



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00651

(22) Data de depozit: 28/08/2014

(41) Data publicării cererii:
26/02/2016 BOPI nr. 2/2016

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ " PETRU PONI "
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODA
NR.41 A, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• MUNTEANU BOGDĂNEL SILVESTRU,
STR. GRĂDINARI NR. 15, BL. B1-2, SC. A,
ET. 3, AP. 1, IAȘI, IS, RO;

• PÂSLARU ELENA, STR. DR. EMIL SAVINI
NR. 7, BL. R1, SC. B, ET. 3, AP. 13, IAȘI, IS,
RO;
• BEJENARU DOINA, STR. CIURCHI
NR. 101A, BL. S1, AP. 1, IAȘI, IS, RO;
• FILIP DANIELA, BD. CAROL I, NR. 28A,
BL. E4, SC. B, ET. 3, AP. 11, IAȘI, IS, RO;
• VASILE CORNELIA, STR. PANTELIMON
NR. 29, BL. 308, SC. A, ET. 3, AP. 12, IAȘI,
IS, RO

(54) **PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE DE OBȚINERE PRIN
ELECTROFILARE/ELECTROPULVERIZARE A UNOR
SUPRAFEȚE POLIURETANICE BIOACTIVE
(BIOCOMPATIBILE ȘI ANTIMICROBIENE) PENTRU UZ
MEDICAL ȘI FARMACEUTIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea unor biocompozite antimicrobiene, pentru uz medical și farmaceutic. Procedeu conform invenției constă în prepararea nanoparticulelor de argint în soluție de poliuretan, prin reducerea argintului din azotatul de argint cu N, N-dimetilformamidă, după care se acoperă filmele de poliuretan prin electrofilare/electropulverizare

cu două tipuri de formulări conținând poliuretan, collagen hidrolizat, k-elastină, acid hialuronic, eventual, condroitin sulfat, având încorporate nanoparticulele de argint.

Revendicări: 2
Figuri: 5



**PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE DE OBTINERE PRIN
ELECTROFILARE/ELECTROPULVERIZARE A UNOR SUPRAFEȚE
POLIURETANICE BIOACTIVE (BIOCOMPATIBILE ȘI ANTIMICROBIENE)
PENTRU UZ MEDICAL ȘI FARMACEUTIC**

Invenția se referă la obținerea prin electrofilare/electropulverizare de suprafețe biocompatibile cu proprietăți antibacteriene pe bază de Poliuretan (PU), Ag și biopolimeri naturali (BP) (colagen hidrolizat, elastină, condroitin sulfat și acid hialuronic) destinate pentru utilizarea în domeniu biomedical ca materiale biocompatibile și bioactive.

Poliuretanii constituie una dintre cele mai cunoscute clase de biomateriale aplicate pentru dispozitive medicale^[1]. Datorită proprietăților mecanice adecvate, poliuretanii sunt utilizați în multe dispozitive medicale (catetere, inimi artificiale). Deși au în general o biocompatibilitate bună, creșterea hemocompatibilității și biocompatibilității este de interes practic în multe situații ^[2].

Electrofilarea ^[3] este un proces prin care un jet polimeric foarte subțire încărcat electrostatic curge spre un electrod colector metalic datorită forțelor electrostatice. În urma evaporării solventului jetul de polimer se solidifică și se obține astfel pe colector o structură de micro/nano fire polimerice, cu raport suprafață/volum mare, cu diametre de ordinul 0.01÷10 μm. În cazul în care pe colector nu se obțin fire ci numai particule procesul se mai numește electropulverizare.

Nanoparticulele de argint (Ag-NP) pot fi folosite în aplicațiile medicale ca agenți antibacterieni cu spectru larg, cu acțiune inhibitoare atât pentru bacteriile Gram pozitive și cât și pentru cele Gram negative. Datorită raportului suprafață volum mare nanoparticulele de argint au o reactivitate sporită având activitate antibacteriană chiar și la concentrații mici ^[4]. Activitatea antibacteriană a nanoparticulelor de argint este mai ridicată când dimensiunea acestora este mai scăzută (de ordinul 10 nm sau mai mică) ^[5].

