



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2018** BOPI nr. **2/2018**

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

(73) Titular:
• **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 RĂDICA, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 119020 B1; JP 2007268239 A;
JP 2007177074 A**

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



RO 130668 B1

1 Invenția se referă la un material bionanocompozit polimeric cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante, pentru uz medical, și la un procedeu de obținere a acestuia.

3 Bionanocompozitele sunt materiale nanostructurate, de obicei hibride, care sunt formate prin combinarea polimerilor naturali cu solide anorganice, în care cel puțin una dintre 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.), cât 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 interes deosebit, 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 autoasamblarea nanomaterialelor pentru aplicații biomedicale pentru biomateriale cu proprietăți mecanice, termice și electrice superioare.

21 Matricele 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)]:

23 - materiale de proveniență naturală: polizaharide (amidon, alginat, chitina/chitosan și derivați) sau proteine (soia, collagen, geluri pe bază de fibrinogen, mătase);

25 - polimeri sintetici: acid polilactic (PLA), acid poliglicolic (PGA), poli (ϵ -caprolactonă) (PCL), poli(hidroxi-butirat) (PHB).

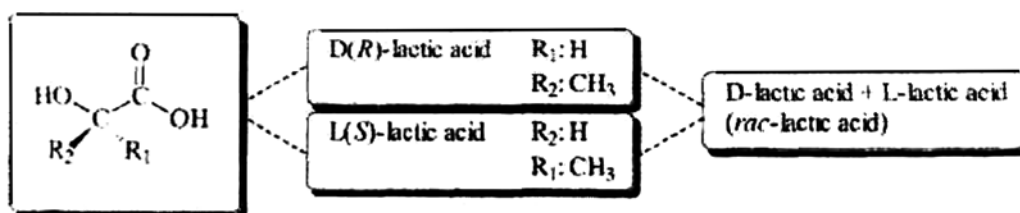
27 Aceste clase de materiale prezintă avantaje și dezavantaje. Polimerii sintetici prezintă rezistență mecanică bună, forma și gradul de degradare pot fi modificate ușor, însă suprafața lor este hidrofobă și nu au semnale de recunoaștere celulară. Polimerii de proveniență naturală au în principal avantajul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

33 Cateterele sunt dispozitive medicale, 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. Cateterele urinare sunt folosite pentru a drena vezica urinară, și în îngrijirea bolilor cronice. Cateterele urinare interioare (indwelling) (IUC) sunt dispozitive de unică folosință, constând în catetere, tuburi și punji 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 contactate 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 introducere 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)].

RO 130668 B1

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 adsorbția 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., Prag. 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 rezistență la impact scăzută, care nu modifică semnificativ efectul de seră, deoarece CO₂ generat prin biodegradarea PLA este echivalent cu cantitatea de CO₂ 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 T_g = 55...59°C și temperatura de topire T_m = 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)]. Purity 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 apă, 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.

1 **Mater. Med 3. 365-370 (1992)**]. Stenturile din PLLA (SR-PLLA) au fost biocompatibile, cu reacții
2 tisulare adverse minime în jurul stentului, în partea anterioară a uretrei, în timp ce stenturile din
3 oțel au provocat reacții inflamatorii puternice [**Kemppainen E., Talja M., Riihela M., Pohjonen**
4 **T., Formala P., Alfthan O., Urol. Res., 21(3): 235-238 (1993)**].

