



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00935**

(22) Data de depozit: **29/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/07/2022** BOPI nr. **7/2022**

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

(73) Titular:

- **ICPE BISTRIȚA S.A., STR. PARCULUI NR. 7, BISTRIȚA, BN, RO;**
- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **RÂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3, BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA NR. 43, BL. O12, SC. B, ET. 1, AP. 62, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STĂNESCU PAUL OCTAVIAN, STR.VATRA DORNEI NR.9, BL.E 4, SC.2, AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **GROSU ELENA, STR. ALMAȘU MARE NR. 13, BL. 57, SC. 2, ET. 2, AP. 24, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **PREDA PETRUȚA, BD. 1 DECEMBRIE NR. 52, BL. A2, SC. E, AP. 13, OLTENIȚA, CL, RO;**
- **CĂȘĂRICĂ ANGELA, STR.POPA STOICA FĂRCAȘ NR.19, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **LUPESCU IRINA, STR.PREVEDERII NR.15 A, BL.C 1, SC.A, ET.2, AP.9, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **GASPAR-PINTILESCU ALEXANDRA, ȘOS. COLENTINA NR. 55, BL. 83, SC. A, AP. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **SECIU ANA-MARIA, BD. 1 DECEMBRIE 1918, NR. 22, BL. 3, SC. 1, AP. 28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **STEFAN LAURA MIHAELA, STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 54, BL. B9, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- A. EL-HADIA, R. SCHNABELA, E. STRAUBER, G. MULLER, S. HENNING, "CORRELATION BETWEEN DEGREE OF CRYSTALLINITY, MORPHOLOGY, GLASS TEMPERATURE, MECHANICAL PROPERTIES AND BIODEGRADATION OF POLY(3-HYDROXYALKANOATE) PHAS AND THEIR BLENDS", VOL. 21(6), PP. 665-674, 2002; JING XI, LING ZHANG, ZHENHUAN ZHENG, GUOQIANG CHEN, YANDAO GONG, NANMING ZHAO AND XIUFANG ZHANG, "PREPARATION AND EVALUATION OF POPROUS POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYHEXANOATE)-HYDROXYA PATITE COMPOSITE SCAFFOLDS", VOL. 22(4), PP. 293-307, 2008**

(54) **BIOCOMPOZITE POLIMERICE BIOCOMPATIBILE ȘI
DEGRADABILE CU POTENȚIALE APLICAȚII BIOMEDICALE,
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA**



1 Prezenta invenție se referă la un biocompozit polimeric bicompatibil și biodegradabil,
 2 adecvat utilizării pentru aplicații medicale și la procedeul său de obținere.

3 Polihidroxialcanoatii (PHA) reprezintă o clasă importantă de biopoliești sintetizați
 4 din mai mult de 300 de specii de bacteria Gram-pozitive și Gram-negative.

5 În general, polihidroxialcanoatii se împart în două grupe mari: PHA cu lungime scurtă
 6 a lanțului macromolecular (scl-PHAs), care conțin unități de monomer cu 3-5 atomi de carbon
 7 și PHA cu lungime medie a lanțului macromolecular (mcl-PHAs) care conțin unități
 8 monomerice cu 6-18 atomi de carbon. Cei mai cunoscuți reprezentanți ai clasei PHA sunt:
 9 poli(3-hidroxibutiratul) (P3HB) și poli(3-hidroxibutirat-co-valerianatul) (P(3HB-co-3HV)).
 10 Aceste materiale prezintă proprietăți mecanice comparabile cu polipropilena și polietilena,
 11 însă au o alungire la rupere mai mică și sunt mai fragili.

12 Pentru prima dată, Lemoigne a izolat și caracterizat poli-3-hidroxibutiratul (P(3HB))
 13 din bacterii, între anii 1923 și 1927 și a arătat că din acest extract se poate obține un film
 14 transparent. În 1959, a avut loc prima etapa de comercializare a sa, când W.R. Grace &
 15 Company a brevetat un proces de producție a P(3HB) utilizând bacterii (**US 3225766 (A)**),
 16 deși slaba stabilitate termică și lipsa unei tehnologii de extracție au limitat această aplicare
 17 (**Laycock B., Halley P., Werker S. P. A., Lanț P., The chemomechanical properties of
 microbial polyhydroxyalkanoates, Progress in Polymer Science, 38, (2013) 536-583**).

18 Polihidroxibutiratul (PHB) are proprietăți biodegradabile și biocompatibile remarcabile,
 19 iar proprietățile sale fizico-mecanice pot fi îmbunătățite prin modificarea compoziției. PHB
 20 poate fi prelucrat asemănător materialelor termoplastice, este rezistent la apă, putând astfel
 21 fi utilizat pentru obținerea unor materiale similare celor obținute din materiale plastice con-
 22 venționale. Prezintă o rezistență mai bună la degradarea la UV față de polipropilenă, toxici-
 23 tate redusă datorită faptului că se degradează *in vivo* la acidul 3-hidroxibutiric, un metabolit
 24 întâlnit în componența sângelui uman (**Lee, S.Y., Bacterial polyhydroxyalkanoates
 Biotechnol. Bioeng. 49 (1996) 1-14**), dar este mai puțin rezistent la acțiunea solventilor.
 25 PHB prezintă temperatura de topire (T_m) în domeniul 174-180°C, un grad de cristalinitate
 26 mare (X_c) (60 până la 70%) și temperatura de tranziție sticloasă (T_g) de 5°C (Steinbuchel
 27 A., Doi Y., Biopolymers, Vol. 4: Polyesters III-Applications and Commercial products. Wiley-
 28 VCH: Weinheim (Germany), (2002), 398). Această combinație de T_g și cristalinitate înaltă
 29 conduce la obținerea de filme și materiale plastice foarte fragile.