Proprietățile nanoparticulelor de argint depind în mare măsura de modul de distribuire al acestora în matricea polimerică și de modul în care acestea intră în contact cu mediul înconjurător. Prin urmare încorporarea acestora în interiorul și implicit la suprafața

¹ The Design and Manufacture of Medical Devices; A volume in Woodhead Publishing Reviews: Mechanical Engineering Series; 2012, Pages 115–151; 3 – Polyurethane for biomedical applications: A review of recent developments; Wenshou Wang, Chun Wang.

² Zhenchu Ren, Guangyi Chen, Zhiyong Wei, Lin Sang, Min Qi, *J. APPL. POLYM. SCI.* 2013, pg 308

³ Wendorff J.H., Agarwal S., Greiner A., *Electrospinning: Materials, Processing, and Applications.* John Wiley & Sons, Germany (2012); Ramakrishna S., *An introduction to electrospinning and nanofibers.* World Scientific Publishing Company Incorporated, (2005)

⁴ Gangadharan D., Harshvardan K., Gnanasekar G., Dixit D., Popat K.M., Anand P.S., *Water Res.* 44:5481–5487 (2010).

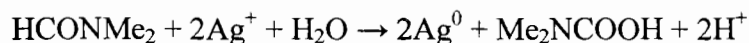
⁵ Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T. Yacaman M.J., *Nanotechnology* 16:2346-2353 (2005); Guzman M., Diile J., Godet S., *Nanomed-Nanotechnol Biology and Medicine* 8:37–45 (2012); Espinosa-Cristóbal L.F., Martínez-Castañón G.A., Martínez-Martínez R.E., Loyola-Rodríguez J.P., Patiño-Marin N., Reyes-Macías J.F., Ruiz F., *Mater Letters*, 63:2603–2606 (2009).

nanofirelor oferă ocazia de a produce materiale fibroase performante prin electrofilare. Datorită dimensiunilor nanometrice și a raportului mare suprafață/volum al nanoparticulelor înglobarea acestora în interiorul (și implicit și la suprafața) nanofirelor polimere conduce la creșterea cantității de argint sub formă de nanoparticule care este accesibilă pentru interacțiunea cu mediul extern. Cu cât grosimea nanofirelor e mai mică cu atât raportul dintre NP aflate la suprafață și NP aflate în volum crește - la limita, când grosimea nanofirelor e comparabilă cu dimensiunile NP practic toate NP se află la “suprafață”). Astfel nanofirele polimere acționează ca suport pentru nanoparticule, ele având dimensiuni aproximativ comparabile cu cele ale nanoparticulelor, cu rol de încapsulare și imobilizare, precum și ca agent de stabilizare.

Încorporarea fiecărui component natural în poliuretanul sintetic contribuie la îmbunătățirea caracteristicilor matricei polimerice și a biocompatibilității/hemocompatibilității. Colagenul și elastina joacă un rol esențial în menținerea elasticității și a rezistenței la rupere a materialelor și mai mult procesul de vindecare de la nivelul pielii este condus de ambii compuși, în plus colagenul deține imunogenitate foarte scăzută. Acidul hialuronic (HA) reprezintă o alegere potrivită pentru a fi încorporat într-o matrice deoarece oferă proprietăți de lubrifiere foarte bune, este foarte hidrofil și influențează numeroase funcții celulare precum migrarea, adeziunea și proliferarea și de asemenea ajută la regenerarea pielii și augmentare. Condroitin sulfatul (CS) protejează o varietate largă de molecule (de ex. lipide, proteine și ADN) și celule din diferite organe. În plus, exercită o oarecare activitate antioxidantă și are efecte antiinflamatoare.

