



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00948**

(22) Data de depozit: **03/12/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2019** BOPI nr. **9/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2015 BOPI nr. **12/2015**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **STĂNESCU PAUL OCTAVIAN,
STR.VATRA DORNEI NR.9, BL.E 4, SC.2,
AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA
NR. 43, BL. 012, SC. B, ET. 1, AP. 62,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **RÂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3,
BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CĂȘĂRICĂ ANGELA,
STR.POPA STOICA FĂRÇAȘ 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;**
• **GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI
NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 2005/0063939 A1; US 6337198 B

(54) **COMPOZITE POLIMERICE PE BAZĂ
DE POLIHIDROXIBUTIRAT ȘI CELULOZĂ BACTERIANĂ
CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ, ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTORA**



RO 130767 B1

1 Invenția se referă la o compoziție pe bază de polihidroxi-butirat și celuloză bacteriană
2 cu aplicații în ingineria tisulară și la un procedeu de obținere a acesteia. Se cunosc din
3 literatura de specialitate compozite polimerice de uz medical. Ponderea utilizării polimerilor
4 pentru obținerea de dispozitive și echipamente medicale este: policlorura de vinil - 27%, poli-
5 stiren - 18%, polietilenă de joasă densitate - 17%, polietilenă de înaltă densitate - 13%, poli-
6 propilena - 10%), policarbonat/ester - 8%, cauciuc siliconic - 5%; biomaterialele cu proprietăți
7 dirijate reprezintă numai 2%, (**Dumitriu S. și Dumitriu D., Polymeric Biomaterials, 99-143**
8 **ed. Marcel Dekker, New York, 1993**).

9 Se cunosc, din brevetul **US 4433072 A**, compoziții polimerice pe baza unui amestec
10 de policlorură de vinil și poliuretane cu grupe amine terțiare și heparină. Pentru obținerea
11 acestor compoziții sunt necesare substanțe chimice, operații de filtrare, degazare, uscare.
12 Se cunoaște, din brevetul **US 4563490 A**, compozitul polimeric care cuprinde între 1...99%
13 un polimer hidrofiliac sau copolimer pe bază de esteri acrilici sau metacrilici, între 1...99%
14 colagen fibrilar și până la 2,5% un agent de reticulare (trimetilolurea, formaldehidă, acet-
15 aldehidă, glutaraldehidă, dialdehidă a amidonului, glioxal și săruri cromice). Compoziția mai
16 poate cuprinde compoziții biologice active și alte materiale auxiliare, cum ar fi plastifianti
17 și/sau agenți de umplutură. Prepararea compoziției are loc prin dispersarea colagenului
18 fibrilar într-o soluție sau o dispersie puternic gonflată cu un polimer sau copolimer hidrofiliac
19 într-un agent liotrop (acizi carboxilici diluați, amestecuri apoase puternic acide de etanol
20 și metanol (pH 2...3), soluții apoase concentrate de săruri liotropice, sub agitare la o tempe-
21 ratură mai mică de 37°C) urmată de îndepărtarea agentului liotrop.

22 Se cunoaște, din brevetul **US 4427808 A**, materialul polimeric compozit pentru apli-
23 cații biologice și medicale, pe bază de poli(2-hidroxi-etil metacrilat), colagen și 0,1%
24 glutaraldehidă ca agent de reticulare.

25 Se cunosc numeroase compoziții utilizate pentru ingineria tisulară. Astfel: compoziții
26 pe bază de poli(3-hidroxi-butirat-co-4-hidroxi-valerat) și celuloza bacteriană împreună cu un
27 co-solvent, acid trifluoroacetic (**Cai Zhijiang, Hou Chengwei, Yang Guang, Poly(3-**
28 **hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffold:**
29 **Preparation, characterization and biocompatibility evaluation, Carbohydrate Polymers**
30 **87 (2012) 1073-1080**), hidroxiapatita (HA) și poli(3-hidroxi-butirat) și poli(3-
31 hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-hexanoat; **Ya-Wu Wang, Qiong Wu, Jinchun Chen, Guo-**
32 **Qiang Chen, Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of**
33 **hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone**
34 **reconstruction, Biomaterials 26 (2005) 899-904**).

35 Se cunosc, din brevetul **US 6555123 B2**, compoziții pe bază de polihidroxi-alcanoati,
36 sub formă de soluții care pot fi administrate în corpul uman împreună cu un agent de aglo-
37 merare sau viscosupliment (de exemplu intradermic, subcutanat, intramuscular și sub-
38 mucoasă) într-o cantitate terapeutică pentru a furniza efecte cosmetice, protetice sau de
39 calmare a durerii.

40 Aceste compoziții pot fi injectate în țesuturile osoase, cum ar fi oase, cartilajii,
41 tendoane și mușchi pentru a facilita refacerea sau regenerarea țesuturilor.

42 Se cunoaște, din brevetul **US 20140066587 A1**, utilizarea poli(1,8-octandiol-co-citric
43 acid) pentru obținerea scaffoldurilor poroase, prin dizolvarea pre-polimerului în dioxin pentru
44 a forma o soluție de 25%, și apoi adăugarea unei sări ca agent porogen.

45 Se cunoaște, din brevetul **US 6103255 A**, prepararea scaffoldurilor prin utilizarea
46 compozițiilor de tirozin poli(DTE carbonat) care au fost dizolvate într-un amestec de 3 ml
47 1,4-dioxan și 0,3 ml apă.

