



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

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

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

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

(72) Inventatori:  
• **STĂNESCU PAUL OCTAVIAN,  
STR.VATRA DORNEI NR.9, BLE 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.A, AP.2, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, 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;**  
• **GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI  
NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE POLIHIDROXIBUTIRAT ȘI  
CELULOZĂ BACTERIANĂ CU APLICAȚII ÎN INGINERIA  
TISULARĂ, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTEIA**

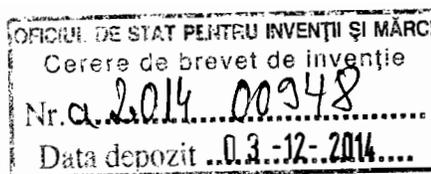
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție polimerică pentru aplicații tisulare, și la un procedeu pentru obținerea acesteia. Compoziția conform invenției este un amestec format din polihidroxibutirat, celuloză bacteriană și tributil citrat. Procedeu conform invenției constă în amestecarea componentelor într-un plastograf la o

temperatură de 170...180°C, timp de 10 min, cu o viteză a șnecurilor de 40 rpm, în prezență de NaCl de uz farmaceutic, ca agent porogen.

Revendicări: 4  
Figuri: 6





## COMPOZITIE PE BAZA DE POLIHIDROXIBUTIRAT SI CELULOZA BACTERIANA CU APLICATII IN INGINERIA TISULARA SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

Inventia se refera la o compozitie pe baza de polihidroxitirac si celuloză bacteriana cu aplicatii in ingineria tisulara si la un procedeu de obtinere a acesteia. Compozitia, conform inventiei este constituita din polihidroxitirac, celuloza bacteriana si tributul citrat, suma componentelor fiind de 100 % in greutate. Procedul conform inventiei consta din amestecarea componentelor intru-un plastograf, la o temperatura cuprinsa intre 170...180 °C, turatie cuprinsa intre 40...60 rot/min. si un timp de amestecare intre 10...12 min.

Compozitele polimerice pentru aplicatii in ingineria tisulara sunt caracterizate prin aceea **ca sunt constituite** din amestecuri cu parti de greutate de: 75...76 % PHB, 18...19 % TBC și 1...2 % celuloza bacteriana; compozitele se obtin prin amestecarea componentelor in topitura, in plastografu Brabender, la o temperatura de 170...180 °C, un timp de 10 min., cu o viteza a snecurilor de 40 rpm; ca agent porogen se utilizeaza 3...5 parti greutate NaCl de uz farmaceutic.

Se cunosc din literatura de specialitate compozite polimerice de uz medical. Ponderea utilizării polimerilor pentru obținerea de dispozitive și echipamente medicale este: policlorura de vinil - 27%, polistiren - 18%, polietilenă de joasă densitate - 17%, polietilenă de înaltă densitate - 13%, polipropilena - 10%, policarbonat/ester - 8%, cauciuc silionic - 5%; biomaterialele cu proprietăți dirijate reprezintă numai 2% <sup>1</sup>.

Se cunosc din brevetul **US 4433072 A** compozitii polimerice pe baza unui amestec de policlorura de vinil si poliuretan cu grupe amine terciare si heparina. Pentru obtinerea acestor compozitii sunt necesare substante chimice, operatii de filtrare, degazare, uscare.

Se cunoaste din brevetul **US 4563490 A** compozitul polimeric care cuprinde intre 1-99 % un polimer hidrofilic sau copolimer pe baza de esteri acrilici sau metacrilici, intre 1-99 % colagen fibrilar si pana la 2,5 % un agent de reticulare (trimetilolurea, formaldehida, acetaldehida, glutaraldehida, dialdehida a amidonului, glioxal si saruri cromice). Compozitia mai poate cuprinde compounduri biologic active si alte material auxiliare, cum ar fi plastifianti si/sau agenti de umplutura. Prepararea compozitiei are loc prin dispersarea colagenului fibrilar intr-o solutie sau o dispersie puternic gonflata cu un polimer sau copolimer hidrofilic intr-un agent liotrop (acizi carboxilici diluati, amestecuri apoase puternic acide de etanol si metanol (pH

<sup>1</sup> Dumitriu S. and Dumitriu D., *Polymeric Biomaterials*, 99 – 143 ed. Marcel Dekker, New York, 1993.

2-3), solutii apoase concentrate de saruri liotropice, sub agitare la o temperatura mai mica de 37 °C) urmata de indepartarea agentului liotropic.

Se cunoaste din brevetul US 4427808 A materialul polimeric compozit pentru aplicatii biologice si medicale, pe baza de poli(2-hidroxietyl metacrilat), colagen si 0,1% glutaraldehida ca agent de reticulare.