30 PHB singur nu îndeplinește toate specificațiile tehnice pentru utilizarea ca biomaterial
 31 în aplicații medicale și ale ingineriei tisulare. Prin urmare, amestecarea PHB cu alți polimeri
 32 și aditivi este o strategie bună pentru fabricarea dispozitivelor medicale resorbabile, cum ar
 33 fi: fire de sutură chirurgicală, mese, grefe vasculare, esofag artificial, regenerarea nervilor,
 34 scaffolduri pentru ingineria tisulară, regenerarea pielii, cartilajii, eliberarea controlată a
 35 medicamentului (**Christopher J. Brigham and Anthony J. Sinskey, Applications of
 Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry, International Journal of Biotechnology
 36 for Wellness Industries, 1, (2012), 53-60; Wang Y.-W., Wu Q., Chen J., Chen G.-Q.,
 37 Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and
 38 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction, Biomaterials
 39 26, (2005), 899-904; G.-Q. Chen, Q. Wu, The application of polyhydroxyalkanoates as
 40 tissue engineering materials, Biomaterials 26, (2005), 6565-6578; R. Rai, T. Keshavarz,
 41 J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. Roy, Medium chain length polyhydroxyalkanoates,
 42 promising new biomedical materials for the future, Materials Science and Engineering,
 43 R, 72, (2011), 29-47 4-7).**

În aplicațiile de inginerie tisulară este foarte important ca viteza de degradare a scaffold-urilor din PHA să fie egală cu cea de regenerare a țesuturilor. Degradarea *in vitro* a poli-3-hidroxioktanoatului a fost studiată prima dată de către Marois et al. **(Marois Y., Zhang Z., Vert M., Beaulieu L., Lenz R.W., Guidoin R., In vivo biocompatibility and degradation studies of polyhydroxyoctanoate in the rat: a new sealant for the polyester arterial prosthesis, Tissue Eng. 5, (1999), 216-224)** în apă și soluție de tampon fosfat. S-a raportat că polimerul prezintă o simplă degradare hidrolitică, care începe în regiunile amorse urmată de domeniile cristaline. Această degradare hidrolitică a fost caracterizată prin absorbția de apă, scăderea masei moleculare și pierderea neglijabilă a masei după 24 luni de incubare.

Se cunoaște faptul că pentru îmbunătățirea proprietăților PHB se preferă utilizarea copolimerului său, a polihidroxibutirat-co-valerianatului (PHBV). În 1970, Imperial Chemical Industries Ltd. comercializează produsul P(3HB-co-3HV) sub numele de Biopol™ - un material termoplastic biodegradabil produs prin utilizarea bacteriei *Alcaligenes eutrophus*. În mod frecvent, diferite companii mici produc PHBV, de exemplu Copersucar-Biocycle (PHB Industrial-Brazil) produce PHBV (cu un conținut de polihidroxivalerianat de 12%) din melasa de zahăr, cu o cristalinătate de 45% **(El-Hadi A., Schnabel R., Straube E., Muller G., Henning S., Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends, Polymer Testing, 21, (2002), 665-674)**. Recent, Procter&Gamble a început dezvoltarea de copolimeri ai PHB, polihidroxibutirati-co-hidroxialcanoati.

Copolimerii cu lungime scurtă a lanțului macromolecular, cum ar fi P(3HB-co-3HV) sunt utilizați cu prioritate față de homopolimerii cu lungime scurtă a lanțului macromolecular deoarece prezintă temperatura de topire și cristalinătate mai mici, sunt mai ușor de procesat în matriță și mai duri **(Luzier, W.D., Materials derived from biomass/biodegradable materials. Materials derived from biomass/biodegradable materials. Proc.Natl. Acad. Sci. 89, (1992) 839-842)**. Proprietățile materialelor biodegradabile pot fi ajustate prin variația conținutului de hidroxivalerianat. O creștere a conținutului de hidroxivalerianat conduce la creșterea rezistenței la impact și scăderea temperaturii de topire și tranziție sticloasă **(Amass W., Amass A., Tighe B., A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies, Polym Int. 47, (1998), 89-144)**, a cristalinității (Shogren R.L., Water vapor permeability of biodegradable polymers, J. Env. Polym. Deg, 5(2), (1997), 91-95), a permeabilității la apă **(Amass W., Amass A., Tighe B., A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies, Polym Int. 47, (1998), 89-144)** și a rezistenței la tracțiune **(Kotnis M.A., O'Brien G.S., Willett J.L., Processing and mechanical properties of biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-valerate)/starch compositions, J. Env. Polym. Deg., 3(2), (1995), 97-103)**.

Polihidroxialcanoatii cu lungime medie a lanțului macromolecular (mcl-PHA) acționează ca elastomeri într-un domeniu îngust de temperatură, datorită temperaturii mici de topire a acestora (39-61°C). Temperatura lor de tranziție sticloasă este, de obicei, sub temperatura camerei (-43 până la -25°C) iar gradul de cristalinătate este de circa 25% **(Ciesielski, S., Mo'zejko, J., Pisutpaisal, N. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. J. Cleaner Prod., 106 (2015), 408-421)**.

Chiar dacă polihidroxiacanoații sunt recunoscuți ca fiind buni candidați pentru înlocuirea polimerilor de origine petrolieră, utilizarea acestora într-un domeniu vast de aplicații este limitată datorită prețului de cost mare. Prețul de cost al polihidroxiacanoaților este de circa 15 ori mai mare față de cel al polimerilor convenționali, cum ar fi polipropilena (Singh, M., Patel, S.K., Kalia, V.C., **Bacillus subtilis as potențial producer for polyhydroxyalkanoates. Microb. Cell Fact., 8, (2009), 38-19).**

Diverse amestecuri ale polihidroxiacanoaților au fost dezvoltate cu scopul de reducere a prețului de cost și de îmbunătățire a performanței PHA.

Amestecul PHA cu acid polilactic (PLA) este unul dintre cele mai studiate amestecuri, deoarece PHB și copolimerul sau (PHBV) prezintă o structură chimică și procesare în mod similar cu PLA. Se cunoaște faptul că amestecarea polihidroxiacanoaților și a acidului polilactic (PLA) cu fibre celulozice conferă compozitului polimeric proprietăți mecanice bune (rezistență, rigiditate, duritate), precum și cost scăzut (Ren, H., Zhang, Y., Zhai, H., Chen, J., **Production and evaluation of biodegradable composites based on polyhydroxybutyrate and polylactic acid reinforced with short and long pulp fibers, Cellulose Chem. Technol., 49, (7-8), (2015), 641-652; Loureiro, N.C., Esteves, J.L., Viana, J.C., Ghosh, S., Development of polyhydroxyalkanoates/poly(lactic acid) composites reinforced with cellulosic fibers, Composites: Part B, 60, (2014), 603-611; Martinez-Sanz, M., Villano, M., Oliveira, C., Albuquerque, M.G.E., Majone, M., Reis, M., Lopez-Rubio A., Lagaron, J.M., Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. New Biotechnol, 31(4), (2014), 364-376).**

Se cunosc nanocompozite obținute din copolimerul PHB (PHBV) cu nanoceluloza (Yu, H.Y., Qin, Z.Y., Zhou, Z., **Cellulose nanocrystals as green fillers to improve crystallization and hydrophilic property of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Progress in Natural Science: Materials International, 21, (2011) 478-484),** membrane ale compozitului PHB cu celuloza bacteriană (BC) (Barud, H.S., Souza, J.L., Santos, D.B., Crespi, M.S., Ribeiro, CA., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J.L., **Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes, Carbohydr. Polym. 83, (2011), 1279-1284)** și amestecuri ale PHB cu etil celuloza (Chan, R.T.H., Garvey, C.J., Marcal, H., Russell, R.A., Holden, P.J., Foster, L.J.R., **Manipulation of Polyhydroxybutyrate Properties through Blending with Ethyl-Cellulose for a Composite Biomaterial, International J. Polym. Sci., Volume 2011, Article ID 651549, 8 pages, doi:10.1155/2011/651549).**