Procedee conform invenției de obținere prin electrofilare/electropulverizare a unor suprafețe poliuretanic bioactive constă în două etape:

I. Obținerea nanoparticulelor de argint s-a realizat în soluție de poliuretan (*in situ*) prin reducerea argintului din azotatul de argint (AgNO_3) cu N,N-dimetilformamidă (DMF), care poate acționa ca un reducător pentru sărurile de argint [⁶], la temperatura camerei, timp de 2 ore, unde are loc următoarea reacție:



Procesul de reducere și formarea argintului coloidal sunt evidențiate prin schimbarea în timp a culorii soluției de la incolor la galben brun (absorbția radiației vizibile fiind datorată

⁶ Pastoriza-Santos I., Liz-Marzan L.M., *Langmuir* 15: 948-951 (1999).

fenomenului de rezonanță plasmonică [7]). Soluțiile cu formulările PU/BP/Ag utilizate pentru electrofilare/electropulverizare s-au preparat în DMF și o picătură de apă.

II. Acoperirea propriu-zisă a filmelor de PU cu formulările PU/BP/Ag prin electrofilare/electropulverizare.

Procedeul și biocompozitele cu matrici extracelulare încorporate obținute în acest mod prezintă următoarele avantaje:

- se pot depune straturi foarte subțiri cu grosime controlabilă;
- se poate controla morfologia straturilor depuse prin modificarea condițiilor de electrodepunere (tensiunea aplicată, distanța dintre ac și colector, concentrația soluției utilizate și debitul de depunere) în scopul modificării caracteristicilor de suprafață fără a modifica și pe cele de volum;
- prezența argintului imprimă materialului polimeric caracter antibacterian și îmbunătățește abilitatea PU de a forma nanofire prin electrofilare;
- prezența biopolimerilor conduce la îmbunătățirea hemocompatibilității.

EXEMPLUL 1

Poliuretanul utilizat pentru electrofilare s-a dizolvat în N, N-dimetilformamidă (DMF) pentru a obține o soluție de concentrație 0,3 g/ml. Pentru a obține o soluție cu un conținut de argint de 0,01 g/g raportat la poliuretan se adaugă 0,01574 g AgNO₃ în 1 ml de soluție de poliuretan de concentrație 0,3 g/ml. Reducerea Ag se realizează conform procesului descris anterior la secțiunea I.

Soluțiile preparate cu și fără Ag au fost depuse prin electrofilare/electropulverizare - Figura 1 - pe membrane de PU (în prealabil preparate prin metoda evaporării solventului) plasate pe colectorul metalic.

Figura 1

Schema instalației este prezentată în Figura 1. Aparatul constă dintr-o sursă de înaltă tensiune continuă (0-30 kV), platan rotitor metalic și o seringă orientată cu acul perpendicular pe acesta. Tensiunea înaltă este aplicată între platanul metalic și acul seringii. Soluția de poliuretan din seringă este împinsă afara cu debit constant. Parametrii utilizați pentru acoperirea filmelor de poliuretan prin electrofilare/electropulverizare au fost: tensiunea dintre acul seringii și platanul colector 20 kV; distanța dintre acul seringii și platan 7,5 cm; debitul soluției de polimer 1 μL/min; timp de depunere 30 min.

⁷ Pastoriza-Santos I., Liz-Marzán L.M., *Pure Appl Chem*. 72:83–90 (2000).

S-au obținut fie suprafețe acoperite uniform, compacte sau meșe de nanofibre cu o grosime de aproximativ 3 μm și densitate superficială de masă de 0,3 mg/cm².

S-au determinat următoarele proprietăți ale probelor acoperite cu PU/Ag și biocompozite poliuretanică cu matrice extracelulară (PU/BP/Ag) în comparație cu proba acoperită numai cu PU: morfologia, diametrul și mărimea particulelor/firelor, hidrofilia suprafețelor obținute, rugozitatea și proprietățile antibacteriene. Rezultatele sunt prezentate pentru toate exemplele menționate cuplat în figurile 1- 7 și Tabelele 1- 5

Figura 1

Tabel 1

Morfologia acoperirilor de PU obținute se modifică prin adăugarea argintului trecând de la o morfologie predominantă de particule relativ mari (aproximativ $2,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$) la una predominant cu fibre. Particulele rămase sunt mult mai puține și de dimensiune cu 30% mai mică. Formarea de meșe de nanofibre conduce și la o scădere a rugozității suprafeței, aceasta devenind mai omogenă.