Se cunosc numeroase compozitii utilizate pentru ingineria tisulară. Astfel: compozitii pe baza de poli(3-hidroxi butirat-co-4-hidroxi valerat) si celuloza bacteriana impreuna cu un co-solvent, acid trifluoroacetic<sup>2</sup>, hidroxiapatita (HA) si poli(3-hidroxi butirat) si poli(3-hidroxi butirat-co-3-hidroxi hexanoat)<sup>3</sup>.

Se cunosc din brevetul US 6555123 B2 compozitii pe baza de polihidroxi alcanoati, sub forma de solutii care pot fi administrate în corpul uman impreuna cu un agent de aglomerare sau viscosupliment (de exemplu, intradermic, subcutanat, intramuscular și submucoasă) într-o cantitate terapeutică pentru a furniza efecte cosmetice, protetice sau de calmare a durerii. Aceste compozitii pot fi injectate în țesuturile osoase, cum ar fi oase, cartilajii, tendoane și mușchi pentru a facilita refacerea sau regenerarea țesuturilor.

Se cunoaste din brevetul US 20140066587 A1 utilizarea poli(1,8-octandiol-co-citric acid) pentru obtinerea scaffold-urilor poroase, prin dizolvarea pre-polimerului in dioxin pentru a forma o solutie de 25% si apoi adaugarea unei sari ca agent porogen.

Se cunoaste din brevetul US 6103255 A prepararea scaffold-urilor prin utilizarea compoundingurilor de tirozin poli(DTE carbonat) care au fost dizolvate într-un amestec de 3 ml 1,4-dioxan si 0.3 ml apa.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția consta in obținerea unei compozitii pe bază de polihidroxi butirat, tributil citrat și celuloză bacteriană care prezinta caracteristici fizico-mecanice si biologice adecvate utilizarii in ingineria tisulara și la un procedeu de obținere a acesteia. Biocompozitele obtinute in cadrul inventiei prezinta rezistenta la tractiune, alungire la rupere, biocompatibilitate...ceea ce le recomanda pentru obtinerea scaffold-urilor. Inventia de fata ofera o solutie simpla si economica pentru obtinerea de compozitii polimerice biodegradabile si bioresorbabile, cu proprietati fizico-mecanice imbunatatite.

<sup>2</sup> Cai Zhijiang, Hou Chengwei, Yang Guang, Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffold: Preparation, characterization and biocompatibility evaluation, Carbohydrate Polymers 87 (2012) 1073–1080.

<sup>3</sup> Ya-Wu Wang, Qiong Wu, Jinchun Chen, Guo-Qiang Chen, Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction, Biomaterials 26 (2005) 899–904.

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 polimerilor pe bază de clorură de vinil s-a dezvoltat destul de bine datorită diverselor avantajelor 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 sa (în special cu ftalati). În acest caz, atunci când polimerul plastifiat se află în contact cu lichidele biologice există pericolul de exsudare a plastifiantilor și acumularea acestora în corpul uman.

Clasa de polimeri biodegradabili, polihidroxiclcanoate (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 material adecvat pentru fabricarea de dispozitive medicale resorbabile, cum ar fi: suturi, plase, implanturi și scaffold-uri pentru ingineria tisulară<sup>4</sup>.

Investigațiile în ingineria tisulară se ocupă în principal cu dezvoltarea de materiale pentru regenerarea țesuturilor osoase. Designul structurilor poroase tridimensionale (scaffold-uri) constituie una dintre problemele majore în această direcție. Scaffold-urile 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 scaffold-uri. 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 scaffold-uri trebuie să fie realizate din materiale biocompatibile, cu biodegradabilitate sau bioresorbabilitate controlată. 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 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 sau excretate. Pentru a asigura creșterea tridimensională a țesutului, structura matricei trebuie să posede o rețea de macro (supra) pori. Mai mult decât atât, în timpul cultivării celulelor *in vitro*, care are loc în afara unui organism viu, precum și în timpul creșterii țesuturilor, prezența acestei structuri suport asigură acordarea neîngrădită a unui mediu nutritiv pentru masa

---

<sup>4</sup> 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.

celulară. Scaffold-urile pot fi sub forma de plase, suporturi solide, tuburi, structuri poroase și/sau hidrogeluri. După implantare, prezența unei structuri poroase asigură accesul liber al sângelui la celule. În cele din urmă, scaffold-urile trebuie să stimuleze creșterea vaselor de sânge (angiogeneza) în interiorul rețelei de pori. În acest caz, este necesar ca diametrul minim al porilor să aibă dimensiunea mai mare decât 10  $\mu\text{m}$ .