5 Primul stent biodegradabil uretral din PLLA a fost realizat în 1993 de către Kemppainen;
6 ulterior s-au folosit și alte materiale polimerice pentru stenturi în urologie [**Kemppainen E., Talja**
7 **M., Riihela M., Pohjonen T., Tormala P., Alfthan O., Urol. Res., 21(3): 235-238 (1993)**]. Acest
8 stent prezintă caracteristici favorabile pentru aceste aplicații, comparativ cu stentul din oțel, iar
9 reacțiile tisulare au fost minime timp de 6 luni. Testele clinice au demonstrat că stentul auto-
10 ranforsat din PLLA (SR-PLLA) se degradează după o durată mai mică de 1 an [**Kemppainen**
11 **E., Talja M., Riihela M., Pohjonen T., Tormala P., Alfthan O., Urol. Res., 21(3): 235-238**
12 **(1993)**], iar cel din copolimer poli(L-lactic acid-co-D-lactic acid), în mai puțin de 6 luni [**Pletas**
13 **A., Talja M., Tammela T., Taari K., Valimaa T., Tormala P., J. Urol. 80: 439-443 (1997)**]. **M.**
14 **Multanen și colab.** au studiat utilizarea azotatului de Ag în amestec cu copolimer ϵ -capro-
15 lactonă/L-lactidă, în stenturi urologice din PLLA. S-a constatat că acoperirea cu azotat de Ag
16 a prevenit aderența bacteriilor la stenturile de PLLA, reducând infecțiile bacteriene. De aseme-
17 nea, acoperirea cu azotat de Ag a redus cantitatea de bacterii în urină [**Multanen M., Talja M,**
18 **Hallanvuoto S., Siitonen A., Valimaa T., Tammela T. L. J., Seppala J., Tormala P., Urol Res.,**
19 **28:327-331 (2000)**].

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

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

28 În prezent patogenii sunt rezistenți la antibiotice. Argintul (Ag) este un agent antimicrobian
29 cu capacitate unică de a ataca și a omorî microorganismele care provoacă infecții [**Trogolo J,**
30 **A. Agion Technologies (Wakefield, MA). Medical Devices and Diagnostic industry (MD ±**
31 **DI), 32(8): (2010)**]. Siguranța este primul aspect care trebuie luat în considerare, deoarece
32 agentul antimicrobian este eliberat pe și în corpul pacientului după o perioadă de timp. Agentul
33 antimicrobian trebuie să fie efectiv pentru o serie mare de microorganisme, și trebuie să fie
34 durabil și procesabil în materialul din care este fabricat dispozitivul. Argintul ionic satisface aceste
35 cerințe în diferite aplicații. Argintul - coloidal sau ionic în soluție este un produs antimicrobian,
36 iar microbii nu pot forma rezistență la acesta, nefiind un antibiotic chimic, ca penicilina
37 [http://www.naturalnews.com/010761_colloidal_silver_ionic.html#ixzz287rlyW1Y]. Argintul
38 prezintă proprietăți antibacteriene bune, iar în ultimii ani s-a utilizat în dispozitive medicale de
39 la regenerarea țesuturilor până la catetere urinare [**Saint S., Elmore J.G., Sullivan S. D.,**
40 **Emerson S. S., Koepsell T. D., Am J Med 105(3):236-41 (1998); Greenfeld J. I., Sampath**
41 **L. Popilskis S. J., Brunnert S. R., Stylianou S., Modak S., Crit. Care. Med. 23: 894-900**
42 **(1995)**]. Activitatea antibacteriană a argintului depinde de cationul de argint care se leagă cu
43 grupe electron-donoare de moleculele biologice care conțin sulf, oxigen sau azot. Ionii de argint
44 acționează prin înlocuirea altor ioni metalici, precum calciu și zinc [**Schierholz J. M., Lucas L.**
45 **J., Rump A., Puiverer G., Efficacy of silver-coated medical devices. J. Hosp. Infect., 40:**
46 **257-62 (1998)**]. Tratamentul cu flux de ioni se utilizează pentru acoperiri cu argint [**Suzuki Y.,**
47 **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. tinyurl.com/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.