Se cunosc, de asemenea, compozite ale poli(3-hidroxiacanoat-co-3-hidroxiacanoatului) P(3HB-co-3HHx) cu hidroxiapatita care sunt preparate prin separarea de fază și sublimarea ulterioară a solventului. Compozitul obținut prezintă o adeziune a celulelor și o proliferare celulară mai bună față de copolimerul P(3HB-co-3HHx) (Xi J., Zhang L., Zheng Z., Chen G., Gong Y., Zhao N., Zhang X., **Preparation and evaluation of porous poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-hydroxyapatite composite scaffolds, J. Biomater. Appl. 22, (2008), 293-307).**

Se cunosc membrane hibride cu aplicație potențială în domeniul medical preparate prin tehnica electrospinning utilizând un amestec al soluțiilor de PHBV și chitosan (Chen G.Q., Wu Q., Wang Y., Zheng Z., **Application of microbial polyesters-polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials, Key. Eng. Mater. 288, (2005), 437-440).**

De asemenea se cunosc nanocompozite ale PHBV obținute în soluție prin adăugarea	1
de diverse cantități de nanoparticule modificate organic sau nemodificate, cum ar fi	
montmorilonitul Cloisite 30B (Anjum A., Zuber M., Zia K.M., Noreen A., Anjum M.N.,	3
Tabasum S., Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its	
copolymers: A review of recent advancements, International Journal of Biological	5
Macromolecules, 89, (2016), 161-174).	
Aceste compozite și amestecuri polimerice prezintă dezavantajul ca se obțin cu	7
ajutorul solvenților, la nivel de laborator.	
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea de biocompozite	9
biocompatibile și degradabile, pe bază de un copolimer al polihidroxibutiratului și celuloza	
bacteriană prin amestecarea în topitură, pe utilaje asemănătoare celor folosite la procesarea	11
polimerilor convenționali.	
Compoziția polimerică pe bază de polihidroxibutirat-co-valerianat și celuloza	13
bacteriană pentru obținerea compozitelor polimerice biocompatibile și degradabile, conform	
invenției, înlătură dezavantajele produselor cunoscute, prin aceea că sunt constituite dintr-un	15
amestec format din: 97...98% PHBV, 1% vitamina E și 1...2% BC, procentele fiind exprimate	
în procente în greutate.	17
Procedee de obținere a compozitelor polimerice biocompatibile, conform invenției,	
constă în aceea că, prelucrarea amestecului polimeric se bazează pe aducerea materiilor	19
prime în stare topită pe un Plastograf Brabender, prevăzut cu o cameră de amestecare de	
50 cm ³ , la o temperatură de 180°C, timp de amestecare 6 min și o viteză a șnecurilor de	21
40 rot/min. Înainte de utilizare, polihidroxibutirat-co-valerianatul (PHBV) și celuloza	
bacteriană (BC) se usucă într-o etuvă cu circulație de aer, la temperatura de 50°C, timp de	23
3 h. Amestecul topit și omogenizat se presează la cald pe o presă de laborator în următoa-	
rele condiții: preîncălzire - timp de 5 min, temperatura de 185°C, presare - timp de 10 min,	25
temperatura de 185°C și presiunea de 147 bari și răcire - timp de 20 min și presiune de	
147 bari în vederea obținerii de filme omogene, subțiri, cu dimensiunea 200 x 200 x 0,1 mm.	27
Din acestea s-au prelevat epruvete pentru efectuarea testelor privind testarea proprietăților	
biologice și fizico-chimice.	29
Invenția, conform descrierii de mai sus, prezintă avantajul că se obțin biocompozite	
pe bază de polihidroxibutirat-co-valerianat, celuloza bacteriană și vitamina E care prezintă	31
biocompatibilitate și degradabilitate adecvate utilizării pentru aplicații biomedicale.	
Pentru obținerea biocompozitelor obținute în prezenta invenție s-au utilizat următoa-	33
rele materii prime:	
- biopolimerul polihidroxibutirat-co-valerianat (PHBV), conținând 12% polihidroxi-	35
valerianat (PHV), achiziționat de la GoodFellow, UK - matrice polimerică; prezintă proprietăți	
similare cu poliolefinele, densitate 1,25 g/cm ³ , alungire la rupere 35%, rezistență la tracțiune	37
la rupere 23 MPa;	
- vitamina E (α-Tocopherol), achiziționată de la Sigma-Aldrich - agent bioactiv,	39
prezintă densitatea 0,95 g/cm ³ ;	
- celuloza bacteriană (BC), sintetizată de Institutul Național de Cercetare Dezvoltare	41
Chimico-Farmaceutica București - sub formă de pulbere fină.	
Celuloza bacteriană (BC) este obținută din resurse regenerabile și se caracterizează	43
prin proprietăți favorabile, cum ar fi: remarcabile proprietăți mecanice, porozitate, absorbție	
de apă, biodegradabilitate și excelentă afinitate biologică. Celuloza bacteriană poate fi	45
considerată un material ideal pentru tratarea rănilor și arsurilor, realizarea vaselor artificiale	
de sânge, scaffolduri pentru ingineria tisulară <i>in vitro</i> (Wojciech K. Czaja, David J. Young,	47
Marek Kawecki, and R. Malcolm Brown, Jr., The Future Prospects of Microbial	
Cellulose in Biomedical Applications, Biomacromolecules, 8(1), (2007), 1-12).	49

În continuare, se prezintă două exemple de biocompozite polimerice biocompatibile și degradabile și procedeul de realizare a acestora, conform invenției, în legătură cu fig 1...4 care reprezintă:

- fig. 1, viabilitatea celulară prin metoda MTT, după 48 h de testare, (a) martor de cultură; (b) referință; (c) PHBV/BC 1%; (d) PHBV/BC 2%; (e) martor pozitiv. Scala = 50 μ m;

- fig. 2, analiza ciclului celular;

- fig. 3, diagrame DSC ale biocompozitelor polimerice, (a) inițial; (b) după 30 zile imersare în PBS;

fig. 4, spectre FTIR-ATR ale biocompozitelor polimerice, (a) inițial; (b) după 30 zile imersare în PBS.