Atât polimerii sintetici cât și cei naturali se utilizează pentru fabricarea de scaffold-uri. Printre polimerii sintetici care se utilizează în mod frecvent pentru crearea de scaffold-uri osoase se menționează: poli (acid  $\alpha$ -hidroxicarboxilic), în mod special, poli (acid glicolic), poli (acid lactic), și copolimerii acestora (poli (acid lactic-co-acid glicolic) (PMGAs)), precum și policaprolactona, poli (3-hidroxi-butirat), poliortoesteri și polianhidride. Printre polimerii naturali cei mai utilizați pentru fabricarea scaffold-urilor fac parte: proteinele matricei extracelulare (colagen și fibrină), precum și polizaharide, poli (acid hialuronic), chitosan și alginat. Acești polimeri sunt considerați promițători datorită asemănării lor cu elemente naturale ale citoscheletului țesuturilor regenerate. Cu toate acestea, aplicarea lor este împiedicată de probleme de imunogenitate și de incapacitatea de a controla degradarea lor<sup>5</sup>.

Cu toate acestea, există cerințe pentru îmbunătățirea proprietăților mecanice ale acestor scaffold-uri. Astfel, au fost propuse materiale compozite poroase pe baza de polilactidă, care conduc la creșterea osteoconductivității schelelor.

Celuloza microbiană (BC) este un biomaterial foarte flexibil care poate fi utilizat în tratamentul plagilor și arsurilor cronice, ca piele artificială sau pansamente, pentru obținerea de vase artificiale, scaffold-uri pentru ingineria tisulară. BC diferă de celuloză vegetală prin puritatea sa superioară, cristalinitate, gradul de polimerizare și rezistența la tracțiune<sup>6</sup>. De asemenea, este biocompatibilă. BC prezintă o structură de rețea a fibrilelor tridimensională (3D), care este similară cu matricea extracelulară naturală (ECM)<sup>7</sup>.

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

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

<sup>5</sup> 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, *Polymer Science, Ser. A*, 2012, Vol. 54, No. 8, pp. 585–601.

<sup>6</sup> Fernando G. Torres, Solene Commeaux and Omar P. Troncoso, Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials, *J. Funct. Biomater.* 2012, 3, 864–878.

<sup>7</sup> Shuai Peng, Yudong Zheng, Jian Wu, Yaxun Wu, Yanxuan Ma, Wenhui Song, Tingfei Xi, Preparation and characterization of degradable oxidized bacterial cellulose reacted with nitrogen dioxide, *Polym. Bull.* (2012) 68:415–423. DOI 10.1007/s00289-011-0550-8.

Compozitele polimerice prezentate in invenție înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că se utilizează materiale prietenoase mediului precum polihidroxitirac (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 în pericol sănătatea pacienților și a utilizatorilor. Compozitele polimerice conform invenției se obțin prin amestecarea în topitura într-un plastograf Brabender, la o temperatură cuprinsă între 170...180 °C, turatie de 40...60 rot/min. și un timp de amestecare între 10...12 min. Selectarea materialelor și cantitatilor acestora au o influență deosebită asupra proprietăților fizico-mecanice și biologice ale acestora.

**Pulberea de polihidroxitirac (PHB)**, furnizată de Firma BIOMER, Germania prezintă o dimensiune a particulelor cuprinsă între 0,5-50 μ.

**Plastifiantul tributil citrat (TBC)**, 97,0 % (ALDRICH) este caracterizat prin: aspect lichid, puritate (GC) 99,9 %, indice de refracție 1. Din literatura 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 membrane uscată care se macină ulterior pentru a obține o pulbere.

Compoziția polimerică pe bază de PHB și celuloză bacteriană, conform invenției, conținând 75...76 părți greutate pulbere de PHB, 18...19 părți greutate TBC și 1...2 părți greutate BC biocompatibilă au fost preparate prin procesarea la cald, pe un Plastograf Brabender. Ca agent porogen s-au utilizat 3...5 părți greutate NaCl de uz farmaceutic.

Procedul 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 șnururilor 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, 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 minute și presiunea de presare de 125 atm, pentru obținerea de plăci cu grosimea de 1 mm și filme cu grosimea de max. 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. Scaffold-urile obținute au fost uscate în aer timp de 24 h și apoi în vacuum pentru alte 24 h. Scaffold-urile rezultate au fost depozitate într-un exicator prevăzut cu vid, până la caracterizare.