Figura 2

Prin adăugarea argintului în matricea de PU se modifică hidrofilia suprafeței, și anume aceasta scade, materialul obținut fiind ușor mai hidrofob (Figura 3).

Testele antimicrobiene pe trei bacterii diferite *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* și *Salmonella typhimurium* au evidențiat că matricea polimerică, poliuretanul, nu inhibă dezvoltarea culturilor bacteriene în schimb, prin adăugarea argintului acestea încetează să se mai dezvolte. Caracterul antibacterian este influențat de concentrația Ag prezentă în sistemul polimeric, și anume pentru o inhibare totală este necesar o concentrație de Ag de minim 0.5% (Tabel 2). Materialele astfel obținute prezintă o activitate mai pronunțată în cazul bacteriei *Salmonella typhimurium*.

Tabel 2

EXEMPLUL 2

În soluția de poliuretan de concentrație 0,3 g/ml s-a adăugat o suspensie de collagen hidrolizat (HC) în DMF la 60 °C și s-a lăsat la agitat timp de 1 min. Mai apoi a fost adăugată soluția de k-elastină (kEL) în amestecul obținut, sub agitare puternică, la 45-50 °C. După 5-10 min, amestecul devine omogen și limpede. Amestecul astfel obținut a fost împărțit în două părți egale iar la fiecare parte a fost adăugată pulbere de glicozaminoglican (acid hialuronic (HA) și respectiv condroitin sulfat (CS)), sub agitare puternică la 45-50 °C. În amestecurile astfel obținute s-a adăugat azotat de argint conform procedurii descris mai sus.

Formulările preparate cu și fără Ag și biopolimeri au fost depuse prin electrofilare/electropulverizare pe membrane de PU.

În Figura 4 sunt ilustrate micrografiile electronice de baleiaj și în Tabelul 1 sunt date diametrul particulelor și a nanofibrelor precum și rugozitatea determinată prin microscopia de forță atomică (AFM) înregistrate pentru compoziția poliuretan/biopolimeri/acid hialuronic cu și fără argint.

Figura 4

Din imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) se observă că pe măsură ce conținutul de Ag crește în sistemul PU/BP/HA are loc modificarea morfologiei din predominant formată din particule în morfologie preponderentă cu nanofibre, diametrul particulelor și al nanofibrelor scăzând în urma adăugării de argint în matricea polimerică (Tabel 1) astfel încât la conținuturi mici de Ag decurge electropulverizarea iar la conținuturi mari este predominantă electrofilarea.

Prezența matricilor extracelulare (colagen, elastină și acid hialuronic sau condroitin sulfat) în sistemul polimeric determină o creștere a hidrofiliei matricei polimerice, prin urmare o îmbunătățire a biocompatibilității. Acest lucru este evidențiat de o scădere semnificativă a unghiului de contact cu apa de la 94°, în cazul PU, la 45° în cazul sistemului PU/BP/HA. Adosul de Ag în sistemul polimeric PU/BP/HA determină o creștere a unghiului de contact cu apa, astfel suprafața devenind ușor mai hidrofobă (Figura 3).

După cum se observă din datele prezentate în Tabelul 2 activitatea antibacteriană a materialelor obținute depinde de conținutul de argint precum și de tipul bacteriei testate. Prin adăugarea argintului în sistemul polimeric PU/BP/HA se observă că toate probele prezintă activitate antibacteriană după 48 de ore. După cum era de așteptat, încorporarea polimerilor biologici în matricea de PU conduce la o ușoară scădere a activității antibacteriene, în acest caz disponibilitatea argintului pentru interacțiunea cu bacteriile scade datorită interacțiunilor puternice care apar între metal și biopolimeri.