Exemplul 1

Se amestecă în topitură pe un Plastograf Brabender, prevăzut cu o cuvă de amestecare de 50 cm³, la temperatura de 180°C, timp de 6 min și 40 rpm, 49 g PHBV (conținând 12% PHV), 0,475 ml vitamina E și 0,5 g celuloză bacteriană. Înainte de utilizare, PHBV și celuloza bacteriană (BC) s-au uscat într-o etuvă cu circulație de aer la temperatura de 50°C, timp de 3 h. Compozitul format din PHBV, vitamina E și celuloza bacteriană are următoarea compoziție de masă: 98% PHBV, 1% vitamina E și 1% celuloză bacteriană. Amestecul obținut se presează pe o presă de laborator în următoarele condiții: preîncălzire - timp de 5 min, temperatura de 185°C, presare - timp de 10 min, temperatura de 185°C și presiunea de 147 bari și răcire - timp de 20 min și presiune de 147 bari în vederea obținerii de filme omogene, subțiri, cu dimensiunea 200x200x0,1 mm. Amestecul rezultat este codificat PHBV/BC 1% și prezintă: o viabilitate celulară de 86,67% la 24 h (tabelul 1), citocompatibilitate (tabelul 2), un conținut de ADN total de 87,34% (tabelul 3), o concentrația de colagen secretată de către celulele NCTC cultivate cu această variantă de material de 0,434 mg/mL (tabelul 5) și o pierdere de masă de 0,82% (tabelul 7).

Exemplul 2

Se procedează conform procedeului descris în exemplul 1 și se amestecă în topitură pe un Plastograf Brabender, 48,5 g PHBV (12% PHV), 0,475 ml vitamina E și 1 g celuloză bacteriană, la temperatura de 180°C, timp de 6 min și 40 rpm. Biocompozitul format din PHBV, vitamina E și celuloza bacteriană are următoarea compoziție de masă: 97% PHBV, 1% vitamina E și 2% celuloză bacteriană. Amestecul obținut se presează pe o presă de laborator în următoarele condiții: preîncălzire - timp de 5 min și temperatura de 185°C, presare - timp de 10 min, temperatura de 185°C și presiunea de 147 bari și răcire - timp de 20 min și presiune de 147 bari în vederea obținerii de filme omogene, subțiri, cu dimensiunea 200 x 200 x 0,1 mm. Amestecul rezultat este codificat PHBV/BC 2% și prezintă: o viabilitate celulară de 94% la 24 h (tabelul 1), citocompatibilitate (tabelul 2), un conținut de ADN total de 89,2% (tabelul 3), o concentrație de colagen secretată de către celulele NCTC cultivate cu această variantă de material de 0,479 mg/mL (tabelul 5) și o pierdere de masă de 1,12% (tabelul 7).

Rezultatele sunt prezentate în tabelele 1...8 și fig. 1...4 pe care se bazează formularea exemplurilor de realizare a invenției. Rezultatele sunt discutate comparativ cu amestecul de referință și anume polihidroxi-co-valerianat (99%) și vitamina E (1%), codificat PHBV.

Metode de caracterizare

Evaluarea citotoxicității biocompozitelor polimerice

Citotoxicitatea biocompozitelor polimerice a fost evaluată conform standardului SR EN ISO 10993-5:2009, folosind metoda contactului direct cu linia celulară stabilizată obținută din fibroblaste de șoarece (linia celulară NCTC clona L929). Prin această metodă au fost evaluate: viabilitatea și morfologia celulelor L929 tratate cu biocompozitele polimerice.

Viabilitatea celulară a fost evaluată utilizând metoda reducerii sării de tetrazoliu (bromură de MTT-(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliu). Celulele au fost cultivate în Mediu Esențial Minimal (MEM) care conține 10% ser fetal bovin (Sigma, USA) și 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina și 500 µg/mL neomicina. Suspensiile celulare cu densitatea de 4×10^4 celule/mL au fost adăugate în plăci cu 24 de godeuri și incubate 24 h la 37°C, în condiții de umiditate și 5% CO₂. Compozitele polimerice au fost adăugate în godeuri, iar plăcile au fost incubate în condiții standard 24 h și 48 h. Experimentul a fost realizat în triplicat. La sfârșitul perioadei de incubare, mediul de cultură a fost înlocuit cu soluție MTT iar plăcile au fost incubate 3 h la 37°C. Soluția MTT a fost înlocuită cu izopropanol, urmând o agitare ușoară pentru solubilizarea cristalelor de formazan. Cuantificarea viabilității celulare s-a realizat prin metoda spectrofotometrică care se bazează pe convertirea de către dehidrogenazele celulelor metabolic active în formazan care este solubil în mediul de cultură. În cadrul testului s-a înregistrat densitatea optică pentru formazan ($\lambda = 570$ nm), utilizând un specrofotometru de microplăci, Berthold Mithras LB 940 (Germania). Celule netratate cu compozite biopolimerice au servit ca martor de control, cu 100% viabilitate celulară. În calitate de martor pozitiv s-a utilizat soluție de apă oxigenată, în concentrație de 0,003%.

Rezultatele viabilității celulare pentru linia celulară NCTC clone L929 tratată cu biocompozitele polimerice comparativ cu martorul de cultură și martorul pozitiv, la 24 h și 48 h sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Cod proba	MTT 24 h, %	MTT 48 h, %
Referința	96,33	104,77
Exemplul 1	86,67	100,48
Exemplul 2	94,00	98,81
Martor de cultură	100	100
Martor pozitiv (Apă oxigenată)	11,0	6,7

Biocompozitele polimerice testate au condus la un procent foarte bun de viabilitate celulară, acest lucru indicând un grad ridicat de biocompatibilitate în conformitate cu scala de citotoxicitate (viabilitate celulară de peste 80% semnifică efect necitotoxic, biocompatibilitate).

Examinarea morfologiei celulare a fost efectuată prin cultivarea a 1 mL de mediu cu celule de densitate 4×10^4 celule/mL în plăci cu 12 godeuri. După 24 h de incubare în condiții standard (pentru aderarea celulelor în godeuri și formarea monostratului) a fost adăugat mediu proaspăt și biocompozitele polimerice cu suprafața de 0,5 cm², apoi plăcile au fost incubate 48 h în aceleași condiții. Ulterior, după îndepărtarea probelor polimerice, celulele au fost fixate în Bouin și colorate cu hematoxilina-eozina. Culturile au fost vizualizate prin microscopie optică cu ajutorul microscopului inversat Cari Zeiss Axio Observer DI, iar imaginile au fost stocate folosind aparatul de fotografiat digital, Axio Cam MRC (Germania).

Aspectul morfologic al culturii celulare, după 48 h de contact cu biocompozitele polimerice este prezentat în fig. 1.