**Invenția**, conform descrierii de mai sus, prezintă următoarele **avantaje**:

- a. **Se utilizează materiale prietenoase mediului;**
- b. **Se obțin materiale biocompatibile, caracterizate prin biocompatibilitate *in vitro* și metode fizico-chimice descrise în Farmacopeea Europeană.**
- c. **Procedul de obținere a compozițiilor cu aplicații în ingineria tisulară are loc prin prelucrarea în topitură, fără un consum energetic mare, pe utilaje specifice polimerilor tradiționali;**
- d. **Compozitele polimerice obținute prezintă caracteristici fizico-mecanice, de biocompatibilitate și biodegradabilitate adecvate utilizării propuse.**

In continuare se prezintă două exemple de realizare a invenției:

#### **Exemplul 1**

Compoziția polimerică [(PHB:TBC)\_BC1] compusă din polihidroxibutirat, tributul citrat și celuloza bacteriană, conform tabel 1.

Tabel 1

Cod receptura	Compoziție, wt.%		
	PHB, % gr	Tributul citrat, % gr	Celuloza bacteriană, % gr
(PHB:TBC)_BC1	80	20	1

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 umplutură în matricea polimerică. NaCl se adaugă în scopul de crearea porilor în structura materialului. Urmează presarea amestecului, eliminarea NaCl și prelevarea epruvetelor.

#### **Exemplul 2**

Compoziția polimerică [(PHB:TBC)\_BC2] compusă din polihidroxibutirat, tributul citrat și celuloza bacteriană, conform tabel 2.

Tabel 2

Cod receptura	Compozitie, wt.%		
	PHB, % gr	Tributil citrat,% gr	Celuloza bacteriana, % gr
(PHB:TBC)_BC2	80	20	2

PHB se amesteca cu TBC, apoi are loc omogenizarea in topitura, la cald si introducerea BC. Urmeaza presarea amestecului, eliminarea NaCl si prelevarea epruvetelor.

Pentru obtinerea de placi si filme, amestecurile obtinute in exemplele 1 si 2 au fost presate la temperatura de 170...180°C, timp de presare 3...5 minute. Din placile obtinute prin presare la cald, s-au prelevat epruvete, care ulterior au fost testate din punct de vedere al proprietatilor fizico-mecanice, de biocompatibilitate si biodegradare. In continuare se prezinta metodele de caracterizare si rezultatele testelor.

### Caracterizarea compozitiilor

Pentru caracterizarea compozitiei se folosesc metodele fizico-chimice si biocompatibilitate *in vitro* conform FARMACOPEEI EUROPENE, calorimetria diferentia de baleiaj (DSC), FT-IR, determinarea proprietatilor de tractiune si investigatii morfologice SEM.

Pentru comparatie se foloseste o receptura de PHB plastifiata, codificata PHB.

### Metode folosite in studiul tehnic

#### 1. Comportarea la prelucrarea in topitura

Amestecarea in topitura este o tehnica fara utilizare de solvent si este compatibila cu metodele de procesare ale polimerilor traditionali.

Tabel 3. Caracteristicile procesarii in topitura pentru biocompozitele realizate

Compozitie	TQ <sub>1min</sub> (Nm)	TQ <sub>4min</sub> (Nm)	TQ <sub>10min</sub> (Nm)
PHB	29,5	20	11
(PHB:TBC)_BC 1	36	22	12
(PHB:TBC)_BC 2	34	23	12

unde:

TQ<sub>1min</sub> reprezinta cuplul de torsiune dupa 1 minut de procesare in topitura;

TQ<sub>4min</sub> reprezinta cuplul de torsiune dupa 4 minute de procesare in topitura;

TQ<sub>10min</sub> reprezinta cuplul de torsiune dupa 10 minute de procesare in topitura.



## 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  $\text{cm}^{-1}$ , la rezoluție de 2  $\text{cm}^{-1}$ , spectrele înregistrate reprezentând media a 4 scanări succesive.

## 3. Evaluarea proprietatilor de tractiune ale compozitiilor pe baza de PHB si BC

Testele de tractiune au fost realizate conform ISO 527 pe un dispozitiv de incercari mecanice INSTRON 2519-107 cu o celula de forta de 5 kN. Viteza de lucru a fost setata 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.

## 4. Calorimetrie Diferentiala de Baleiaj (DSC)

Experimentele DSC au fost efectuate pe echipamentul DSC 827<sup>e</sup> METTLER TOLLEDO, pornind de la temperatura camerei până la temperatura de 350  $^{\circ}\text{C}$ , cu viteza de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . S-au folosit creuzete de Al de 40  $\mu\text{l}$ . Determinările s-au efectuat în atmosferă de aer. S-au obținut temperatura de topire ( $T_m$ ), temperatura de degradare ( $T_d$ ) și caldura de fuziune ( $\Delta H_f$ ). Gradul de cristalinitate al PHB s-a calculat folosind ecuatia 1 (Chan et al., 2011)<sup>8</sup>:

$$\text{PHB-}X_c = \frac{\Delta H_f}{(1-w)\Delta H_{100\%,\text{PHB}}} \times 100\% \quad (1)$$

unde:  $\Delta H_f$  este entalpia la topire a probei (J/g);  $\Delta H_{100\%,\text{PHB}}$  este entalpia pentru PHB 100 % cristalinitate (146 J/g) (Sadi et al., 2010)<sup>9</sup>;  $(1-w)$  este fractia in greutate a polimerului din biocompozite.