EXEMPLUL 3

Conform procedurii descris în Exemplul 2 s-a obținut și compoziția poliuretan/colagen hidrolizat/elastină/condroitin sulfat (PU/BP/CS). Condroitin sulfatul (CS) s-a încorporat în matricea polimerică deoarece este cunoscută acțiunea sa de a proteja o varietate de molecule din organismul viu (de ex. lipide, proteine și ADN) precum și diferite celule. De asemenea, acest compus prezintă activitate antioxidantă și proprietăți antiinflamatoare.

Și în acest caz imaginile SEM (Figura 5) au evidențiat o îmbunătățire a capacității de electrofilare a amestecului polimeric pe bază de PU/BP/CS prin adăugarea argintului. Prin creșterea conținutului de Ag la 1% (g/g raportat la PU) se observă obținerea unei meșe compacte de nanofibre.

Diametrul particulelor și rugozitatea suprafeței scad semnificativ prin adăugarea argintului în sistem. De la o rugozitate de 360 nm determinată pentru proba PU/BP/CS se ajunge la o valoare de 140 nm în cazul probei ce conține 1%Ag (g/g raportat la polimer).

Figura 5

Unghiurile de contact cu apa în cazul suprafețelor de poliuretan acoperite cu PU/BP/CS (Figura 3) prezintă o tendință de scădere în urma adăugării biopolimerilor, suprafețele devenind mai hidrofile. Adăosul de Ag în matricea polimerică conduce la o creștere a unghiului de contact, de la 67° în cazul PU/BP/CS până la 75° în cazul sistemului PU/BP/CS/1%Ag, obținându-se astfel materiale cu un raport echilibrat între componenta hidrofilă și hidrofobă, lucru necesar pentru materialele utilizate în contact cu sângele și mediul biologic în general.

**PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE DE OBȚINERE PRIN
ELECTROFILARE/ELECTROPULVERIZARE A UNOR SUPRAFETE
POLIURETANICE BIOACTIVE (BIOCOMPATIBILE ȘI ANTIMICROBIENE)
PENTRU UZ MEDICAL SI FARMACEUTIC**

REVENDICĂRI

- I. Procedeu în două etape pentru obținerea de biocompozite pe bază de poliuretan (PU)/biopolimeri naturali (BP)/nanoparticule de argint (AgNPs) caracterizat prin aceea că, prima etapă constă în obținerea nanoparticulelor de argint prin reducerea *in situ* utilizând N,N-dimetilformamidă ca și agent de reducere și poliuretanul (PU) și amestecurile (PU/BP) ca și agenți de stabilizare pentru AgNPs; și acoperirea prin electrofilare/electropulverizare a membranelor de PU (obținute în prealabil prin tehnica evaporării de solvent) cu formulările PU/BP/Ag, în condițiile experimentale: tensiunea dintre acul seringii și platanul colector 20 kV; distanța dintre acul seringii și platan 7,5 cm; debitul soluției de polimer 0,1 mL/min; timp de depunere 30 min.
- II. Compoziție pentru biocompozite cu matrice extracelulară obținute prin electrofilare/electropulverizare caracterizată prin aceea că este formată dintr-un strat suport de poliuretan și un strat cu grosimea de 3 μm din amestec 9 g poliuretan (PU) + 0,9 g collagen hidrolizat (HC) + 0,09 g k-elastină (kEL) + 0,01 g acid hialuronic (HA) sau 0,1% condroitin sulfat și Ag depus din soluție prin electrofilare/electropulverizare conform procedurii descris în revendicarea 1. Biocompozitele au morfologie și proprietăți de suprafață controlabile și prezintă activitate antimicrobiană inhibând dezvoltarea bacteriilor patogene *Salmonella typhymurium*, *Escherichia coli* și *Listeria monocytogenes* putând fi materiale cu potențiale aplicații atât în domeniul medical pentru obținerea de dispozitive medicale de tipul cateterelor dar și în domeniul ambalajelor farmaceutice și alimentare.