Martorul de cultură prezintă aspect morfologic caracteristic liniei celulare stabilizate de tip NCTC, alcătuită din celule fibroblaste de formă rotundă și poligonală; la 48 h cultura celulară NCTC se află în faza aproape confluentă. La 48 h de la adăugarea probelor în godeuri, cultura celulară aflată în contact cu referința (PHBV) și biocompozitele pe baza de

PHBV și celuloza bacteriană prezintă caracteristicile morfologice specifice liniei celulare tip NCTC, faza de creștere celulară este aproape de confluentă (fig. 1), în concordanță cu rezultatele obținute pentru viabilitatea celulară, determinată prin metoda MTT. Cultura celulară aflată în contact cu martorul pozitiv, soluția de apă oxigenată (0,003%), la 48 h prezintă degradare celulară evidentă, morfologia celulelor este total schimbată, celulele având forma sferică și dimensiuni diminuate, membranele celulare sunt alterate iar conținutul intracitoplasmatic este distrus.

Evaluarea proliferării celulare prin analiza ciclului celular

Studiul proliferării celulare s-a efectuat prin analiza ciclului celular prin citometrie în flux. Ciclul celular cuprinde ansamblul evenimentelor biochimice și morfologice responsabile de proliferarea celulară și este divizat în patru faze: G1, S, G2 (interfaza) și M (mitoza).

Modificările observate în dinamica ciclului celular, între fracțiile celulare aflate în fazele G0/G1, S și G2/M se bazează pe măsurarea conținutului în ADN, reprezentat ca histogramă de fluorescență în probele celulare recoltate după 24 h de tratament cu biocompozitele de testat.

Pentru analiza ciclului celular, fibroblaste de șoarece NCTC clona L929 (provenită din Colecția Europeană de Culturi Celulară - ECACC) au fost însămânțate în plăci de cultură cu 6 de godeuri, la o densitate celulară de 5×10^4 celule/mL. Linia celulară NCTC a fost cultivată în mediu MEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice (penicilină-streptomycină-neomicină), fiind menținută la 37°C, într-o atmosferă umedă cu 5% CO₂ și apoi tratată cu biocompozitele de testat. După 24 h, celule au fost tripsinizate și fixate în etanol 70%, apoi depozitate peste noapte, la 4°C.

Celulele au fost apoi spălate cu PBS (Phosphate Buffered Saline) și incubate cu RNaza A (0,5 mg/mL) la 37°C timp de 30 min. A urmat marcarea celulelor ce s-a realizat prin incubarea acestora cu iodură de propidiu (100 μg/mL), la 4°C, timp de 30 min. Analiza secvențialității ciclului celular s-a efectuat cu ajutorul citometrului în flux LSR II (Becton Dickinson) iar estimarea conținutului de ADN celular a fost cuantificat cu ajutorul softului ModFit.

Histogramele obținute în urma analizei ciclului celular a celulelor tratate cu biocompozitele obținute sunt prezentate în fig. 2.

Se observă că în cazul tuturor probelor analizate, histogramele ciclului celular sunt similare histogramei martorului. Rezultatele obținute la distribuția celulară în fiecare fază a ciclului celular a celulelor tratate cu PHBV și biocompozitele PHBV/BC sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Cod probă	G0/G1	S	G2/M
Martor de control	73,35	13,57	12,87
Referință	70,65	15,51	14,21
Exemplul 1	70,74	15,92	13,65
Exemplul 2	71,89	15,75	13,62

Analiza distribuției celulare în fazele ciclului celular relevă faptul că tratamentul cu PHBV și compozitele pe bază de PHBV și celuloza bacteriană, timp de 24 h, nu a afectat ritmul de progresie celulară normal al celulelor NCTC. Comparativ cu martorul, s-a observat o ușoară diminuare a fracției celulare aflate în faza G0/G1 concomitent cu creșterea fracției celulare în faza S. Astfel, distribuția celulară în faza G0/G1 este de 73,35% pentru cultura martor, iar în cazul probelor aceasta variază între 70,65% (PHBV) și 71,89% (PHBV/BC 2%).

Simultan, are loc o creștere a fracției celulare aflate în faza S ce variază între 15,51% (PHBV) și 15,92% (PHBV/BC 1%), comparativ cu matorul (13,57%).

Rezultatele obținute în urma analizei ciclului celular prin citometrie în flux au arătat că celulele cultivate în prezența compozitelor pe o perioadă de 24 h prezintă o distribuție în fazele ciclului celular similară matorului, fapt ce sugerează că tratamentul nu a afectat creșterea și proliferarea celulară. Faza G0/G1 este o fază foarte importantă din timpul ciclului celular deoarece determină o celulă să intre sau nu în diviziune. În timpul fazei G1, celulele cresc în mărime și sintetizează ARN și proteinele necesare pentru sinteza de ADN și durează aproximativ 1/3 din durata întregului ciclu celular. Valorile obținute în acest experiment nu indică blocarea celulelor în nicio fază a ciclului celular. Astfel, biocompozitele testate sunt citocompatibile și permit menținerea ritmului normal de creștere al celulelor.

Determinarea conținutului de ADN total

Conținutul de ADN este direct proporțional cu numărul de celule (considerând 8 pg ADN per celulă) și, prin urmare, metoda este folosită pentru determinarea proliferării celulare. Celulele fibroblaste din linia celulară NCTC clona L929 au fost incubate în prezența probelor testate: PHBV, PHBV/BC 1% și PHBV/BC 2%, timp de 5 zile, în condiții standard de cultivare. Apoi, mediul de cultură a fost îndepărtat, celulele s-au spălat cu PBS, pH 7,4, după care au fost incubate într-un tampon de liza celulară (citratur de sodiu salin 30 mM (SSC) și SDS 0,2 mg/mL), la 37°C, timp de 1 h cu agitare ușoară. Ulterior, 10 μL de supernatant s-au utilizat pentru determinarea conținutului de ADN folosind kitul Quant-iT dsDNA HS (Invitrogen), conform instrucțiunilor producătorului. Peste cei 10 μL de supernatant s-au adăugat 190 μL de soluție de lucru, probele au fost incubate 2 min la temperatura camerei, după care s-a măsurat fluorescența fiecărei probe la fluorimetrul Qubit. Rezultatele s-au raportat la conținutul în ADN al matorului de cultură (celule cultivate în absența probelor) și considerând că matorul de cultură netratat a avut o proliferare celulară de 100%. Comportamentul celulelor din punct de vedere al proliferării a fost evaluat prin determinarea fluorimetrică a conținutului în ADN din lizatul celular recoltat la sfârșitul perioadei de cultivare. Rezultatele obținute privind conținutul de ADN al celulelor fibroblaste clona L929 cultivate în prezența filmelor de PHBV și respectiv PHBV/BC, timp de 5 zile sunt prezentate în tabelul 3. Rezultatele sunt calculate ca medie a 3 determinări ± SD.