Brevetul **RO 119020 B1** prezintă un material obținut din policlorură de vinil și colagen, pentru realizare de dispozitive medicale, cum ar fi sonde, drenuri și catetere, și un procedeu de obținere a acestui material. Materialul biocompatibil este constituit din 5000 părți policlorură de vinil, având o valoare Kw de 68...71 și o densitate de 0,427...0,429 g/cm³, cu 12,5...25 părți stearat de calciu, 5...8,5 părți stearat de zinc, 2650...3750 părți dioctilftalat, 150 părți ulei de soia epoxidat, 250...2000 părți colagen hidrolizat, 250...500 părți copolimer ales dintre copolimer anhidridă maleică-stiren, anhidridă maleică-acetat de vinil și anhidridă maleică-metacrilat de metil, părțile fiind exprimate în greutate. Procedeu de obținere a acestui material constă în aceea că se amestecă într-un malaxor, timp de 10 min, la temperatura camerei, 100 părți policlorură de vinil, având o valoare Kw de 68...71 și o densitate de 0,427...0,429 g/cm³, cu 12,5 părți stearat de calciu și 5 părți stearat de zinc, după care se adaugă 160 părți dioctilftalat încălzit anterior la o temperatură de 80°C, se adaugă 20 părți ulei de soia epoxidat, urmat de amestecare timp de 10 min, la o temperatură de 95°C, cu o viteză de amestecare de 50...60 rot/min, timp în care componentii lichizi sunt absorbiți în compoziție, rezultând în final un amestec care se vâlțuiește, se presează în folii sau plăci având o duritate Shore D de 65...85° Sh D, sau se granulează într-un granulator având temperaturile pe cele trei zone de 98...100°C, 120...130°C și 140°C.

De asemenea, în literatura de specialitate mai sunt dezvăluite obținerea unui vas de sânge artificial, dintr-un material ce conține colagen și acid polilactic (**JP 2007268239 A**), și obținerea unui material biocompatibil, din colagen și acid polilactic, utilizat în domeniul medical (**JP 2007177074 A**).

Bionanocompozitele pot fi produse pe baza unor cerințe specifice, utilizând o varietate foarte mare de matrice 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 nanodispozitive 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 atât oportunitate financiară pentru industrie, cât și, mai important, oportunitate pentru scăderea impactului negativ asupra sănătății, pentru prevenirea infecțiilor, asociate cu costuri mari de tratament și de îngrijire a sănătății.

RO 130668 B1

1 Invenția de față rezolvă problema lipsei flexibilității, biocompatibilității, a caracterului anti-
microbian și antioxidant al PLA prin încorporarea unui plastifiant natural modificat, uleiul de soia
3 epoxidat, a unui polimer natural, colagenul hidrolizat, și a unor substanțe cu caracter anti-
oxidant, ca vitamina E și ioni de argint, care imprimă totodată proprietăți specifice materialelor
5 obținute.

Materialul bionanocompozit polimeric biocompatibil, cu proprietăți antimicrobiene și
7 antioxidante, pentru uz medical, conform invenției, este constituit din 58,5...85% acid polilactic,
15% ulei de soia epoxidat, 15% colagen hidrolizat, 5% vitamina E, 5% agent tensioactiv de tip
9 polioli, și 1,5% nanoparticule de argint.

Procedeu de obținere a materialului bionanocompozit polimeric biocompatibil, conform
11 invenției, constă din faptul că materiile prime se prelucrează în topitură la o temperatură de
175°C, într-un dispozitiv echipat cu o cameră de amestecare de 30 cm³, și cu două rotoare
13 contrarotative, având o viteză de 60 rot/min, timp de 10 min, urmată de presare la o presiune
de 200 bari și la o temperatură de 175°C, din care rezultă un material sub formă de plăci omo-
15 gene, cu o grosime de 1...4 ± 0,05 mm, cu o alungire de 4,02...39,97 mm, un modul de elasti-
citate de 1929,06...2708,33 MPa, rezistență la rupere de 14,88...30,76 Mpa, gradul de inhibare
17 a unor microorganisme ca *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* de și *Salmonella*
typhymurium după 48 h de 100%.