RO 130767 B1

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unor compozite poli-merice pe bază de polihidroxibutirat, tributil citrat și celuloză bacteriană care prezintă caracte-ristici fizico-mecanice și biologice adecvate utilizării în ingineria tisulară și la un procedeu de obținere a acestora.	1
Compozitele conform invenției sunt constituite din amestecuri formate din părți de greutate de: 79...80% PHB, 16% TBC și 1...2% celuloza bacteriană.	3
Procedeu de obținere a compozitelor polimerice, conform invenției, constă din reali-zarea unui amestec fizic între pulberea de PHB și plastifiantul TBC, care se lasă circa 4 h la maturare și apoi amestecarea componentilor are loc în topitură, în plastograful Brabender, la o temperatură de 170...180°C, timp de 10...12 min, cu o viteză a șnecurilor de 40...60 rpm, iar ca agent proogen se utilizează 3% NaCl de uz farmaceutic.	5
Invenția, conform descrierii de mai sus, prezintă următoarele avantaje:	7
- se utilizează materiale prietenoase mediului;	9
- se obțin materiale biocompatibile, caracterizate prin biocompatibilitate <i>in vitro</i> și metode fizico-chimice descrise în Farmacopeea Europeană;	11
- procedeul de obținere a compozițiilor cu aplicații în ingineria tisulară are loc prin prelu-crarea în topitură, fără un consum energetic mare, pe utilaje specifice polimerilor tradiționali;	13
- compozitele polimerice obținute prezintă caracteristici fizico-mecanice, de biocom-patibilitate și biodegradabilitate adecvate utilizării propuse.	15
Biocompozitele prezintă rezistență la tracțiune, alungire la rupere, biocompatibilitate, ceea ce le recomandă pentru obținerea scaffoldurilor. Invenția de față oferă o soluție simplă și economică pentru obținerea de compoziții polimerice biodegradabile și bioresorbabile, cu proprietăți fizico-mecanice îmbunătățite.	17
Este cunoscut faptul că polimerii sunt utilizați pe scară largă în domeniul medical pentru un număr foarte mare de aplicații: pungi de sânge, tuburi, sonde, canule, catetere, transfuzie de sânge și perfuzie, crearea de rinichi și plămâni artificiali etc. Utilizarea poli-merilor pe bază de clorură de vinil s-a dezvoltat destul de bine datorită diverselor avantaje asociate cu natura acestor produse (în special costul lor moderat); din nefericire, policlorura de vinil în sine nu este suficient de flexibilă, și atunci se realizează plastifierea (în special cu ftalați). În acest caz, atunci când polimerul plastifiat se află în contact cu lichidele biologice există pericolul de exsudație a plastifianților și acumularea acestora în corpul uman.	19
Clasa de polimeri biodegradabili, polihidroxicanoați (PHA), reprezintă un candidat atractiv pentru înlocuirea materialelor plastice pe bază de petrol în multe aplicații. În ultimul deceniu, mulți cercetători au examinat biodegradabilitatea și biocompatibilitatea PHA în sisteme de culturi celulare sau animale. Rezultatele sugerează faptul că PHA este un mate-rial adecvat pentru fabricarea de dispozitive medicale resorbabile, cum ar fi: suturi, plase, implanturi și scaffolduri pentru ingineria tisulară (Christopher J. Brigham and Anthony J. Sinskey, Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry, International Journal of Biotechnology for Wellness Industries, 2012, 1, 53-60).	21
Investigațiile în ingineria tisulară se ocupă în principal cu dezvoltarea de materiale pentru regenerarea țesuturilor osoase. Designul structurilor poroase tridimensionale (scaffolduri) constituie una dintre problemele majore în această direcție. Scaffoldurile trebuie să îndeplinească cerințele de biocompatibilitate, să susțină creșterea noului țesut și să ofere stabilitate mecanică până la finalizarea acestuia. Există mai multe criterii a căror îndeplinire este necesară pentru crearea de scaffolduri. Pentru a oferi posibilitatea de regenerare a țesuturilor, structura de scaffold trebuie să asigure creșterea tridimensională a țesutului și să stimuleze creșterea într-o formă stabilă. De asemenea, aceste scaffolduri trebuie să fie realizate din materiale biocompatibile, cu biodegradabilitate sau bioresorbabilitate controlată.	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

1 Termenul de „biocompatibilitate” se referă la compoziții care sunt bine tolerate de organism
și nu cauzează o reacție inflamatorie adversă prelungită care să afecteze performanța sau
3 funcțiunea sa. Așa cum este utilizat aici, termenul "bioresorbabil" se referă la compoziții care
se descompun în condiții fiziologice normale *in vivo* în componente care pot fi metabolizate
5 sau excretate. Pentru a asigura creșterea tridimensională a țesutului, structura matricei tre-
buie să posedă o rețea de macro (supra) pori. Mai mult decât atât, în timpul cultivării celulelor
7 *in vitro*, care are loc în afara unui organism viu, precum și în timpul creșterii țesuturilor, pre-
zența acestei structuri suport asigură acordarea neîngrădită a unui mediu nutritiv pentru
9 masa celulară. Scaffoldurile pot fi sub formă de plase, suporturi solide, tuburi, structuri
poroase și/sau hidrogeluri. După implantare, prezența unei structuri poroase asigură accesul
11 liber al sângelui la celule. În cele din urmă, scaffoldurile trebuie să stimuleze creșterea vase-
lor de sânge (angiogeneza) în interiorul rețelei de pori. În acest caz, este necesar ca diame-
13 trul minim al porilor să aibă dimensiunea mai mare decât 10 μm .