Tabelul 3

Proba	Conținut în ADN celular (%)
Cultura mator	100 ± 2,5
Referința	80,04 ± 1,2
Exemplul 1	87,34 ± 3,4
Exemplul 2	89,2 ± 1,6

Rezultatele privind conținutul în ADN al celor 2 probe pe bază de PHBV și celuloză bacteriană au variat între 87,34% pentru proba PHBV/BC 1% și 89,2% pentru proba PHBV/BC 2% (tabelul 3). Aceste rezultate indică faptul că biocompozitele pe bază de PHBV au stimulat proliferarea celulară după 5 zile de cultivare în condiții standard.

Analiza viabilității celulare prin citometrie în flux

Viabilitatea celulelor cultivate în prezența filmelor polimerice s-a analizat și prin citometrie în flux, cu ajutorul kitului Live and Dead conform recomandărilor producătorului (Thermo Fisher Scientific). Această tehnică permite discriminarea celulelor vii de celulele moarte, prin marcarea simultană cu calceina (compus cu fluorescență verde, marker al

activității esterazice celulare ce caracterizează celulele vii) și bromura de etidiu (compus cu fluorescență roșie, marker al deteriorării membranei celulare ce caracterizează celulele moarte) și analiza acestora prin citometrie în flux.

Astfel, fibroblaste de șoarece NCTC (clona L929) au fost însămânțate în placi de cultură cu 6 de godeuri, la o densitate celulară de 5×10^4 celule/mL. Celulele NCTC au fost cultivate în mediu MEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1% antibiotice (penicilina-streptomicina-neomicina), fiind menținute la 37°C, într-o atmosferă umedă cu 5% CO₂. La 24 h de la însămânțare, acestea au fost tratate cu biocompozitele de testat. După 24 h, celule au fost tripsinizate și apoi spălate cu PBS. A urmat marcarea celulelor, ce s-a realizat prin incubarea acestora cu calceina și bromura de etidiu, timp de 15 min. Celulele au fost spălate și reluate în PBS. Analiza viabilității celulare s-a realizat cu ajutorul citometrului în flux LSR II (Becton Dickinson) și a softului FACSDiva.

Viabilitatea celulelor aparținând liniei NCTC cultivate în prezența biocompozitelor pe bază de PHBV, analizată prin citometrie în flux este prezentată în tabelul 4.

Tabelul 4

Cod proba	Viabilitatea celulelor, %
Martor	100
PHBV	97,5
PHBV/BC1%	97,0
PHBV/BC2%	97,1

Rezultatele prezentate în tabelul 4 arată că după tratamentul celulelor cu biocompozitele pe bază de PHBV și BC, timp de 24 h, acestea și-au menținut viabilitatea la același nivel cu o cultură de celule martor (100%), deci biocompozitele sunt biocompatibile.

Dozarea collagenului

Determinarea influenței imuno-histo-chimice a materialelor studiate asupra sintezei componentelor matricei extracelulare pe celule în culturi prin metode spectrofotometrice s-a realizat prin dozarea collagenului secretat de celule în prezența biomaterialelor studiate.

Celulele liniei NCTC (clona L929) provin din țesut conjunctiv subcutanat murin și au capacitatea de a sintetiza fibre de collagen (**Merchant, D. J. & R. Kahn. Fiber formation in suspension cultures o/L străin fibroblasts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, (1958), 359-362**).

Celulele liniei NCTC (5×10^4 celule/mL) au fost incubate în prezența materialelor studiate, la 37°C, timp de 5 zile. Supernatantele celulare au fost recoltate și stocate la -20°C, fiind utilizate ulterior pentru dozarea collagenului total și a collagenului tip I.

Dozarea collagenului total

Concentrația de collagen secretată de către celulele NCTC cultivate cu variantele de material s-a determinat folosind metoda Sircol (**Lareu R. R., Zeugolis D. I., Abu-Rub M., Pandit A., Raghunath M. Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions. Acta Biomaterialia, 6(8), (2010), 3146-3151**). Aceasta se bazează pe abilitatea colorantului Sirius Red de a se lega de aminoacizii constituenți ai collagenului, formând un complex, care va precipita. Astfel peste 100 μ L proba s-a adăugat 1 mL de reactiv (Sirius Red 0,1% dizolvat într-o soluție de acid picric saturat) și s-a incubat sub agitare continua, timp de 45 min. Apoi

probele s-au centrifugat la 10000 rpm, timp de 10 min. Supernatantele s-au înlăturat, iar peletul s-a solubilizat cu reactiv alcalin (NaOH 0,5 M). Absorbanta probelor s-a înregistrat la 540 nm folosind cititorul de placi Tecan Sunrise.

Datele obținute cu ajutorul metodei Sircol au arătat ca toate variantele de materiale testate au stimulat sinteza de collagen secretată de către celulele NCTC cultivate cu variantele de materiale, timp de 5 zile, comparativ cu martorul de cultură (tabelul 5).

Tabelul 5

Proba	Colagen total (mg/mL)
Cultura martor	0,346
PHBV	0,401
PHBV/BC 1%	0,434
PHBV/BC 2%	0,479

În cazul variantelor de material testate, cantitatea de collagen secretată a crescut semnificativ, o dată cu creșterea conținutului de celuloză bacteriană (de la 0,401 mg/mL la respectiv 0,479 mg/mL) comparativ cu proba control (0,346 mg/mL).

Metoda Sircol se utilizează în general pentru monitorizarea producției de collagen solubil de către culturile celulare *in vitro*, însă trebuie ținut cont de faptul că colorantul nu face distincție între tipurile diferite de collagen ce pot fi secretate.

Dozarea collagenului tip I

Colagenul tip I secretat de celulele NCTC în mediul de cultură a fost dozat din supernatantele colectate folosind indicațiile producătorului kitului Elisa (MyBiosource). Metoda de cuantificare se bazează pe o tehnică Elisa de tip competitiv ce presupune utilizarea unui anticorp monoclonal specific pentru collagen tip I, imobilizat pe o placă de 96 de godeuri și o soluție de antigen de collagen tip I marcat cu peroxidaza. După perioada de incubare a probelor în placa de cultură și în prezența antigenului marcat s-a adăugat o soluție substrat specifică peroxidazei, formându-se în final un compus de culoare albastră. Reacția enzimatică este stopată, iar soluția rezultată, de culoare galbenă, se citește la 450 nm, cu ajutorul unui cititor de plăci. Intensitatea culorii este invers proporțională cu concentrația de collagen tip I, întrucât collagenul din probă și cel adăugat în formă conjugată cu enzima competează pentru numărul de situsuri de pe anticorpul imobilizat. O curbă de etalonare este construită în funcție de absorbanta înregistrată pentru concentrațiile standardelor utilizate.

Rezultatele obținute privind cantitatea de collagen tip I secretată de către celulele NCTC cultivate cu PHBV și PHBV/BC, timp de 5 zile sunt prezentate în tabelul 6.