## 5. Analize fizico-chimice pe extract apos

Analizele fizico-chimice pe extractul apos, conform Farmacopeei Europene au constat în următoarele determinări:

<sup>8</sup> Chan R.T.H., Garvey C.J., Marçal H., Russell R.A., Holden P.J. and Foster L.J.R., 2011, Manipulation of Polyhydroxybutyrate Properties through Blending with Ethyl-Cellulose for Composite Biomaterial, *International Journal of Polymer Science*, Article ID 651549, 8 pages.

<sup>9</sup> Sadi R.K., Fechine G.J.M., N.R. Demarquette, (2010), Photodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), *Polymer Degradation and Stability* 95, 2318-2327.

- Substanțe reducătoare;
- Aciditate;
- Alcalinitate;
- Absorbanță în UV/VIS;
- Reziduu la evaporare.

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  $121 \pm 2^\circ\text{C}$ , 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 și extractul apos, dar fără materialul de analizat.

#### 6. Evaluarea biocompatibilitatii *in vitro*

Biocompatibilitatea materialelor a fost evaluată în raport cu preadipocitele murine aparținând liniei celulare 3T3-L1 (ATCC, cod CL-173<sup>TM</sup>). 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 ore și 5 zile după însămânțarea lor pe materialele testate.

##### **Modelul celular *in vitro*:**

Celulele 3T3-L1 au fost propagate în mediu de cultură *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *low glucose* (Sigma-Aldrich, cod D2902), suplimentat cu 3.5 g glucoză, 1.5 g  $\text{NaHCO}_3$ , 1% antibiotic-antimicotic și 10% ser de vițel nou-născut (Gibco, cod 26010074), la  $37^\circ\text{C}$ , într-o atmosferă umedă de 5%  $\text{CO}_2$ .

Pentru realizarea testelor mai sus menționate, materialele de testat au fost sterilizate la UV timp de ~6h pe fiecare parte, iar celulele au fost însămânțate pe suprafața lor la o densitate inițială de  $3 \times 10^3$  celule/cm<sup>2</sup>.

##### **Distribuția celulelor pe suprafața materialelor:**

La 24 ore și 5 zile după însămânțare, celulele 3T3-L1 au fost fixate cu p-formaldehidă 4%, timp de 20 minute și spalate cu tampon PBS. Membrana celulară a fost apoi permeabilizată prin incubare, timp de 1 oră, la temperatura camerei, cu o soluție de BSA 2% și Triton x100

0.1% în tampon PBS. După o nouă etapă de spălare, probele au fost incubate la temperatura camerei, timp de 15 minute în 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (2 µg/ml în PBS) pentru marcarea fluorescența a nucleilor și apoi inspectate la microscopul inversat Olympus IX71; imaginile au fost captate cu Softul CellF.

#### **Testul MTT:**

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

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

#### **7. Caracterizarea morfologică a compozițiilor obținute**

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

## Rezultate si discutii

### 1. Comportarea la prelucrarea in topitura

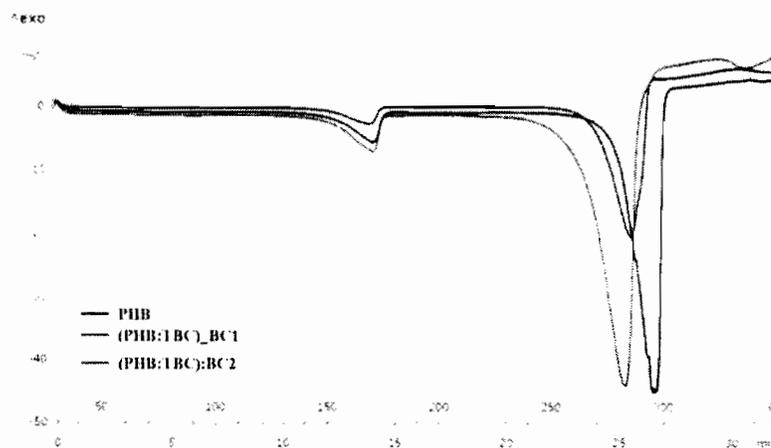
Compozitele polimerice pe baza de PHB si BC nu prezinta dificultate la procesarea in topitura.