Atât polimerii sintetici, cât și cei naturali se utilizează pentru fabricarea de scaffolduri.
15 Printre polimerii sintetici care se utilizează în mod frecvent pentru crearea de scaffolduri
osoase se menționează: poli (acid α -hidroxicarboxilic), în mod special, poli (acid glicolic), poli
17 (acid lactic), și copolimerii acestora (poli (acid lactic_co_acid glicolic) (PMGAs)), precum și
policaprolactona, poli (3_hidroxi-butirat), poliortoesteri și polianhidride. Printre polimerii natu-
19 rali, cei mai utilizați pentru fabricarea scaffoldurilor fac parte: proteinele matricei extracelulare
(colagen și fibrină), precum și polizaharide, poli (acid hialuronic), chitosan și alginat. Acești
21 polimeri sunt considerați promițători datorită asemănării lor cu elemente naturale ale cito-
scheletului țesuturilor regenerate. Cu toate acestea, aplicarea lor este împiedicată de pro-
23 bleme de imunogenitate și de incapacitatea de a controla degradarea lor (**V. A. Korzhikov,**
E. G. Vlakh, and T. B. Tennikova, Polymers in Orthopedic Surgery and Tissue
Engineering: From Engineering Materials to Smart Biofunctionalization of a Surface,
25 **Polymer Science, Ser. A, 2012, Vol. 54, No. 8, pp. 585-601**). Cu toate acestea, există
cerințe pentru îmbunătățirea proprietăților mecanice ale acestor scaffolduri. Astfel, au fost
27 propuse materiale compozite poroase pe bază de polilactidă, care conduc la creșterea
osteoconductivității schelelor.
29

Celuloza microbiană (BC) este un biomaterial foarte flexibil care poate fi utilizat în tra-
31 tamentul plăgilor și arsurilor cronice, ca piele artificială sau pansamente, pentru obținerea
de vase artificiale, scaffolduri pentru ingineria tisulară. BC diferă de celuloza vegetală prin
33 puritatea sa superioară, cristalinitate, gradul de polimerizare și rezistența la tracțiune
(**Fernando G. Torres, Solene Commeaux and Omar P. Troncoso, Biocompatibility of**
Bacterial Cellulose Based Biomaterials, J. Funct. Biomater. 2012, 3, 864-878). De
35 asemenea, este biocompatibilă. BC prezintă o structură de rețea a fibrilelor tridimensionale
(3D), care este similară cu matricea extracelulară naturală (ECM) (**Shuai Peng, Yudong**
Zheng, Jian Wu, Yaxun Wu, Yanxuan Ma, Wenhui Song, Tingfei Xi, Preparation and
37 **characterization of degradable oxidized bacterial cellulose reacted with nitrogen**
dioxide, Polym. Bull. (2012) 68:415-123. DOI 10.1007 /s00289-011-0550-8).
39

41 Se știe că obținerea compozițiilor pentru ingineria tisulară se bazează pe procedeele
clasice de lucru cu solvenți (de multe ori foarte toxici).

43 Dezavantajele compozițiilor de mai sus se referă la utilizarea solvenților, a agenților
de reticulare toxici care conduc la citotoxicitatea produsului destinat domeniului medical.

45 Compozitele polimerice prezentate în invenție înlătură dezavantajele menționate mai
sus prin aceea că se utilizează materiale prietenoase mediului, precum polihidroxi-butirat
47 (PHB), celuloza bacteriană (BC), tributil citrat (TBC) și resurse indigene, cum ar fi NaCl de
uz medical, biocompatibile, testate conform Farmacopeei Europene în vigoare, care nu pun

RO 130767 B1

În pericol sănătatea pacienților și a utilizatorilor. Compozitele polimerice conform invenției se obțin prin amestecarea în topitură într-un plastograf Brabender, la o temperatură cuprinsă între 170...180°C, turație de 40...60 rot/min și un timp de amestecare între 10...12 min. Selecția materialelor și cantităților acestora au o influență deosebită asupra proprietăților fizico-mecanice și biologice ale acestora.

Pulberea de polihidroxitiriat (PHB), furnizată de Firma Biomer, Germania prezintă o dimensiune a particulelor cuprinsă între 0,5...50 μm.

Plastifiantul tributil citrat (TBC), 97,0% (ALDRICH) este caracterizat prin: aspect lichid, puritate (GC) 99,9%, indice de refracție 1. Din literatură se cunoaște că utilizarea unui plastifiant în concentrație de 20% față de matricea polimerică asigură o plastifiere eficientă.

Celuloza bacteriană (BC), sintetizată de Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Chimico-Farmaceutică București este sub formă de membrană uscată care se macină ulterior pentru a obține o pulbere.

Compoziția polimerică pe bază de PHB și celuloză bacteriană, conform invenției, conținând 79...80% pulbere de PHB, 16% TBC și 1...2% BC biocompatibilă au fost preparate prin procesarea la cald, pe un Plastograf Brabender. Ca agent porogen s-au utilizat 3% NaCl de uz farmaceutic.

Procedeele de obținere a compoziției, conform invenției, constă în prelucrarea amestecului polimeric în topitură la o temperatură de 170...180°C, un timp de amestecare cuprins între 10...12 min, cu o viteză a șnecurilor de 40...60 rpm. Înainte de utilizare, pulberea de PHB a fost uscată la temperatura de 60°C, timp de 3 h. Înainte de utilizare, pulberea de BC a fost uscată la temperatura de 105°C, timp de 2 h. Mai întâi, se realizează un amestec fizic între pulberea de PHB și plastifiant (TBC), care se lasă circa 4 h la maturare. Urmează topirea acestui amestec la temperatura necesară, adăugarea BC și NaCl, apoi amestecarea până la înglobarea uniformă a ingredientelor în masa topiturii. Urmează presarea la cald, la temperatura de 170...175°C, timp de presare 3 min și presiunea de presare de 125 atm, pentru obținerea de plăci cu grosimea de 1 mm și filme cu grosimea de maximum 0,1 mm. Din plăcile și filmele obținute s-au prelevat epruvete standard pentru efectuarea testelor fizico-mecanice și biologice. NaCl din plăcile și filmele obținute a fost eliminată prin imersări succesive în apă distilată, pentru o perioadă totală de 96 h. Scaffoldurile obținute au fost uscate în aer timp de 24 h și apoi în vacuum pentru alte 24 h. Scaffoldurile rezultate au fost depozitate într-un excicator prevăzut cu vid, până la caracterizare.