Tabelul 6

Proba	Colagen tip I (ng/mL)
Cultura martor	62,346
Referința	45,818
Exemplul 1	51,575
Exemplul 2	57,333

Variantele PHBV, PHBV/BC 1% și PHBV/BC2 au prezentat valori ale colagenului tip I apropiate de cea a matorului, observându-se o ușoară creștere a producției acestuia la adăugarea componentului BC în compoziție.

Rezultatele experimentelor realizate au evidențiat faptul că toate materialele testate sunt biocompatibile, metabolismul celulelor NCTC fiind stimulat să producă proteine ale matricei extracelulare, de tipul colagenului.

Evaluarea in vitro a degradabilității biocompozitelor polimerice

Evaluarea degradabilității biocompozitelor polimerice studiate în actuala lucrare a fost realizată prin imersarea esantioanelor 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 și prin investigarea modificărilor termice și structurale (DSC și ATR-FTIR). Probele au fost supuse testului după uscarea la 40°C în etuva MEMMERT, timp de 24 h și aducerea la masa constantă. De asemenea, probele s-au uscat în etuvă la 40°C, timp de 24 h, înainte de fiecare determinare a variației de masă.

Pierdere de masă

În tabelul 7 se prezintă pierderea de masă a amestecurilor pe bază de PHBV și celuloza bacteriană, imersate în PBS, la diferite intervale de timp.

Tabelul 7

Perioada de imersare în PBS	Pierdere de masă, %		
	Referința	Exemplul 1	Exemplul 2
1 zi	0	0,003	0
2 zile	0,0900 ± 0,001	0,0787 ± 0,016	0,1228 ± 0,082
3 zile	0,1534 ± 0,021	0,1638 ± 0,002	0,2686 ± 0,085
4 zile	0,1898 ± 0,061	0,2266 ± 0,085	0,2904 ± 0,016
5 zile	0,2064 ± 0,052	0,2502 ± 0,060	0,3711 ± 0,084
6 zile	0,2550 ± 0,045	0,3320 ± 0,098	0,4800 ± 0,052
10 zile	0,3400 ± 0,064	0,4950 ± 0,050	0,6990 ± 0,093
14 zile	0,4740 ± 0,020	0,6880 ± 0,030	0,8240 ± 0,043
18 zile	0,6560 ± 0,050	0,8130 ± 0,040	1,0502 ± 0,091
22 zile	0,6930 ± 0,04	0,8020 ± 0,040	1,0512 ± 0,074
26 zile	0,7300 ± 0,020	0,8130 ± 0,040	1,0841 ± 0,097
30 zile	0,7390 ± 0,010	0,8230 ± 0,070	1,1200 ± 0,042

Din tabelul 7 se observă faptul că pierderea de masă este influențată de conținutul de celuloză bacteriană. Proba care conține celuloză bacteriană 2% înregistrează cea mai mare pierdere de masă (1,12 ± 0,04%) dintre probele testate, după 30 zile de imersare.

Pierdere de masă a biocompozitelor de tipul PHBV/BC este atribuită penetrării solventului în spațiile dintre lanțurile macromoleculare, permițând hidroliza suprafețelor și ulterior degradarea. Rezultatele obținute indică faptul că PHBV/BC 2% este favorabilă degradării pe termen lung, putând fi utilizată pentru design-ul dispozitivelor medicale cu degradabilitate controlată, în timp ce, pe termen scurt (utilizare 1-2 zile), probele experimentate sunt stabile.

Analiza termică prin DSC

Diagramele DSC ale materialelor înainte și după imersarea în PBS au fost înregistrate pe un aparat DSC (823^e Mettler Toledo). Profilul de temperatură a fost 30-200°C, iar viteza de încălzire a fost de 5°C/min. Din diagramele termice DSC au fost evaluate: temperatura de topire (T_m), entalpia de topire (ΔH_m) și gradul de cristalinitate (X_c) utilizând următoarea ecuație:

$$X_c \% = 100 \times \Delta H_m / \Delta H_m^0 \quad (1)$$

unde: ΔH_m este entalpia de amestecare a probelor (J/g); ΔH_m^0 este entalpia pentru 100% PHBV cristalin - $\Delta H_m^0 = 146$ J/g). S-a ținut cont de valoarea fracției de masă a PHBV din compoziția amestecurilor.

În fig. 2 se prezintă diagramele termice obținute prin analiza DSC pentru probele pe bază de PHBV și celuloză bacteriană inițiale și supuse la imersarea în PBS timp de 30 de zile.

Temperatura de topire (T_m), entalpia de fuziune (ΔH_m) și gradul de cristalinitate (X_c) ale amestecurilor realizate au fost evaluate din curbele DSC prezentate în fig. 2 înainte și după expunerea în PBS iar valorile acestor parametri sunt menționate în tabelul 8.

Tabelul 8

Cod proba	Inițial			După imersie 30 de zile în PBS		
	ΔH_m , J/g	T_m , °C	X_c , %	ΔH_m , J/g	T_m , °C	X_c , %
Referința	43,48	160,89 150,22	30,08	70,18	160,834 148,93	48,55
Exemplul 1	34,82	160,46 148,71	24,33	56,97	160,04 148,89	39,81
Exemplul 2	45,73	160,06 149,39	32,29	57,98	159,75 147,34	40,94

Din fig. 2 se observă apariția a două picuri endoterme de topire pentru probele testate asociate cu topirea diferitor tipuri de cristalite din structura PHBV. De asemenea, introducerea celulozei bacteriene nu afectează valorile temperaturii de topire, însă, gradul de cristalinitate (X_c) al PHBV scade pentru PHBV/BC 1% față de proba de control, în timp ce pentru proba PHBV/BC 2% crește.

De asemenea din tabelul 8 se observă faptul că gradul de cristalinitate al probelor pe bază de PHBV și celuloză bacteriană a crescut după imersarea în PBS comparativ cu probele neexpuse, cu circa 61% în cazul PHBV, 63% în cazul PHBV/BC 1% și respectiv cu 26% în cazul PHBV/BC 2%, în concordanță cu pierderea de masă prezentată în tabelul 7, ceea ce indică degradarea lor.

Analiza FT-IR

Caracteristicile spectrale ale amestecurilor realizate (filme) au fost analizate atât inițial cât și după imersare în PBS, prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier cu tehnica ATR utilizând un cristal de ZnSe cu un unghi de incidență de 45°.