**Fig.1. Spectrele ATR-FTIR pentru compozitii pe baza de PHB si BC**

Din spectrele FTIR se observa intensitatea legaturii C=O cu vibratia de intindere la  $1718\text{ cm}^{-1}$  specifica legaturilor de tip ester. Benzile de absorbtie specifice celulozei au fost observate la  $1454\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  de deformare) si in regiunea  $1379\text{--}1043\text{ cm}^{-1}$  caracteristice gruparii C-O de deformare.

Curbele DSC obtinute pentru biocompozitele studiate sunt prezentate in fig. 2.



**Fig.3. Curbe DSC pentru compozitiile pe baza de PHB si BC**

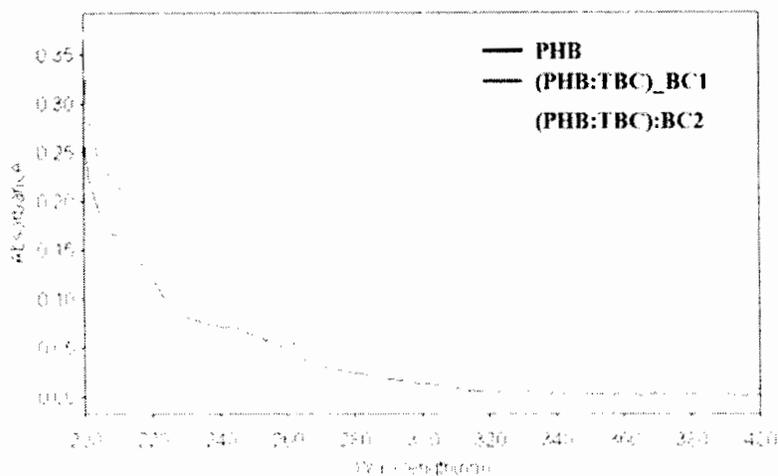
Tabel 4. Parametri DSC pentru probele studiate

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

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

Tabel 5. Caracterizarea fizico-chimică a compozitelor pe baza de PHB si BC

Caracteristica	U.M.	Proba			Valoare impusă cf. Farmacopeei Europene
		PHB (Martor)	(PHB:TBC)_BC1	(PHB:TBC)_BC2	
Substanțe reducătoare	ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,01 M	0,20	1,1	0,7	Max. 2
Absorbanta în UV- VIS, $\lambda = 250-310$ 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

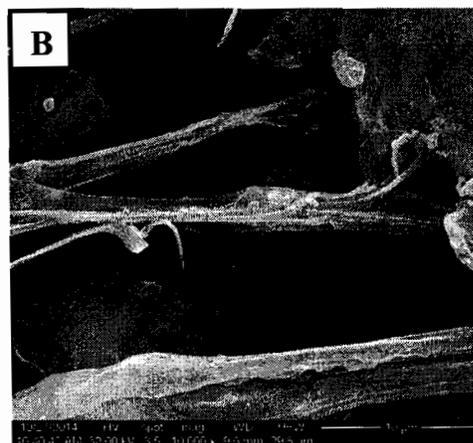
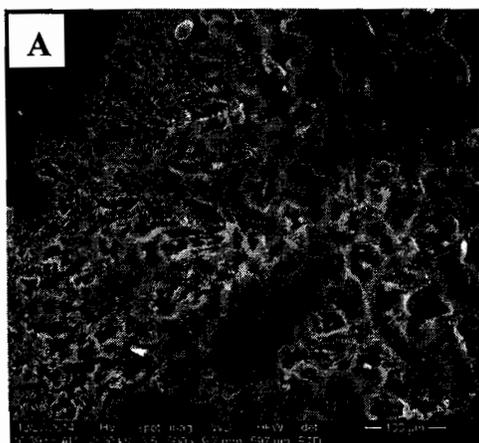


