de tracțiune ale probelor PLA plastifiată, biocompozitului și bionanocompozitelor obținute

Tabelul 3

Cod probă	Rezistența la rupere la tracțiune (MPa)	Alungirea la rupere (%)	Modulul lui Young (MPa)
PLA/MB/PEG (referința)	36,57 ± 2,43	245,35 ± 13,1	1837 ± 59
Exemplul 1	16 ± 3,96	127,95 ± 7,85	1970 ± 47
Exemplul 2	14,12 ± 2,95	126,58 ± 8,56	1891 ± 69
Exemplul 3	32 ± 6,8	216,84 ± 45,37	2058 ± 105

Din tabelul 3 se observă faptul că rezistența la tracțiune scade pentru proba PLA plastifiată față de PLA de referință; de asemeni, introducerea collagenului conduce la scăderea în continuare a rezistenței la tracțiune. Introducerea nanoparticulelor de Ag nu are un efect semnificativ asupra proprietăților de tracțiune ale bionanocompozitelor obținute. Totuși, ținând cont de cerințele fizico-mecanice ale drenurilor urinare (rezistența la tracțiune la rupere trebuie să fie de minimum 10 MPa, alungirea la rupere trebuie să fie de minim 100%) se poate aprecia faptul că cele două tipuri de materiale (PLA/MB/PEG/HC/AgNPs și PLA/MB/PEG/AgNPs) îndeplinesc cerințele minime privind proprietățile de tracțiune pentru a fi utilizate în domeniul medical.

Evaluarea in vitro a degradabilității biocompozitelor polimerice

Evaluarea degradabilității biocompozitelor polimerice s-a efectuat prin imersarea eșantioanelor de (10 x 3 x 0,01) cm (obținute din filme) în PBS, pH = 7,4, la temperatura de 37°C, pentru diferite intervale de timp. Degradarea materialelor a fost evaluată prin determinarea variației de masă. Probele au fost supuse testului in vitro după uscarea acestora la 40°C în etuva MEMMERT, timp de 24 h și aducerea la masă constantă. De asemenea, probele s-au uscat în etuvă la 40°C, timp de 24 h, înainte de fiecare determinare a variației de masă.

În fig. 2 se prezintă pierderea de masă a amestecurilor realizate la diferite interval de timp. Se observă faptul că probele care conțin collagen hidrolizat (PLA/MB/PEG/HC și PLA/MB/PEG/HC/AgNPs) înregistrează o pierdere de masă de circa 7% după 3 zile de

imersare. Aceste probe prezintă cea mai mare pierdere de masă față de probele fără
colagen, probabil datorită atacului rapid al PBS-ului în spațiile dintre lanțurile polimerice,
plastifiant și colagen. Pentru utilizarea pe termen scurt (24 h) a drenurilor, receptura care
conține PLA plastifiată și agent antimicrobian prezintă o pierdere de masă de circa 1%.

Evaluarea in vivo a biocompozitelor polimerice

Implantarea biocompozitelor polimerice s-a realizat după anestezierea șoarecilor cu
ketamină/xilazină pentru a minimaliza durerea și disconfortul animalelor utilizate în testări.
Au fost utilizați 4 șoareci tip CD 1-Nude (CDI-Foxnlnu); greutate 20...25 g/șoarece (având
greutatea medie de 22,5 g) per fiecare tip de material testat. Implantarea s-a realizat dorsal,
prin efectuarea unei incizii și introducerea materialului de testat. Verificarea viabilității tuturor
animalelor s-a efectuat cel puțin o dată pe zi, iar examinările clinice detaliate au fost
efectuate și înregistrate o dată pe săptămână. Greutatea corporală a fost măsurată
săptămânal. Perioada de observație a fost de 8 săptămâni. După sacrificarea animalelor,
locul de implantare a biomaterialului a fost examinat pentru a evalua orice reacții tisulare
adverse evidente la materialul implantat. La 8 săptămâni, imediat după sacrificare, materialul
de testare s-a îndepărtat cu grijă din locul de implantare, având grijă să provoace cât mai
puține daune țesuturilor adiacente. Țesuturile din locul de implatere (piele, mușchi) au fost
rezecate și conservate în formol tamponat (soluție de formaldehidă aproximativ 4 %) și apoi
parafinate. Secțiuni de aproximativ 5 microni grosime au fost preparate din fiecare regiune
de implantare a materialelor de testat sau control. Lamelele au fost colorate cu hematoxină
și eozină.