Spectrele FT-IR înregistrate pentru probele pe bază de PHBV și celuloză bacteriană prezintă benzi de absorbție la următoarele numere de undă: 1718 cm⁻¹ (vibrația de întindere a legăturii C=O din gruparea cristalină a PHBV), 1277 cm⁻¹ și 1055 cm⁻¹ (vibrația de întindere a C-O-C), 1178 cm⁻¹ (vibrația de întindere a C-O-C din regiunea amorfă), cu mici modificări

1 ale intensității benzilor de absorbție datorate interacțiunii dintre matricea polimerică și
celuloza bacteriană (fig. 3). În comparație cu spectrul FT-IR înregistrat pentru proba de
3 control (PHBV) se constată ca intensitățile celor trei benzi cristaline de la 975 cm^{-1} , 897 cm^{-1}
și 826 cm^{-1} au scăzut pentru probele PHBV/BC1% și PHBV/BC2%, neexpuse cât și a celor
5 expuse la acțiunea PBS. De asemenea, aria benzii de absorbție de la 1718 cm^{-1} specifică
cristalinității PHBV a scăzut în cazul probelor care conțin celuloză bacteriană în comparație
7 cu proba PHVB (control), probele imersate în PBS prezentând o arie mai mare a acestei
benzi de absorbție față de probele inițiale, ceea ce indică degradarea chimică. Aceste
9 rezultate sunt în bună corelare cu gradul de cristalinitate prezentat în tabelul 8.

Rezultatele obținute relevă faptul că biocompozitele biocompatibile testate ar putea
11 fi utilizate la dezvoltarea de noi biomateriale polimerice degradabile, cu aplicații atât la
confecționarea dispozitivelor medicale pentru ingineria tisulară, cu rată scăzută de
13 degradare, dar și pentru sisteme de tipul cateterelor cu utilizare pe termen scurt.

- | | |
|--|----|
| | 1 |
| 1. Biocompozit polimeric bicompatibil și biodegradabil, caracterizat prin aceea că , | 3 |
| este constituit dintr-un amestec format din: 97...98% polihidroxibutirat-co-valerianat, 1% | |
| vitamina E și 1...2% celuloză bacteriană, procentele fiind exprimate în procente în greutate. | 5 |
| 2. Procedeu de obținere a unui bicompozit polimeric definit la revendicarea 1, | |
| caracterizat prin aceea că , materiile prime se prelucrează în topitură la o temperatură de | 7 |
| 180°C, timp de amestecare de 6 min și o viteză de rotație a snecului de 40 rot/min, urmată | |
| de presarea la cald la 185°C și o presiune de 147 bari, din care rezultă filme cu dimensiunea | 9 |
| 200 x 200 x 0,1 mm, având biocompatibilitate și degradabilitate adecvate pentru aplicații | |
| biomedicale (înregistrează o viabilitate celulară de 86,67-94% la 24 h, favorizează ritmul | 11 |
| normal de creștere al celulelor, prezintă un conținut de ADN total de 87,34-89,2%, o con- | |
| centrația de collagen secretată de către celulele NCTC cultivate cu aceste biomateriale de | 13 |
| 0,434-0,479 mg/mL și o pierdere de masă de 0,82-1,12% după 30 de zile imersare în PBS). | |

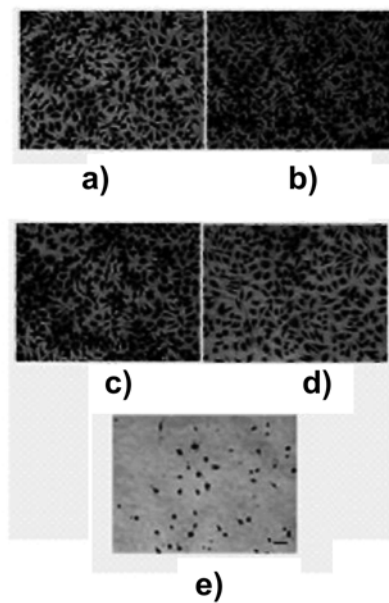


Fig. 1

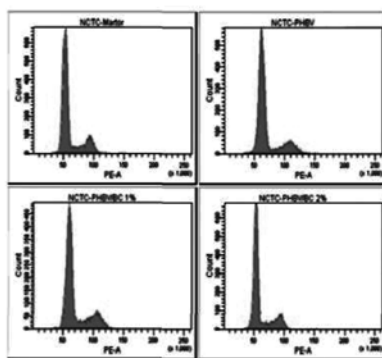


Fig. 2

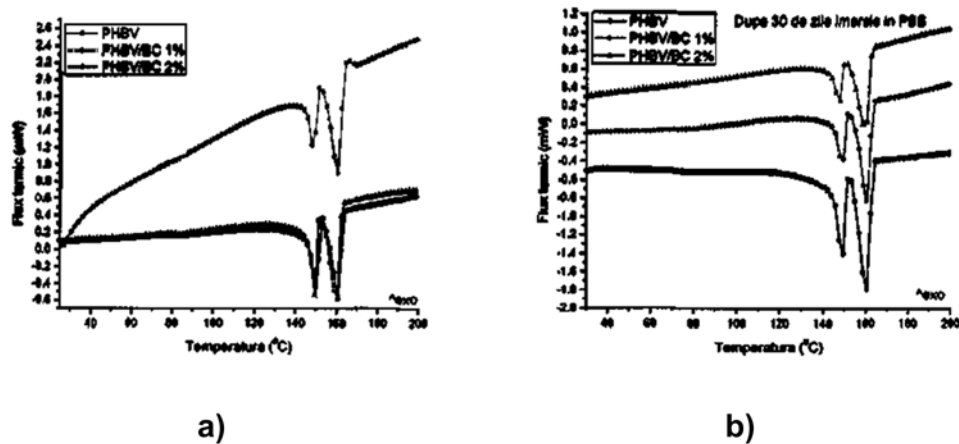


Fig. 3

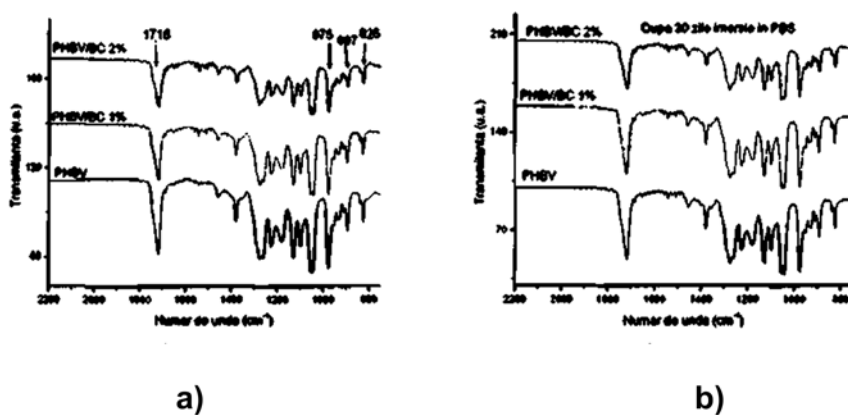


Fig. 4