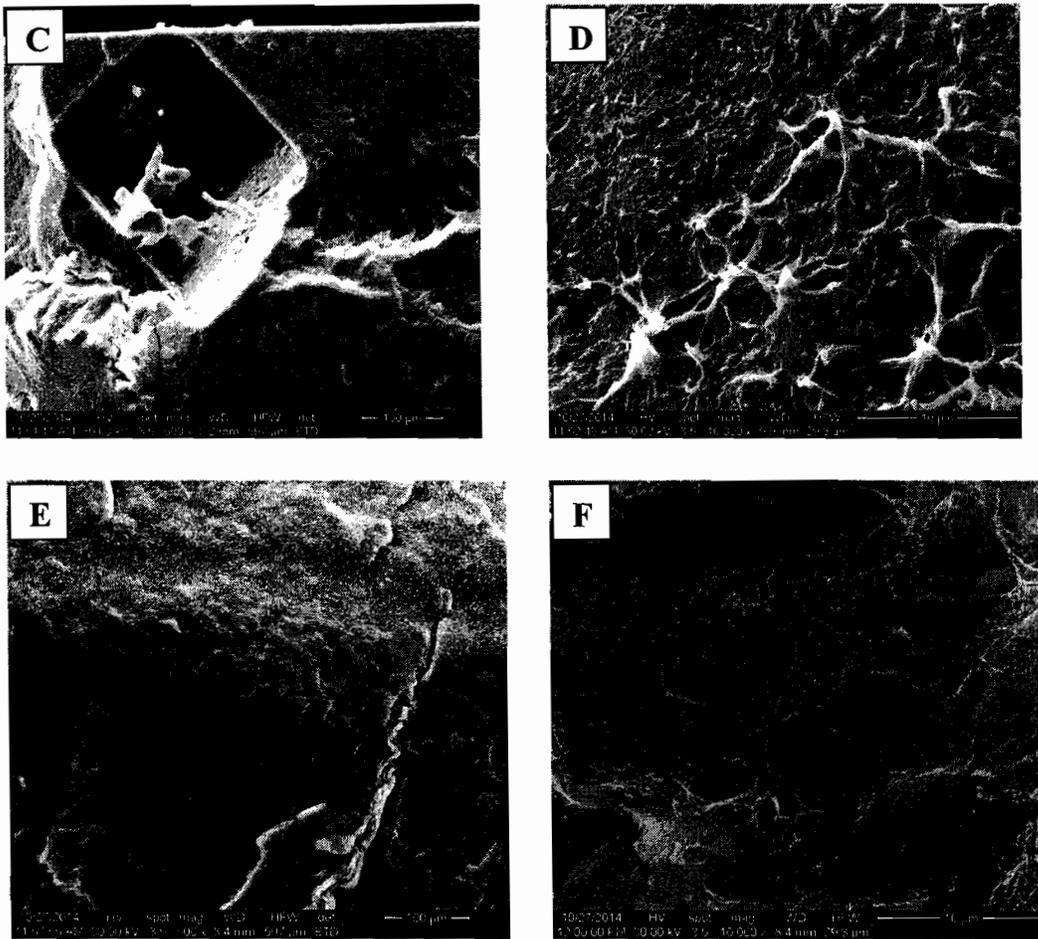
**Fig.4. Absorbanta in UV/VIS a compozitiilor obtinute**

**Tabel 6. Proprietati fizico-mecanice ale compozitiilor PHB si BC**

Proba	Rezistenta la tractiune, 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 compozitiilor pe baza de PHB si celuloza bacteriana a fost evidentiata prin analiza SEM. Imaginile sunt prezentate in fig.5.





**Fig.5. Microfotografii SEM ale compozitiilor pe baza de PHB si BC**

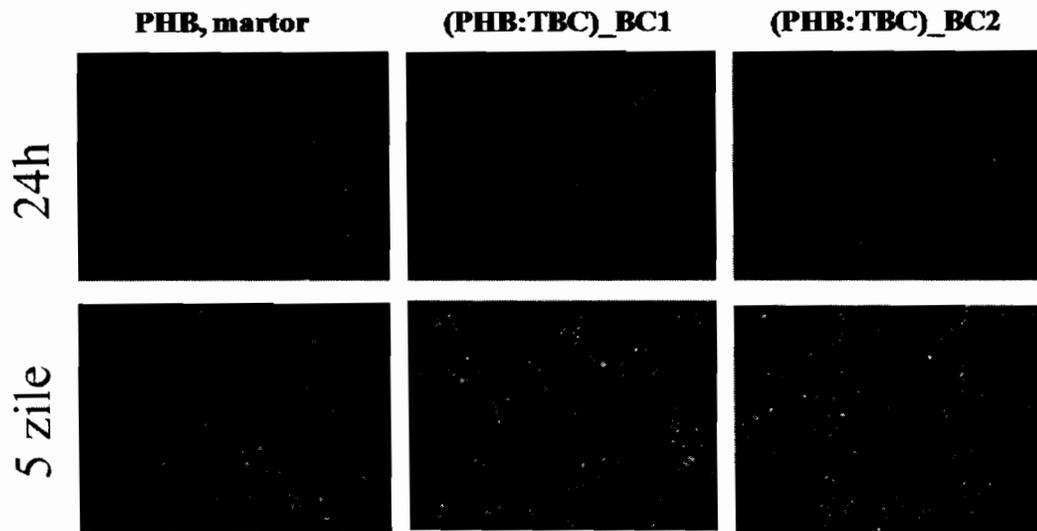
*A,B-PHB plastifiat martor, C,D- (PHB:TBC)<sub>BC\_1</sub>, E,F- (PHB:TBC)<sub>BC\_2</sub>*

Imaginile din figura 5 A si B evidentiaza morfologia poli(3-hidroxi-butiratului) plastifiat cu tributil citrat. Se observa aglomerari de granule/particule PHB. Figura 5 C,D,E,F evidentiaza compozitiile pe baza de PHB si BC la diferite mariri unde particulele de poliester sunt intrepatrunse in nanostructura celulozei sau acopera suprafata nanofibrilelor de celuloza.