În continuare, se prezintă două exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...5 care reprezintă:

- fig. 1, spectre ATR-FTIR pentru compozite pe bază de PHB și BC;

- fig. 2, curbe DSC pentru compozite pe bază de PHB și BC;

- fig. 3, absorbanta în UV/VIS a compozitelor PHB și BC;

- fig. 4, microfotografii SEM ale compozitelor pe bază de PHB și BC;

- fig. 5, imagine de microscopie în fluorescență în care se evidențiază nucleii marcați fluorescent cu DAPI ai celulelor 3T3-L1 însămânțate pe suprafața compozitelor polimerice, la 24 h și la 5 zile de la cultivare.

Exemplul 1

Compoziția polimerică [(PHB:TBC)_BC1] compusă din polihidroxitiriat, tributil citrat și celuloză bacteriană, conform tabelului 1:

Tabelul 1

Cod rețetă	Compoziție, % g			
	PHB, % g	Tributil citrat,% g	Celuloză bacteriană, % g	NaCl % g
(PHB:TBC)_BC1	80	16	1	3

RO 130767 B1

Pulberea de PHB și BC se usucă în prealabil. PHB și plastifiantul se maturează la cald, apoi se omogenizează în topitură. Se introduce BC și se continuă amestecarea până la dispersia uniformă a agentului de umplură în matricea polimerică. NaCl se adaugă în scopul de creare a porilor în structura materialului. Urmează presarea amestecului, eliminarea NaCl și prelevarea epruvetelor.

Exemplul 2

Compoziția polimerică [(PHB:TBC)_BC2] compusă din polihidroxitbutirat, tributil citrat și celuloza bacteriană, conform tabelul 2:

Tabelul 2

Cod rețetă	Compoziție, % g			
	PHB, % g	Tributil citrat, % g	Celuloză bacteriană, %g	NaCl % g
(PHB:TBC)_BC2	79	16	2	3

PHB se amestecă cu TBC, apoi are loc omogenizarea în topitură, la cald și introducerea BC. Urmează presarea amestecului, eliminarea NaCl și prelevarea epruvetelor.

Pentru obținerea de plăci și filme, amestecurile obținute în exemplele 1 și 2 au fost presate la temperatura de 170...180°C, timp de presare 3...5 min. Din plăcile obținute prin presare la cald, s-au prelevat epruvete, care ulterior au fost testate din punct de vedere al proprietăților fizico-mecanice, de biocompatibilitate și biodegradare. În continuare, se prezintă metodele de caracterizare și rezultatele testelor.

Caracterizarea compozițiilor

Pentru caracterizarea compoziției se folosesc metodele fizico-chimice și biocompatibilitate *in vitro* conform FARMACOPEEI EUROPENE, calorimetria diferențială de baleiaj (DSC), FT-IR, determinarea proprietăților de tracțiune și investigații morfologice SEM. Pentru comparație se folosește o rețetă de PHB plastifiată, codificată PHB.

Metode folosite în studiul tehnic

1. Comportarea la prelucrarea în topitură

Amestecarea în topitură este o tehnică fără utilizare de solvent și este compatibilă cu metodele de procesare ale polimerilor tradiționali.

Tabelul 3

Caracteristicile procesării în topitură pentru biocompozitele realizate

Compoziție	TQ _{1min} (Nm)	TQ _{4min} (Nm)	TQ _{10min} (Nm)
PHB	29,5	20	11
(PHB:TBC)_BC 1	36	22	12
(PHB:TBC)_BC 2	34	23	12

unde:

TQ_{1min} reprezintă cuplul de torsiune după 1 min de procesare în topitură;

TQ_{4min} reprezintă cuplul de torsiune după 4 min de procesare în topitură;

TQ_{10min} reprezintă cuplul de torsiune după 10 min de procesare în topitură.

2. Investigarea structurii chimice prin spectroscopie FTIR-ATR

Spectrele FTIR s-au înregistrat pe echipamentul FTLA 2000-104, ABB Canada, prin tehnica ATR. Domeniul de scanare a fost cuprins între 750 și 1900 cm⁻¹, la rezoluție de 2 cm⁻¹, spectrele înregistrate reprezentând media a 4 scanări succesive.