19 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,
21 care se pot utiliza ca materiale pentru fabricarea unor dispozitive medicale.

Scopul invenției de față este dezvoltarea unei noi clase de materiale, și unui procedeu
23 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
25 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
27 modificat cu grupe epoxi; biocompatibilitatea s-a îmbunătățit considerabil prin încorporarea
polimerului biologic, colagenul hidrolizat, care este accesibil din surse naturale, și ușor de
29 preparat, proprietăți antimicrobiene imprimate prin încorporarea nanoparticulelor de argint
obținute printr-o tehnică originală, care împiedică aglomerarea lor, și distribuția uniformă în
31 matricea de PLA, și, în sfârșit, pentru obținerea caracterului oxidativ se propune vitamina E, un
antioxidant natural multifuncțional, ce are, de asemenea, acțiune benefică pentru sănătatea
33 pacienților. Materialele sunt destinate obținerii de catetere și alte dispozitive medicale.

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

35 - 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
37 210°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);

39 - uleiul de soia a fost epoxidat cu acid peracetic și apă oxigenată, în prezență de acid
acetic glacial/toluen [F. Mustață, N. Tudorachi, D. Roșu, **Composites: Pat B, 42: 1803-1812**
41 **(2011)**]. Acidul peracetic a fost obținut *in situ* din apă oxigenată și acid acetic glacial, în absență
de catalizatori. Uleiul de soia epoxidat (USE) a avut echivalentul epoxi 270 g/echivalent.
43 Echivalentul epoxi a fost determinat utilizând o metodă din literatură [Cașcaval C. N., Mustață
F., Roșu D., **Angew. Makromol. Chem., 209: 157-166 (1993)**];

45 - colagenul hidrolizat, obținut din tendon bovin, are caracteristicile date în tabelul 1;
- vitamina E în forma (±) - α-tocoferol sintetic, cu masa moleculară de 430,71 g/mol,
47 densitate de 0,95 g/mL la 20°C, și o puritate >96% (determinată prin HPLC), furnizată de Sigma-
Aldrich, Steinheim, Germania;

RO 130668 B1

- AgNO₃ utilizat ca sare de argint, diclormetan (DCM, extra pur), N,N-dimetilformamidă (DMF, 99%), metanol (extra pur), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) au fost cumpărate de la Sigma-Aldrich. Apa utilizată a fost distilată ultrapură (Milli-Q);

- Pluronic F127 (Mw = 1,26 x 10⁴ 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). Încorporarea nanoparticulelor în polimerul PLA s-a realizat prin amestecarea simultană a amestecului DMF/AgNP cu soluția de PLA în diclormetan (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. AgNO₃ a fost amestecat timp de 5 min 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.

Procedeul 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 cm³, și cu două rotoare contrarotative. Amestecarea sistemelor în topitură a avut loc timp de 10 min, la o temperatură de 175°C și viteza rotoarelor de 60 rot/min. Cantitatea de collagen utilizat în matricea PLA a fost de 15 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 h la temperatura de 60°C, iar collagenul hidrolizat s-a uscat timp de 4 h la 30°C, într-o etuvă de vid.

După evacuarea materialelor din camera de amestecare, acestea au fost introduse în interiorul unei prese Carver 4394, încălzite la 175°C, pre-topite timp de 3 min și apoi presate sub formă de plăci timp de 3 min, presiunea utilizată fiind de 200 bari. 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, pregătit pentru testele mecanice. O dispersie bună s-a observat în toate cazurile.

În continuare se dau 5 exemple de realizare a invenției, cu referire și la datele prezentate în tabelele 1...6 și fig. 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 - collagenul 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.

RO 130668 B1

1 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
3 de 1 mm.

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

7 *Metode termice*

9 Determinările DSC au fost realizate cu ajutorul unui aparat NETZSCH DSC 200F3
(Netzsch - Germania). O cantitate constantă din fiecare probă (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
11 de încălzire și de răcire de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Experimentele s-au realizat în atmosferă de azot, cu un
flux de 50 ml/min.