DESENE EXPLICATIVE

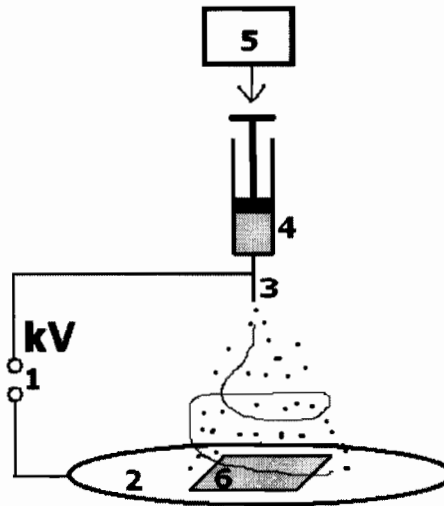


Figura 1. Schema instalației pentru electrofilare/electropulverizare: (1) sursă de tensiune de curent continuu 0-30 kV, (2) platan rotitor metalic, (3) acul seringii, (4) seringă, (5) dispozitiv de deplasare a pistonului seringii, (6) substrat din membrana de PU

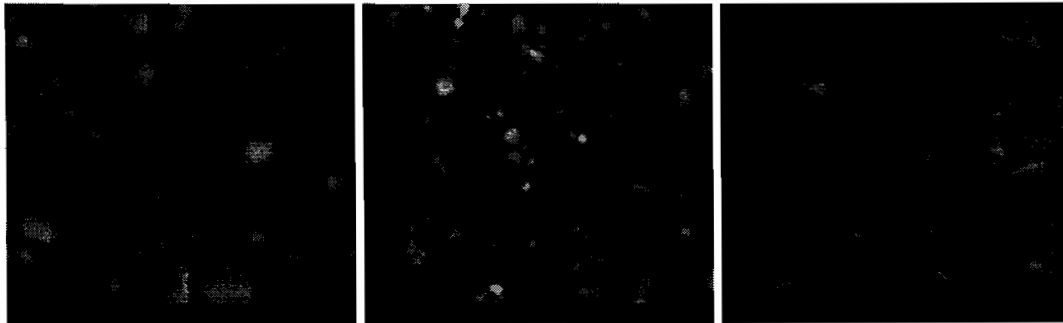


Figura 2. Imagini SEM ale suprafețelor de poliuretan cu și fără Ag obținute prin electrospinning (PU/Ag): (a) PU; (b) PU/0,2Ag%; (c) PU/1% Ag

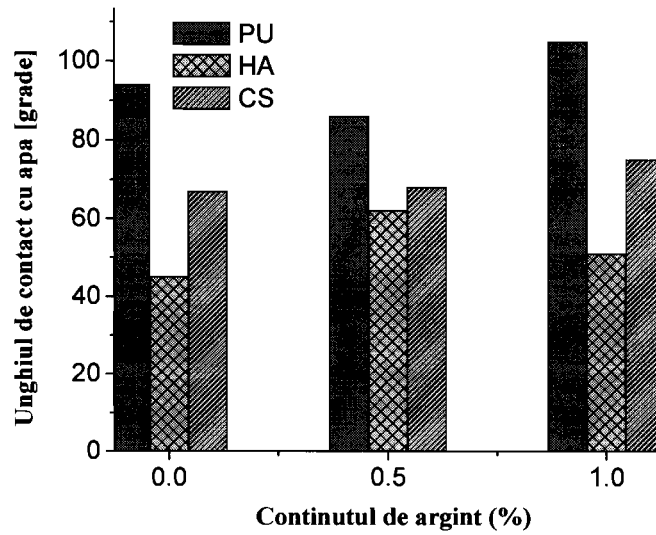


Figura 3. Variația unghiului de contact cu apa în funcție de conținutul de Ag adăugat pentru sistemul martor (PU) și PU/BP