RO 130767 B1

3. Evaluarea proprietăților de tracțiune ale compozițiilor pe bază de PHB și BC	1
Testele de tracțiune au fost realizate conform ISO 527 pe un dispozitiv de încercări mecanice INSTRON 2519-107 cu o celulă de forță de 5 kN. Viteza de lucru a fost setată la 1 mm/min. Dimensiunile epruvetelor (cf. ISO 527) au fost: lungime totală 115 mm; lățimea părții înguste 6 mm; lățimea la extremități 25 mm.	3
4. Calorimetrie Diferențială de Baleiaj (DSC)	5
Experimentele DSC au fost efectuate pe echipamentul DSC 827 ^e METTLER TOLLEDO, pornind de la temperatura camerei până la temperatura de 350°C, cu viteza de 10°C/min. S-au folosit creuzete de Al de 40 μl. Determinările s-au efectuat în atmosferă de aer. S-au obținut temperatura de topire (T_m), temperatura de degradare (T_d) și căldura de fuziune (ΔH_f). Gradul de cristalinitate al PHB s-a calculat folosind ecuația 1 (Chan et al. 2011) ⁸ :	7
	9
	11
	13
$PHB - X_c = \frac{\Delta H_f}{(1-w)\Delta H_{100\% PHB}} \times 100\%$	15
unde:	
ΔH_f este entalpia la topire a probei (J/g);	17
$\Delta H_{100\%,PHB}$ este entalpia pentru PHB 100% cristalinitate (146 J/g) (Sadi et al., 2010) ⁹ ;	
(1 - w) este fracția în greutate a polimerului din biocompozite.	19
5. Analize fizico-chimice pe extract apos	
Analizele fizico-chimice pe extractul apos, conform Farmacopeei Europene au constatat în următoarele determinări:	21
- substanțe reducătoare;	23
- aciditate;	
- alcalinitate;	25
- absorbantă în UV/VIS;	
- reziduu la evaporare.	27
Pentru prepararea extractului apos se introduc 25 g din materialul de analizat într-un balon de sticlă borosilicată. Se adaugă 500 ml apă distilată pentru preparate injectabile și se acoperă gâtul balonului cu un vas de sticlă borosilicată. Se încălzește în autoclav, la temperatura de 121 ± 2°C, timp de 20 min, se lasă să se răcească și se decantează soluția. Se completează volumul până la 500 ml cu apă distilată. În paralel cu prepararea extractului apos se efectuează o probă martor, în aceleași condiții ca extractul apos, dar fără materialul de analizat.	29
	31
	33
6. Evaluarea biocompatibilității <i>in vitro</i>	35
Biocompatibilitatea materialelor a fost evaluată în raport cu preadipocitele murine aparținând liniei celulare 3T3-L1 (ATCC, cod CL-173 TM). În acest sens, au fost investigate (i) distribuția celulelor pe suprafața materialelor prin studii de microscopie în fluorescență, și (ii) viabilitatea și potențialul proliferativ al acestor celule prin studii cantitative de spectrofotometrie, la 24 h și 5 zile după însămânțarea lor pe materialele testate.	37
	39
Modelul celular <i>in vitro</i> :	41
Celulele 3T3-L1 au fost propagate în mediu de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) <i>low glucose</i> (Sigma-Aldrich, cod D2902), suplimentat cu 3,5 g glucoză, 1,5 g NaHCO ₃ , 1% antibiotic-antimicotic și 10% ser de vițel nou-născut (Gibco, cod 26010074), la 37°C, într-o atmosferă umedă de 5% CO ₂ .	43
	45
Pentru realizarea testelor mai sus menționate, materialele de testat au fost sterilizate la UV timp de ~ 6 h pe fiecare parte, iar celulele au fost însămânțate pe suprafața lor la o densitate inițială de 3 x 10 ³ celule/cm ² .	47

RO 130767 B1

1 Distribuția celulelor pe suprafața materialelor:

2 La 24 h și 5 zile după însămânțare, celulele 3T3-L1 au fost fixate cu p-formaldehidă
3 4%, timp de 20 min și spălate cu tampon PBS. Membrana celulară a fost apoi permeabilizată
4 prin incubare, timp de 1 h, la temperatura camerei, cu o soluție de BSA 2% și Triton x 100
5 0,1% în tampon PBS. După o nouă etapă de spălare, probele au fost incubate la temperatura
6 camerei, timp de 15 min în 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (2 μg/ml în PBS) pentru marca-
7 rea fluorescență a nucleilor și apoi inspectate la microscopul inversat Olympus IX71;
8 imaginile au fost captate cu Softul CellF.

9 Testul MTT:

10 Viabilitatea și potențialul proliferativ al celulelor în contact cu compozițiile testate au
11 fost evaluate prin testul spectrofotometric MTT. Tratarea celulelor cu o soluție de [bromură
12 de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] MTT (Sigma-Aldrich, cod M5655) permite
13 evaluarea metabolismului oxidative și a răspunsului la factori externi care pot avea un efect
14 pozitiv sau negativ asupra viabilității. Testul colorimetric cantitativ MTT se bazează pe
15 reducerea unei sări de tetrazoliu, de culoare galbenă (MTT) la un formazan insolubil în
16 mediul de cultură, de culoare albastru-violet. Reacția de reducere este realizată de enzime
17 mitocondriale (în special succinat dehidrogenază) și este un indice al integrității celu-
18 lare/mitocondriale. Formazanul poate fi solubilizat cu izopropanol sau DMSO, iar densitatea
19 optică a soluției astfel obținute poate fi evaluată spectrofotometric la 550 nm.

20 Astfel, la 24 h și 5 zile de la însămânțarea celulelor pe materialele de testat mediul
21 de cultură a fost schimbat cu o soluție de MTT, 1 mg/ml, iar probele astfel obținute au fost
22 incubate în condiții standard de cultura încă 4 h. După solubilizarea cristalelor de formazan
23 în DMSO, timp de 30 min, a fost evaluată densitatea optică a soluției obținute, la o lungime
24 de undă de 550 nm, la spectrofotometrul TECAN, în plăci cu 96 de godeuri.

25 7. Caracterizarea morfologică a compozițiilor obținute

26 Analiza morfologiei și microstructurii materialelor a fost realizată prin microscopie
27 electronică de baleiaj (SEM) pe compozițiile polimerice acoperite cu un strat fin de Aur.
28 Probele au fost înghețate și tăiate în azot lichid pentru evidențierea structurii interne. Aparatul
29 folosit a fost un dispozitiv SEM QUANTA INSPECT F echipat cu tun de emisie electroni
30 (FEG) cu rezoluție 1,2 nm și spectrometru EDS.

