



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00876

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

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

(71) Solicitant:  
• ICPE BISTRIȚA S.A., STR. PARCULUI  
NR. 7, BISTRIȚA NĂSĂUD, BN, RO

(72) Inventatori:  
• RĂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3,  
BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• PREDĂ PETRUȚA, BD. 1 DECEMBRIE  
NR. 52, BL. A2, SC. E, AP. 13, OLTENIȚA,  
CL, RO;  
• GROSU ELENA, STR. ALMAȘU MARE  
NR. 13, BL. 57, SC. 2, ET. 2, AP. 24,  
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• LUNGU MARIA,  
STR. GHEORGHE MOCEANU NR. 2-4,  
ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• COROIU VIORICA,  
STR.DEALUL ȚUGULEA NR.46-50, BL.12,  
SC.B, AP.50, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• VASILE CORNELIA, STR. PANTELIMON  
NR.29, BL.308, SC.A, ET.3, AP.12, IAȘI, IS,  
RO;  
• DARIE-NIȚĂ RALUCA NICOLETA,  
STR. VASILE LUPU NR. 112, BL. C2, SC. B,  
ET. 3, AP. 3, IAȘI, IS, RO;  
• DUMITRIU RALUCA PETRONELA,  
STR.PROF. PAUL NR.11, BL.39/I, SC.B,  
AP.2, IAȘI, IS, RO;  
• CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,  
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,  
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BLEOTU CORALIA,  
ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5,  
SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) COMPOZITE POLIMERICE PENTRU OBTINEREA  
UNUI TUB DE DRENARE URINAR CU PROPRIETĂȚI  
ANTIMICROBIENE, ȘI PROCEDEU DE OBTINERE  
A ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor compozite polimerice cu proprietăți antibacteriene, pentru tuburi de drenare, de uz medical. Procedeu conform invenției constă în prelucrarea în topitură la o temperatură de 170°C, timp de 7 min, și o viteză de 60 rpm, a unui amestec format, în procente masice, din 75,6...79,6% acid polilactic, 7,56...7,96% plastifiant, 11,34...11,94% polietilenglicol, până la 5% hidrolizat de colagen, respectiv, până la 0,5% nanoparticule de argint; amestecul rezultat se prelucrează pe un extruder cu șnecc, la o temperatură de 135...150°C, prevăzut cu

o duză cu un diametru de 4 mm și un dorn cu diametrul de 3 mm, rezultând tuburi cu un diametru interior de 3±0,1 mm, și un diametru exterior de 4±0,1 mm având o rezistență la rupere de 16...32 MPa, o alungire la rupere de 126,5...216,8%, care sunt stabile pe termen scurt, și prezintă activitate antimicrobiană și antifungică, pentru utilizare ca tuburi urinare sterile.

Revendicări: 3  
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## DESCRIEREA INVENȚIEI

### **COMPOZITE POLIMERICE PENTRU OBTINEREA UNUI TUB DE DRENARE URINAR CU PROPRIETĂȚI ANTIMICROBIENE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA**

Invenția se referă la compozite polimerice cu proprietăți antimicrobiene și la un procedeu pentru obținerea tubului de drenare urinar, de uz medical, din acestea.

Se cunosc drenuri urinare care sunt frecvent colonizate de bacterii uropatogenice care duc la formarea biofilmelor, asociate cu inițierea unui proces infecțios al țesuturilor înconjurătoare, situație care impune îndepărtarea dispozitivului medical (Burton E., Gawande PV., Yakandawala N., LoVetri K., Zhanel GG., Romeo T., Friesen AD., Madhyastha S. **2006**. Antibiofilm Activity of GlnU Enzyme Inhibitors against Catheter-Associated Uropathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **50**: 1835-1840). S-a estimat că riscul de a dobândi o infecție crește cu 5 % în fiecare zi pentru un dren medical *in situ* (Saint S., Wiese J., Amory JK., Bernstein ML., Patel UD., Zemencuk JK., Bernstein SJ., Lipsky BA., Hofer TP. **2000**. Are physicians aware of which of their patients have indwelling urinary catheters? *Am J Med*. **109**: 476-480; Humphreys H., Newcombe RG., Enstone J., Smyth ET., McIlvenny G., Fitzpatrick F., Fry C., Spencer RC., Hospital Infection Society Steering Group. **2008**. Four country healthcare associated infection prevalence survey 2006: risk factor analysis. *J Hosp Infect*. **69**: 249-257), iar posibilitatea ca un pacient să dezvolte o infecție asociată cateterizării este de 35-39 % (Maki DG., Tambyah PA. **2001**. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis Mar*. **7**: 342-347). Infecțiile tractului urinar asociate utilizării drenurilor medicale sunt dificil de tratat deoarece microorganismele incluse în matricea biofilmului sunt de zeci, sute și chiar până la o mie de ori mai rezistente la antibiotice decât omologii lor planctonici (Ceri H., Olson M., Stremick C., Read RR., Morck D., Buret A. **1999**. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. **37**: 1771-1776; Kaali P., Strömberg E., Karlsson S. **2011**. Prevention of Biofilm associated Infections and Degradation of Polymeric Materials used in Biomedical Applications. *Pub. In Tech - Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, Edited by Mr Anthony Laskovski, **Cap. 22**, pg. 513-540).