13 Degradarea termică a polimerilor a fost realizată utilizând un sistem de analiză termo-
gravimetrică TG/DSC, model STA 449 FI Jupiter (Netzsch - Germania). Probele a căror masă
15 a variat între 7...10 mg au fost încălzite de la 25°C la 600°C , cu o viteză de încălzire de
 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ sub purja de gaz inert (N_2 puritate minimă de 99,999%, 50 ml/min și 20 ml/min purja
17 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
19 echipamentului s-au calibrat pe domeniul de la $-38,5^\circ\text{C}$ la 660°C , în funcție de tranziția
punctelor de topire a unor metale standard (Hg, Ga, Sn, Zn, Al). Achiziționarea și prelucrarea
21 datelor s-a făcut cu ajutorul unui soft Proteus®.

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

25 - SR ISO 16649-2/2007 - Metoda orizontală pentru enumerarea bacteriilor din genul
Escherichia coli β -glucuronidaza pozitivă. Tehnica numărării coloniilor la 44°C , utilizând mediul
5-bromo-4-cloro-3Indolyl β -D-glucuronid;

27 - SR EN ISO 11290-1:2000/AI:2005 - Metoda orizontală pentru detectarea și numărarea
Listeria monocytogenes. Partea 1: Metode de detecție;

29 - SR EN ISO 6579/2003/AC/2004/AC/2006, 2007 - Metoda orizontală pentru detectarea
bacteriilor din genul *Salmonella spp.*

31 *Activitatea antioxidantă*

33 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
35 (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 0,5 mM în metanol.
37 DPPH este redus când reacționează cu un compus antioxidant care poate dona un hidrogen.
Modificarea culorii (din violet în galben pal) (absorbantă) a fost citită la 511 nm după 60 min de
39 reacție, cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis (Cary 60-UV-Vis Spectrophotometer, USA).
Soluția de control a fost preparată prin amestecarea a 9 ml metanol cu 1 ml soluție de radicali
41 DPPH.

43 **Exemplul 1**

43 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
45 30 cm a unui mixer Brabender, echipat cu două rotoare contrarotative, și încălzit la 175°C . Se
amestecă în topitură amestecul preformat timp de 10 min, la o temperatură de 175°C și o viteză
47 a rotoarelor de 60 rot/min. 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

RO 130668 B1

presă Carver 4394, încălzită la 175°C. După o pretopire de 3 min, materialul se presează la 200 bar timp de alte 2 min, 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, cu ~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 rezistență la rupere de 24,87 MPa, și o valoare a modulului Young de 2414,32 MPa. Materialul astfel obținut are o alungire la rupere de 29,25 mm cu 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 satisfăcătoare, 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 collagen 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 collagen 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 alungire la rupere de 23,04 mm, cu 1347,4% mai mare, și prezintă o inhibare de 100% față de *E. Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhymurium*, după o expunere de 48 h, 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 componente 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 collagen 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 de Ag a scăzut la o valoare de 8 mm, comparativ cu exemplul 5, însă această caracteristică este cu 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 typhymurium*, după o expunere de 48 h, 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.

RO 130668 B1

1 Din rezultatele obținute la testarea reologică în modul dinamic a materialelor supuse
invenției se observă efectul prezenței componentelor asupra comportării la curgerea în topitură
3 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
5 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
7 relaxându-se încet. Când lanțurile polimerice au fost deformate la frecvențe mari, catenele
înlănțuite nu au avut timp suficient pentru a se reorienta, conducând la creșterea modulilor. În
9 fig. 2 sunt prezentate evoluțiile modulilor G' și G'' și a viscozității complexe, observându-se
aparitia unui "umăr" în cazul materialelor supuse invenției, această variație a caracteristicilor
11 reologice fiind datorată inducerii unei elasticități suplimentare în material, odată cu încorporarea
uleiului de soia epoxidat și a celorlalte componente, această modificare fiind mai evidentă în
13 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.