Nu au existat efecte legate de implantarea biomaterialelor asupra greutatei corporale.
Toate animalele au prezentat creștere în greutate corporală normală până la sacrificare. Nu
au fost observate semne clinice anormale. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea
la 8 săptămâni. Examinarea macroscopică a țesutului din jurul locului de implantare nu a
relevat prezența hematoamelor la locul de implantare la 8 săptămâni, însă a evidențiat
prezența unui țesut fibrotic de aproximativ 1 mm, inseparabil sau aderent la țesuturile din jur,
încapsulând materialul testat (fig. 3). Histopatologic, nu au fost observate modificări legate
de implantarea biomaterialelor la animale. Nici o dovadă de necroză sau degenerare
musculară nu a fost observată în această perioadă.

Controlul sterilității

Eșantioanele de dren se însămânțează direct în mediile de cultură astfel încât
volumul produsului să nu fie mai mare de 10% din volumul mediului de cultură. Mediile de
cultură (Mediul I - Fluid thioglycollate medium și Mediul II - Sabouraud lichid) se toarnă în
eprubete sterile (aproximativ 10 ml), în condiții aseptice. Mediul I se regenerează timp de 20
min la 100°C în baie Marie și apoi se răcește brusc. Se utilizează câte două eprubete din
fiecare mediu pentru o probă. Se deschide aseptice ambalajul cu proba de însămânțat. Cu
o foarfecă sterilă se ridică proba din ambalaj, se taie din ea o porțiune de aproximativ 1 cm
și se introduce în eprubeta cu mediu. Se repetă operațiunea, în mod identic până când se
termină de însămânțat tot grupul de eprubete. La terminarea lucrului, eprubetele însămânțate
cu proba sterilizată se incubează timp de 7 zile, astfel: eprubetele cu Mediul I la temperatura
30...35°C și eprubetele cu Mediul II la temperatura 20...25°C. Eprubetele cu mediu
însămânțate se examinează zilnic pe timpul incubației pentru evidențierea macroscopică a
creșterii microbiene. Dacă în toate eprubetele însămânțate cu proba de analizat, mediul de
cultură își păstrează transparența inițială în comparație cu proba martor pe toată durata de
incubare, atunci proba examinată este sterilă. În caz contrar, proba este nesterilă.

Tuburile de dren obținute din biocompozitele polimerice au fost sterile.

- 3 1. Procedeu de obținere a unui bionanocompozit polimeric pe bază de acid polilalctic,
hidrolizat de collagen și nanoparticule de argint, **caracterizat prin aceea că** se prelucrează
5 în topitură la o temperatură de 170°C, timp de 7 min și o viteză de rotație a șnecului de
60 rpm un amestec pe bază de 75,6...79,6% în greutate acid polilactic, 7,56...7,96% în
7 greutate plastifiant, 11,34...11,94% în greutate polietilenglicol, 0...5% în greutate hidrolizat
de collagen și 0...0,5% în greutate nanoparticule de argint, amestecul rezultat este trecut prin
9 extruder cu șnec, prevăzut cu o doză care are diametrul ϕ de 4 mm și un dorn cu diametru
 ϕ de 3 mm, la o temperatură de 135...150°C, viteza de rotație de 30...60 rpm, obținându-se
11 un tub urinar cu diametrul interior de $3 \pm 0,1$ mm și diametrul exterior de $4 \pm 0,1$ mm, având
rezistența la rupere de 16...32 MPa, alungirea la rupere de 126,5...216,8%, modul de
13 elasticitate de 1891...2058MPa, are o proliferare celulară de 88,96...98,77%, rezistență la
formarea de biofilm/activitate fungică față de Candida albicans ATCC10231, stabile pe
15 termen scurt, având pierdere de masă de 1,2...2,9% și fiind degradabile după un timp mai
îndelungat.
- 17 2. Bionanocompozit polimeric pe bază de acid polilalctic, hidrolizat de collagen și
nanoparticule de argint obținut prin procedeul de obținere definit în revendicarea 1.