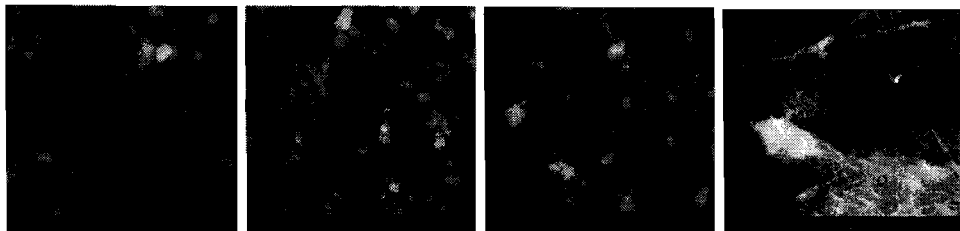


Figura 4. Imagini SEM ale filmelor de poliuretan acoperite cu poliuretan/acid hialuronic cu și fără Ag (PU/BP/HA/Ag): (a) PU; (b) PU/HA; (c) PU/HA 0,2% Ag; (d) PU/HA 1% Ag

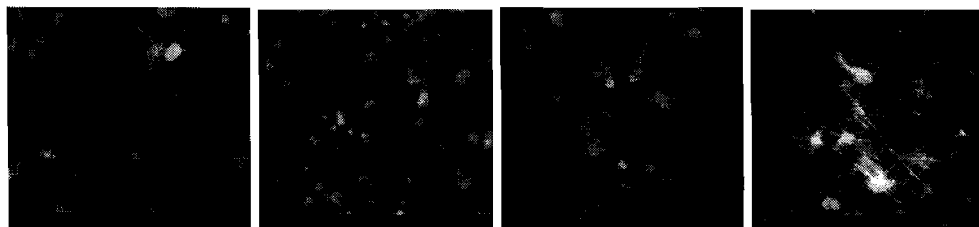


Figura 5. Imagini SEM ale filmelor de poliuretan acoperite cu poliuretan/condroitin sulfat cu și fără Ag (PU/CS/Ag): (a) PU; (b) PU/CS; (c) PU/CS 0,2% Ag; (d) PU/CS 1% Ag

Tabel 1. Diametrul particulelor și al nanofirelor determinat din imaginile SEM și rugozitatea suprafețelor determinată prin AFM în cazul filmelor de poliuretan acoperite cu PU/Ag, PU/BP/HA/Ag și PU/BP/CS/Ag.

Proba	Diametrul particulelor (μm)	Diametrul firelor (nm)	Rugozitatea medie pătratică din AFM (nm)
PU	2,2 \pm 0,9	230 \pm 85	370
PU-0,2%Ag	1,8 \pm 0,7	160 \pm 45	216
PU-1%Ag	0,7 \pm 0,1	125 \pm 35	157
PU-HA	0,9 \pm 0,3	100 \pm 50	479
PU-HA-0,2%Ag	1,0 \pm 0,4	120 \pm 40	208
PU-HA-1%Ag	0,00	165 \pm 110	148
PU-CS	0,8 \pm 0,4	100 \pm 35	360
PU-CS-0,2%Ag	0,85 \pm 0,35	120 \pm 40	380
PU-CS-1%Ag	0,00	140 \pm 90	140

Tabel 2. Procentele de inhibare a dezvoltării bacteriilor manifestate de materialele pe bază de biopolimeri și argint încorporate în matrice de poliuretan.

Inhibare	%, 24 h	%, 48h
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		
PU	21	43
PU 0,2%Ag	82	90
PU 0,5%Ag	83	95
PU 1%Ag	85	95
PU-HA	41	69
PU-HA 0,2%Ag	62	73
PU-HA 0,5%Ag	70	81
PU-HA 1%Ag	77	82
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)		
PU	33	55
PU 0,2%Ag	79	98
PU 0,5%Ag	100	100
PU 1%Ag	100	100
PU-HA	48	67
PU-HA 0,2%Ag	57	71
PU-HA 0,5%Ag	90	100
PU-HA 1%Ag	86	100
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)		
PU	14	38
PU 0,2%Ag	100	100
PU 0,5%Ag	100	100
PU 1%Ag	100	100
PU-HA	72	92
PU-HA 0,2%Ag	84	98
PU-HA 0,5%Ag	89	99
PU-HA 1%Ag	27	94