15 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
17 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
19 de soia epoxidat, vitamina E), scade volumul liber, distrugându-se domeniile din zona amorfă a
PLA. Valorile temperaturilor de topire (T_m) ale compozitelor sunt, de asemenea, ușor mai
21 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
23 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
25 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*
27 **Applied Polymer Science**, 94: 1670-1675 (2004)].

29 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.

31 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,
33 această comportare fiind explicată de prezența vitaminei E în materialele menționate, ce are
rol de agent antioxidant, exemplul 1, care nu prezintă Vitamina E în compoziție, inhibă doar
35 5,88% din radicalii liberi.

RO 130668 B1

Revendicări

1

1. Material bionanocompozit polimeric biocompatibil, cu proprietăți antimicrobiene și antioxidante, pentru uz medical, pe bază de acid polilactic și colagen, **caracterizat prin aceea că** este constituit din 58,5...85% acid polilactic, 15% ulei de soia epoxidat, 15% colagen hidrolizat, 5% vitamina E, 5% agent tensioactiv de tip polioliol și 1,5% nanoparticule de argint. 3 5

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 cm³, și cu două rotoare contrarotative, având o viteză de 60 rot/min, timp de 10 min, urmată de presare la o presiune de 200 bari și la o temperatură de 175°C, 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, un modul de elasticitate de 1929,06...2708,33 MPa, rezistență la rupere de 14,88...30,76 Mpa, gradul de inhibare a unor microorganisme ca *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* de și *Salmonella typhymurium* după 48 h de 100%. 7 9 11 13







Tabelul 1

Caracteristicile analitice ale colagenul extras din tendon bovin

Analiza	Procedeul enzimatic
Azot total (g/100 g)	14,14
Proteine totale (g/100 g)	84,36
Hidroxiprolină (g/100 g)	8,98
Colagen (g/100 g)	81,00
Zaharuri neuter (g/100 g)	2,50
Hexozamine (g/100 g)	12,50
Greutatea moleculară medie (Da)	301,000

Tabelul 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)	

RO 130668 B1

Tabelul 3 1

Rezultatele DSC din al doilea ciclu de încălzire
pentru unele materiale supuse invenției

Proba	Tg (°C)	Tcc (°C)	ΔHcc (J/g)	Tm (°C)	ΔHm (J/g)
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 sticloasă; Tcc - temperatura de cristalizare la rece; ΔHcc - entalpia corespunzătoare procesului de cristalizare la rece; Tm - temperatura de topire; ΔHm - entalpia corespunzătoare procesului de topire.

Tabelul 4

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

Material	T _{onset} °C	W _{rez} %	T ₁₀ °C	T ₅₀ °C
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_{onset} - temperatura corespunzătoare începerii degradării termice; W_{rez} - procent pierderi reziduale; T₁₀ - temperatura corespunzătoare pierderii de 10% ; T₅₀ - temperatura corespunzătoare pierderii de 50%.

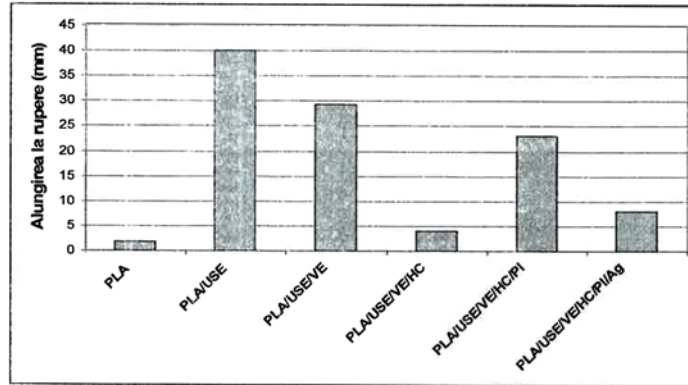
Tabelul 5 27

Rezultatele testării proprietăților antimicrobiene
pentru unele materiale supuse invenției