31 *Rezultate și discuții*

32 1. Comportarea la prelucrarea în topitură

33 Compozitele polimerice pe bază de PHB și BC nu prezintă dificultate la procesarea
34 în topitură.

35 Din spectrele FTIR se observă intensitatea legăturii C=O cu vibrația de întindere la
36 1718 cm⁻¹ specifică legăturilor de tip ester. Benzile de absorbție specifice celulozei au fost
37 observate la 1454 cm⁻¹ (CH₂ de deformare) și în regiunea 1379...1043 cm⁻¹ caracteristice
38 grupării C-O de deformare.

39 Curbele DSC obținute pentru biocompozitele studiate sunt prezentate în fig. 2.

40 Tabelul 4

Parametri DSC pentru probele studiate

43 Proba	ΔH_f , J/g	T_m , °C	T_d , °C	X_c , %
44 PHB	57,15	171,92	294,18	39,14
45 (PHB:TBC)_BC1	58,05	171,61	281,00	40,16
(PHB:TBC)_BC2	50,79	170,54	287,31	35,49

RO 130767 B1

Rezultatele obținute în urma caracterizării fizico-chimice sunt prezentate în tabelul 5 și fig. 4

Tabelul 5

Caracterizarea fizico-chimică a compozitelor pe bază de PHB și BC

Caracteristică	U.M.	Probă			Valoare impusă cf. Farmacopeei Europene
		PHB (Martor)	(PHB:TBC)_BC1	(PHB:TBC)_BC2	
Substanțe reducătoare	ml Na ₂ S ₂ O ₇ 0,01 M	0,20	1,1	0,7	Max. 2
Absorbanta în UV-VIS, λ = 250...310 nm	%	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Aciditate	ml NaOH 0,01 M	1,2	1,2	1,1	Max. 1,5
Alcalinitate	ml HCl 0,01 M	0,62	0,72	0,85	Max. 1
Reziduu la evaporare	g	0,0015	0,0021	0,0034	Max. 0,0075

Tabelul 6

Proprietăți fizico-mecanice ale compozițiilor PHB și BC

Proba	Rezistența la tracțiune, MPa	Alungirea la rupere, %	Modul elasticitate, MPa
PHB	9	3	1250
(PHB:TBC)_BC1	12	1,9	1310
(PHB:TBC)_BC2	15	1,5	1400

Morfologia compozițiilor pe bază de PHB și celuloza bacteriană a fost evidențiată prin analiza SEM. Imaginile sunt prezentate în fig. 5.

A,B-PHB plastifiat martor, C,D- (PHB:TBC)_BC_1, E,F- (PHB:TBC)_BC_2

Imaginile din fig. 5A și B evidențiază morfologia poli(3-hidroxi-butiratului) plastifiat cu tributil citrat. Se observă aglomerări de granule/particule PHB. Fig. 5C, D, E, F evidențiază compozițiile pe bază de PHB și BC la diferite mărimi unde particulele de poliester sunt întrepătrunse în nanostructura celulozei sau acoperă suprafața nanofibrilelor de celuloză.

Evaluarea biocompatibilității in vitro a compozițiilor obținute

Distribuția celulelor pe suprafața materialelor:

Imaginile de microscopie în fluorescență arată că, atât la 2 de ore cât și la 5 zile de la însămânțare, pe suprafața compozițiilor polimerice au existat celule (fig. 1). Mai mult decât atât, la 5 zile, numărul nucleilor marcați fluorescent este mai mare decât la 24 h, ceea ce sugerează ca preadipocitele 3T3-L1 au proliferat pe suprafața materialelor.

Testul MTT:

Observațiile calitative mai sus menționate au fost confirmate și cantitativ prin cuantificarea spectrofotometrică a viabilității celulelor la 24 h și 5 zile de la însămânțare și a potențialului proliferativ la 5 zile de cultivare. Astfel, datele obținute prin testul MTT sunt prezentate în fig. 2 și arată că preadipocitele murine au supraviețuit pe suprafața materialelor testate și au proliferat timp de 5 zile. În plus, acest test cantitativ, a permis identificarea unor diferențe de viabilitate a celulelor 3T3-L1 pe cele 3 probe testate, astfel că pe proba I viabilitatea a fost cea mai scăzută atât la 24 h cât și la 5 zile, iar pe proba III cea mai crescută. Cu toate acestea, nu au fost identificate diferențe de proliferare între probe.

RO 130767 B1

1 *Concluzii finale*

3 S-au realizat două recepturi polimerice pe bază de polihidroxibutirat, tributil citrat și
celuloză bacteriană. Recepturile au fost testate din punct de vedere al proprietăților fizico-
5 mecanice, fizico-chimice și de biocompatibilitate. Recepturile (PHB:TBC)_BC1 și
(PHB:TBC)_BC2 prezintă o bună biocompatibilitate față de linia de celule preadipocite. Astfel
7 că pe proba I martor viabilitatea a fost cea mai scăzută atât la 24 h cât și la 5 zile, iar pe
proba (PHB:TBC)_BC2 cea mai crescută. Valorile prezentate în documentația tehnică indică
9 faptul că amestecurile polimerice realizate conform invenției îndeplinesc cerințele fizico-
mecanice și de biocompatibilitate impuse dispozitivelor medicale din materiale plastice
pentru utilizarea în domeniul ingineriei tisulare.