#### **Evaluarea biocompatibilitatii *in vitro* a compozitiilor obtinute**

##### ***Distributia celulelor pe suprafata materialelor:***

Imaginile de microscopie in fluorescenta arata ca, atat la 2 de ore cat si la 5 zile de la insamantare, pe suprafata compozitiilor polimerice au existat celule (fig. 1). Mai mult decat atat, la 5 zile, numarul nucleilor marcati fluorescent este mai mare decat la 24 de ore, ceea ce sugereaza ca preadipocitele 3T3-L1 au proliferat pe suprafata materialelor.



**Fig.6. Imagini de microscopie in fluorescenta in care se evidentiaza nucleii marcati fluorescent cu DAPI, aicelului 3T3-L1 insamantate pesuprafata compozitiilor polimerice, la 24 ore si la 5 zile de cultivare.**

#### **Testul MTT:**

Observatiile calitative mai sus mentionate au fost confirmate si cantitativ prin cuantificarea spectrofotometrica a viabilitatii celulelor la 24 ore si 5 zile de la insamantare si a potentialului proliferativ la 5 zile de cultivare. Astfel, datele obtinute prin testul MTT sunt prezentate in figura 2 si arata ca preadipocitele murine au supravietuit pesuprafata materialelor testate si au proliferat timp de 5 zile. In plus, acest test cantitativ, a permis identificarea unor diferente de viabilitate a celulelor 3T3-L1 pe cele 3 probe testate, astfel ca pe proba I viabilitatea a fost cea mai scazuta atat la 24 ore cat si la 5 zile, iar pe proba III cea mai crescuta. Cu toate acestea nu au fost identificate diferente de proliferare intre probe.



### Concluzii finale

S-au realizat doua recepturi polimerice pe baza de polihidroxitirac, tributul citrat si celuloza bacteriana. Recepturile au fost testate din punct de vedere al proprietatilor fizico-mecanice, fizico-chimice si de biocompatibilitate. Recepturile (PHB:TBC)\_BC1 si (PHB:TBC)\_BC2 prezinta o buna biocompatibilitate fata de linia de celule preadipocite. Astfel ca pe proba I martor viabilitatea a fost cea mai scazuta atat la 24 ore cat si la 5 zile, iar pe proba (PHB:TBC)\_BC2 cea mai crescuta. Valorile prezentate in documentatia tehnica indica faptul ca amestecurile polimerice realizate conform inventiei indeplinesc cerintele fizico-mecanice si de biocompatibilitate impuse dispozitivelor medicale din materiale plastice pentru utilizarea in domeniul ingineriei tisulare.

## REVENDICARI

1. Compozitele polimerice pe baza de polihidroxitirat si celuloza bacteriana pentru aplicatii in ingineria tisulara caracterizate prin aceea **ca sunt constituite** din amestecuri formate din parti de greutate de: 75...76 % PHB, 18...19 % TBC și 1...2 % celuloza bacteriana; compozitele se obtin prin amestecarea componentelor in topitura, in plastograful Brabender, la o temperatura de 170....180 °C, un timp de amestecare intre 10...12min., cu o viteză a șnecurilor de 40...60 rpm; ca agent porogen se utilizeaza 3...5 părți greutate NaCl de uz farmaceutic.
2. Procedeeul de obținere a compoziției polimerice **caracterizat prin aceea** ca mai intai se realizeaza un amestec fizic intre pulberea de PHB si plastifiant (TBC), care se lasa circa 4 h la maturare si apoi amestecarea componentilor are loc în topitură la o temperatură de 170....180 °C, un timp de 10 min., cu o viteză a șnecurilor de 40 rpm.
3. Compozite polimerice conform revendicarea 1 **caracterizate prin aceea ca sunt constituite** din amestecuri formate din parti in greutate de : 80 % PHB, 20 % TBC și 1 % celuloza bacteriana.
4. Compozite polimerice conform revendicarea 1 **caracterizate prin aceea ca sunt constituite** din amestecuri formate din parti in greutate de : 80 % PHB, 20 % TBC și 2 % celuloza bacteriana.