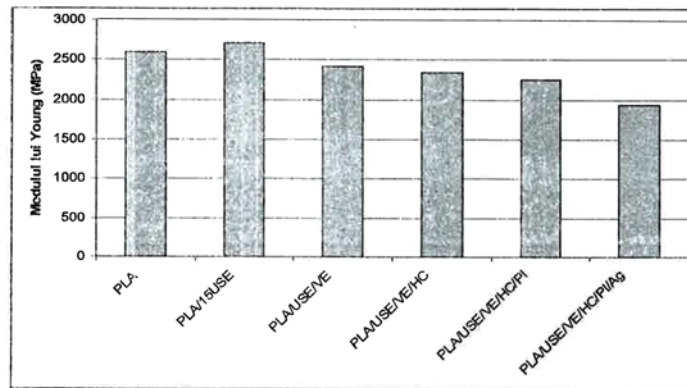
Material	Inhibare 24h (%)	Inhibare 48h (%)
<i>E. Coli</i> (ATCC 25922)		
Exemplul 4	89	100
Exemplul 5	91	100
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)		
Exemplul 4	87	100
Exemplul 5	93	100
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)		
Exemplul 4	82	100
Exemplul 5	88	100

Rezultatele activității antioxidante pentru referința și materialele supuse invenției

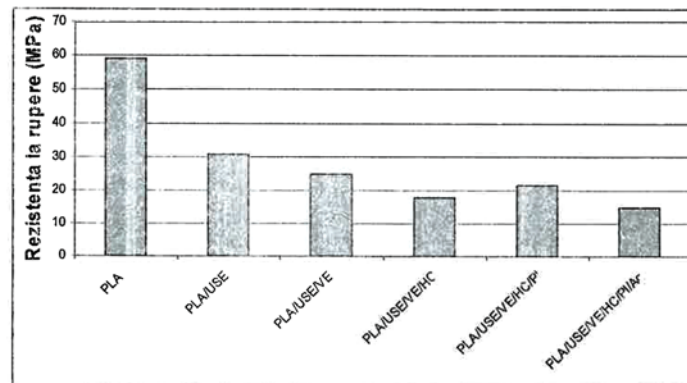
Material	Absorbanta	RSA [%]
	(la 511 nm)	30 min
Control DPPH	102	
PLA	101	98
Exemplul 1	96	588
Exemplul 2	0	10000
Exemplul 3	0	10000
Exemplul 4	0	10000
Exemplul 5	0	10000



(a)

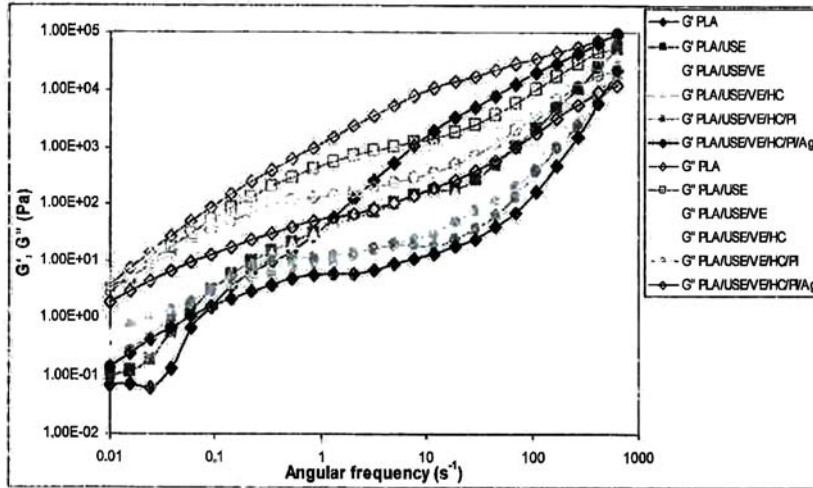


(b)