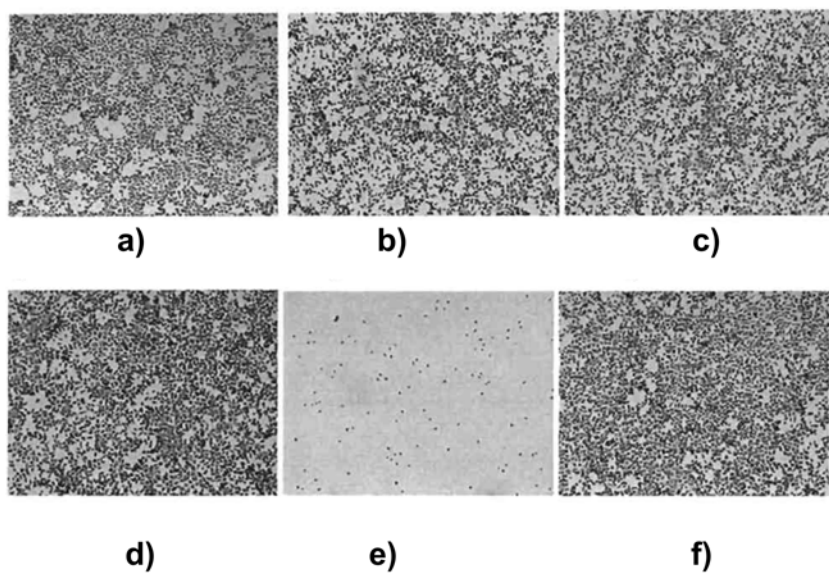


Fig. 1

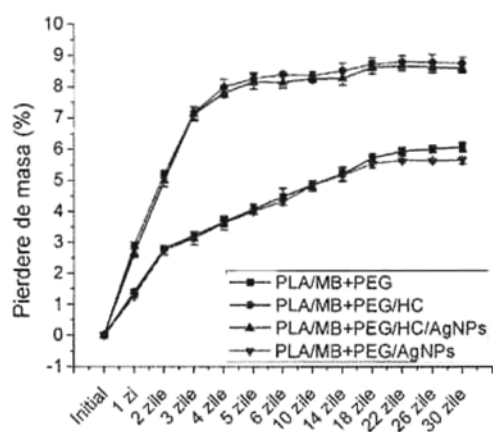
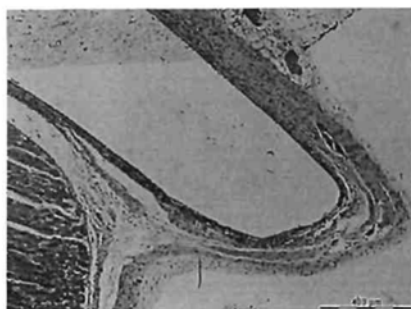


Fig. 2

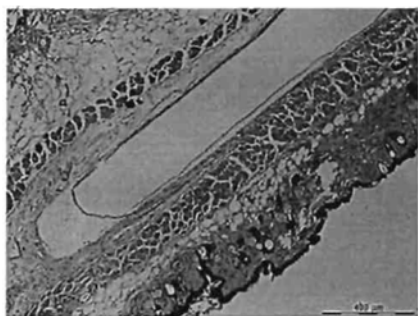
(51) Int.Cl.

C08G 63/08 (2006.01),

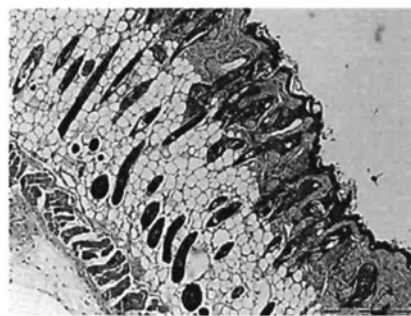
A61F 2/04 (2006.01)



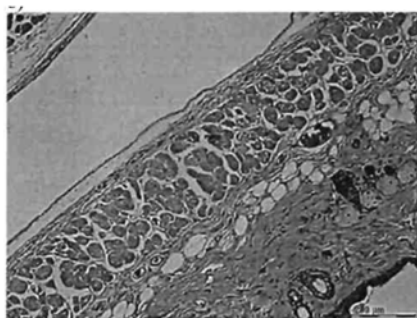
a)



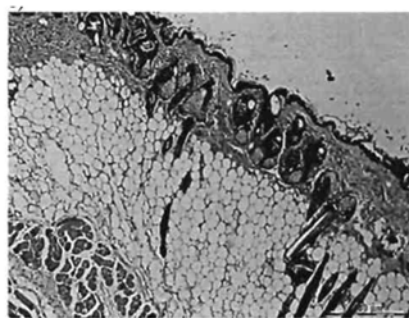
b)



c)



d)



e)

Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 458/2021