RO 130767 B1

Revendicări

- | | |
|---|----------|
| | 1 |
| 1. Compozite polimerice pe bază de polihidroxitirac și celuloza bacteriană pentru aplicații în ingineria tisulară, caracterizate prin aceea că sunt constituite din amestecuri formate din părți de greutate de: 79...80% PHB, 16% TBC și 1...2% celuloză bacteriană. | 3
5 |
| 2. Compozite polimerice conform revendicarea 1, caracterizate prin aceea că sunt constituite din amestecuri formate din procente în greutate de: 80% PHB, 16% TBC, 1% celuloză bacteriană și 3% NaCl. | 7 |
| 3. Compozite polimerice conform revendicarea 1, caracterizate prin aceea că sunt constituite din amestecuri formate din procente în greutate de 79% PHB, 16% TBC, 2% celuloza bacteriană și 3% NaCl. | 9
11 |
| 4. Procedul de obținere a compozitelor polimerice, caracterizat prin aceea că mai întâi se realizează un amestec fizic între pulberea de PHB și plastifiantul TBC, care se lasă circa 4 h la maturare și apoi amestecarea componentelor are loc în topitură, în plastograful Brabender, la o temperatură de 170...180°C, timp de 10...12 min, cu o viteză a șnecurilor de 40...60 rpm, iar ca agent porogen se utilizează 3% NaCl de uz farmaceutic. | 13
15 |

(51) Int.Cl.

C08G 63/06 (2006.01);

C08L 67/04 (2006.01)

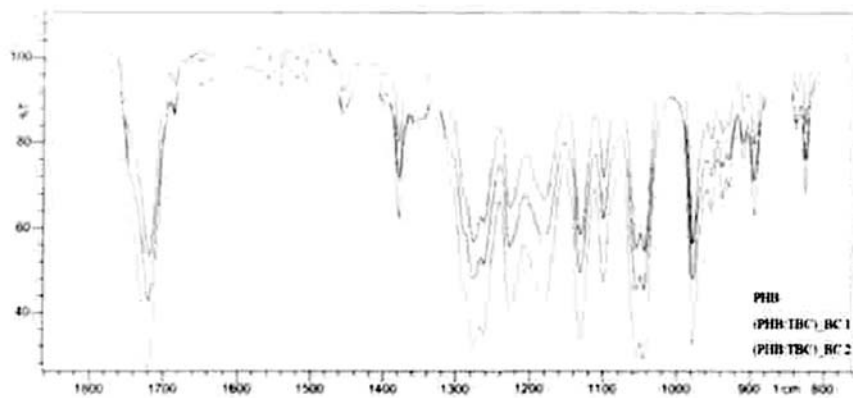


Fig. 1

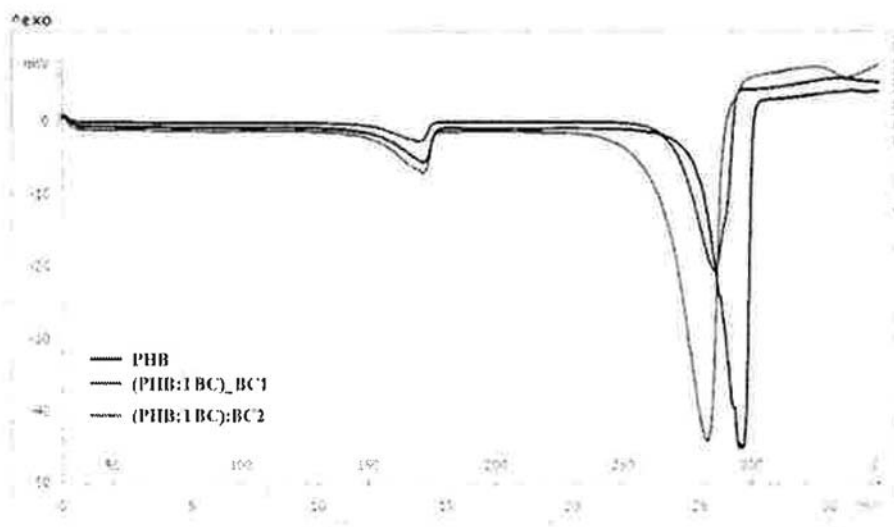


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C08G 63/06 (2006.01);

C08L 67/04 (2006.01)

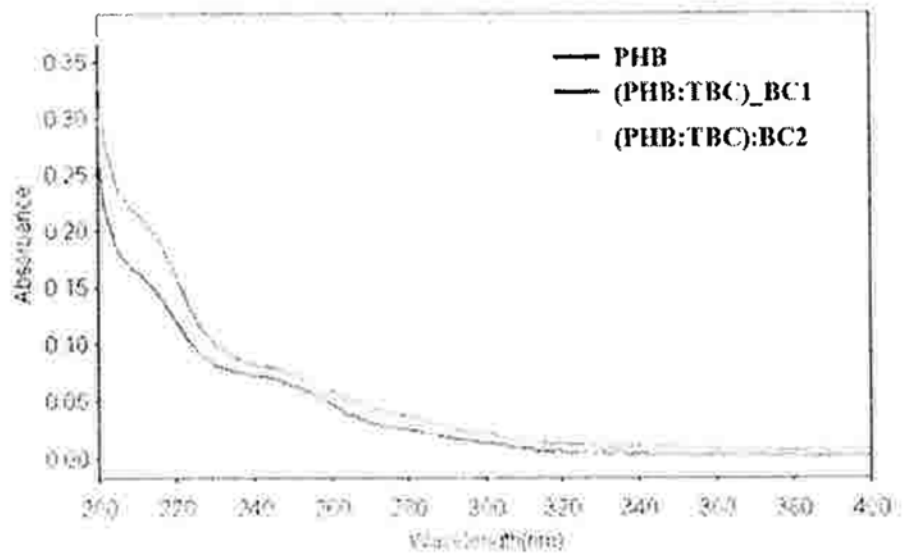


Fig. 3

(51) Int.Cl.