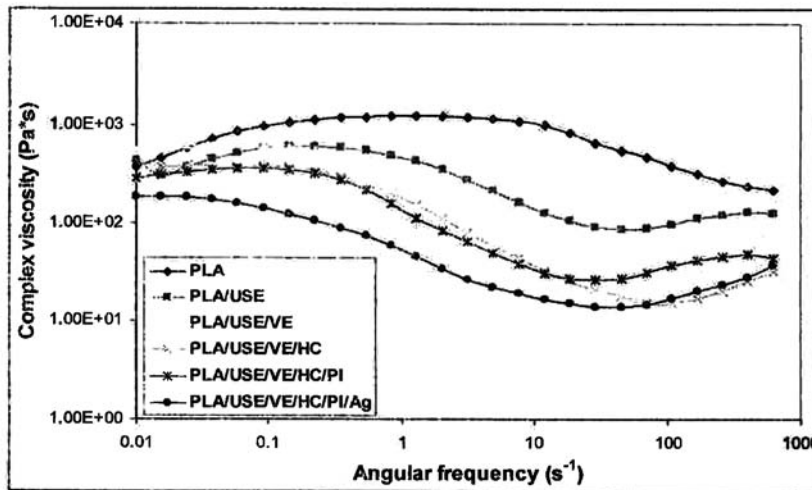


(c)

Fig. 1



(a)



(b)

Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61K 47/30^(2006.01);

C08G 63/06^(2006.01)

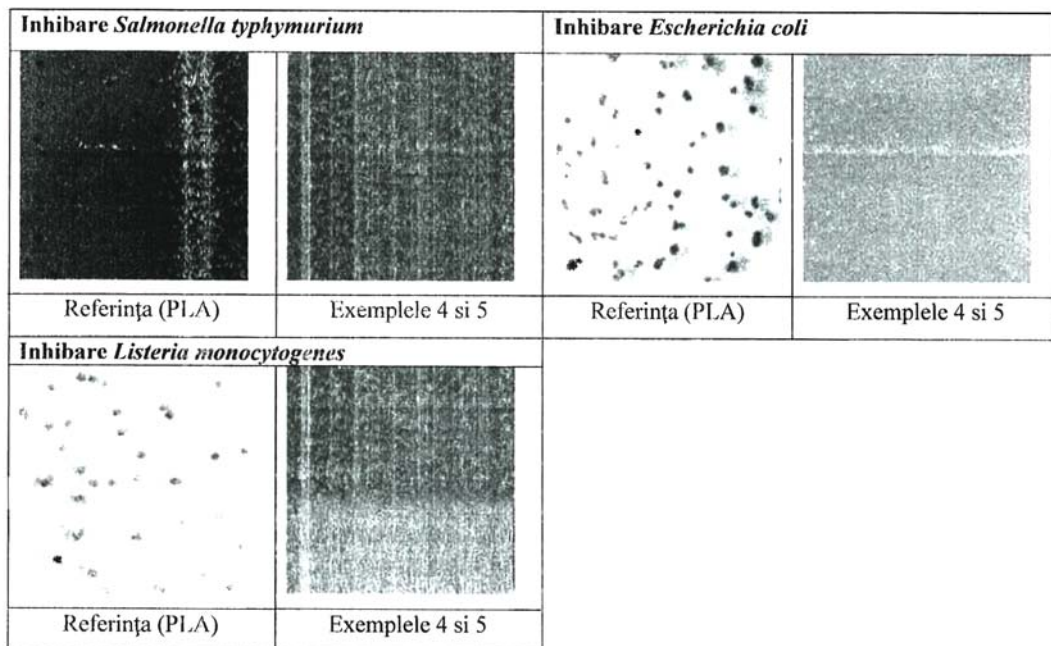


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 90/2018