C08G 63/06 (2006.01),

C08L 67/04 (2006.01)

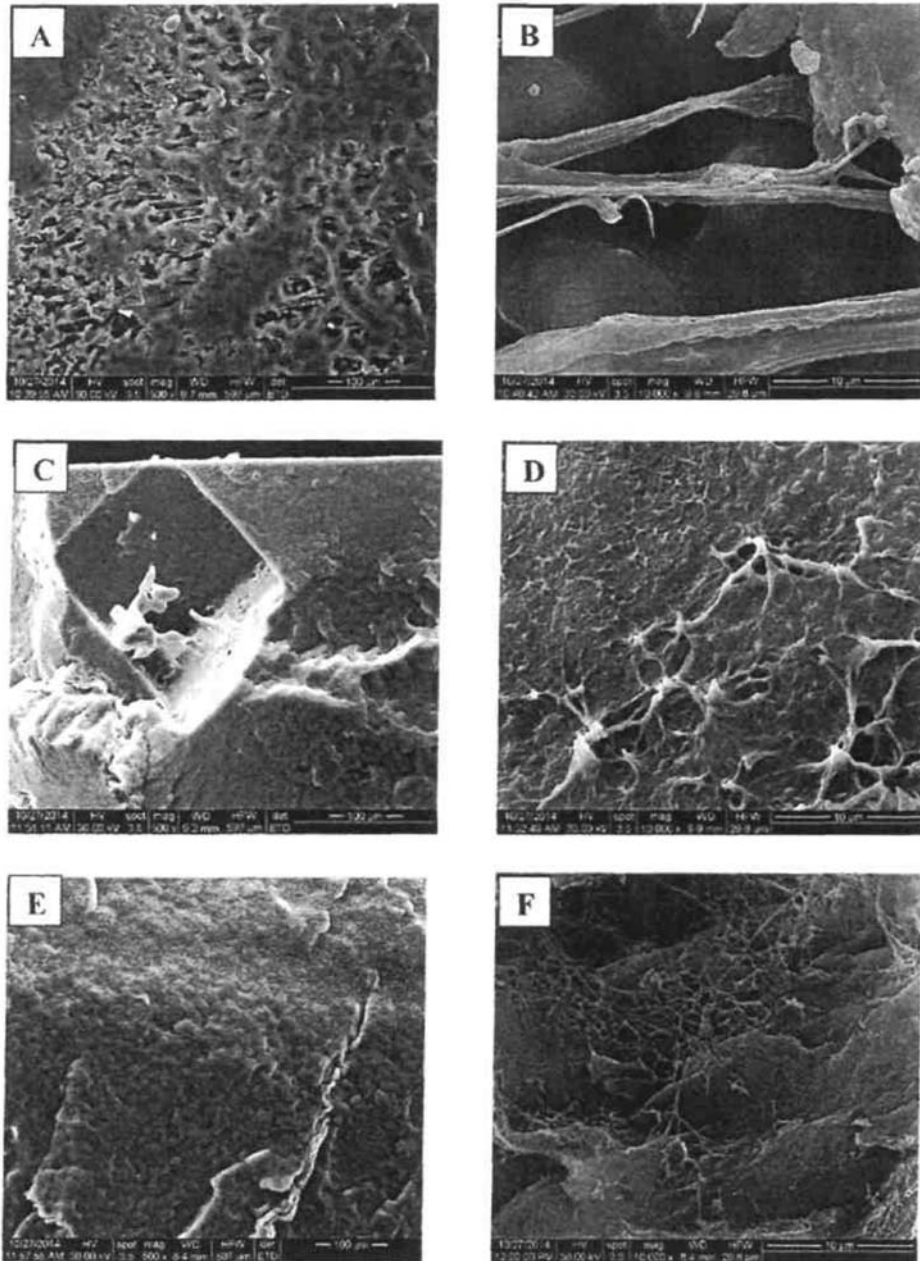


Fig. 4

(51) Int.Cl.

C08G 63/06 (2006.01);

C08L 67/04 (2006.01)

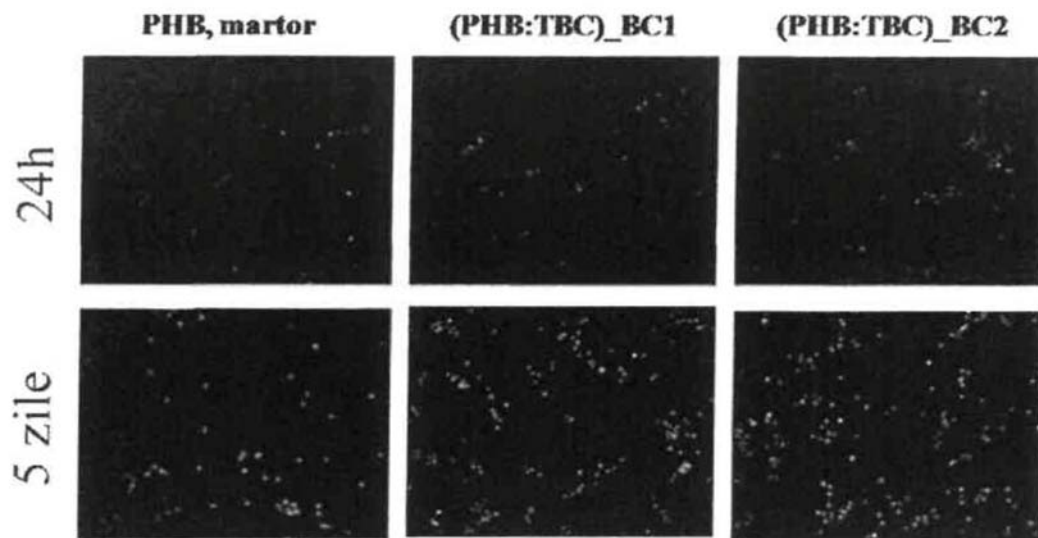


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 398/2019