Se cunosc numeroase strategii cu privire la managementul infecțiilor asociate prezenței unui corp străin prin terapie cu antibiotice sau combinarea terapiei medicamentoase cu îndepărtarea chirurgicală a dispozitivului medical implantat și înlocuirea acestuia, dar acestea sunt aplicabile doar în cazul în care țesutul din locul de inserare al dispozitivului este în stare bună iar patogenul implicat în infecție nu face parte din microorganismele rezistente la terapie (Trampuz A., Andreas



FW. 2006. *Infections associated with orthopedic implants*. Current Opinion in Infectious Diseases. **19**: 349–356.). Îndepărtarea dispozitivelor medicale implantabile, indiferent de tipul acestora, este recomandată în situația instalării unei septicemii severe, a flebitei septice sau a șocului septic. De exemplu, la pacienții cateterizați care prezintă bacteriemie persistentă, pe o perioadă de 48-72 h, drenul trebuie îndepărtat (von Eiff C., Jansen B., Kohnen W., Becker K. 2005. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*. **65**: 179-214). Terapia cu antibiotice profilactice este o procedură postoperatorie, curent utilizată în chirurgie, pentru a preveni colonizarea microbiană pe dispozitivul medical implantat. Cu toate acestea, au fost relatate cazuri în care pacienții au dezvoltat complicații infecțioase chiar și sub tratament cu antibiotice (McCann MT., Gilmore BF., Gorman SP. 2008. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **60**: 1551-1571). Oricum, cantitatea de medicament administrat poate fi insuficientă pentru a realiza un efect antimicrobian prelungit. Toate aceste măsuri de reducere a infecțiilor asociate utilizării drenurilor urinare duc la creșterea morbidității și mortalității, precum și la prelungirea perioadei de spitalizare a pacientului (Holroyd-Leduc JM., Sen S., Bertenthal D., Sands LP., Palmer RM., Kresevic DM., Covinsky KE., Seth Landefeld C. 2007. The relationship of indwelling urinary catheters to death, length of hospital stay, functional decline, and nursing home admission in hospitalized older medical patients. *J Am Geriatr Soc.*, **55**: 227-233; Guidelines for the Prevention of Catheter associated Urinary Tract Infection. Published on behalf of SARI by HSE Health Protection Surveillance Centre. 2011).

O metodă pentru reducerea acestor inconveniente constă în încorporarea directă a unui agent antimicrobian într-o matrice polimerică. Astfel a apărut necesitatea **dezvoltării unor dispozitive medicale antimicrobiene** care să inhibe aderența microbiană și implicit dezvoltarea biofilmelor. Cu toate eforturile făcute este foarte dificil de obținut un material complet antiaderent, deoarece *in vivo* orice tip de material este acoperit de un “film condiționant”(Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Baldassarri L, Montanaro L. 2005. Prevalence of *cna*, *fnbA* and *fnbB* adhesin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from orthopedic infections associated to different types of implant. *FEMS Microbiol Lett*. **246**: 81-86). În plus, materialele polimerice noi trebuie să fie biocompatibile, să prezinte proprietăți fizico-mecanice adecvate și să fie sterile.

Au fost realizate numeroase studii dedicate proiectării de materiale antimicrobiene (capabile de a preveni contaminarea de suprafață și/sau eradicarea biofilmelor microbiene) prin diferite metode (nanotehnologie, acoperiri sau modificări de suprafețe).

De asemenea, se cunosc compozite pe bază de compuși antimicrobieni anorganici (de exemplu: dioxid de titan, cupru, aur, galiu, argint) și peptide antimicrobiene (de exemplu: nisin,



mersacidin, colicin, cecropin A, etc.) (Ribeiro AMC., Barbassa L., Dias de Melo L. **2011**. Antimicrobial Biomimetics. *InTech Europe*. 227-284).

Dintre agenții antimicrobieni studiați, argintul este cunoscut ca un metal cu un spectru antimicrobian larg față de tulpini Gram pozitive, Gram negative, microfungi, protozoare și virusuri, fiind utilizat de secole la tratarea arsurilor și rănilor cronice. Diferențele dintre speciile bacteriene pot influența comportamentul față de agenții antimicrobieni. Peretele celular al bacteriilor Gram pozitive conține de 3 până la 20 ori mai mult peptidoglicani, în comparație cu bacteriile Gram negative. În consecință, bacteriile Gram pozitive sunt, în general, mai puțin sensibile la acțiunea ionilor de argint decât speciile Gram negative (Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M., Uchida M. **2000**. Antibacterial effect of silver–zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater*. **16**: 452–5.). Nanoparticule de argint (AgNPs) sunt particule insolubile de dimensiuni mai mici de 100 nm care pot fi obținute prin reducerea  $\text{AgNO}_3$  cu citrat (Turkevich J., Stevenson PC., Hillier J. **1951**. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* **11**: 55–75). Recent s-au obținut bionanoparticule de argint prin adăugarea în soluția apoasă de  $\text{AgNO}_3$  a unor extracte din plante. Biomoleculele din plante induc reducerea ionilor de argint din  $\text{AgNO}_3$ , la AgNPs (Sahayaraj K., Rajesh S. **2011**. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. *Formatex. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 228-244). Datorită suprafeței specifice mari, nanoparticulele de argint pot fi folosite în concentrații mici, fără a modifica proprietățile mecanice ale materialului. Eliberarea ionilor de argint depinde de natura și concentrația în argint din nanocompozite, precum și de matricea polimerului. Mecanismul de acțiune al argintului asupra microorganismelor nu este încă bine cunoscut, ca posibile mecanisme fiind descrise inducerea modificărilor morfologice și structurale la nivelul celulelor microbiene (Rai M., Yadav A., Gade A. **2009**. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. **27**: 76–83) prin: interacțiunea argintului cu grupele tiol (-SH) din structura enzimelor implicate în respirația celulară (Klasen HJ. **2000**. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses. *Burns*, **30**: 1–9); inhibarea procesului de replicare ADN, prin inducerea condensării moleculei de ADN (Liau SY., Read DC., Pugh WJ., Furr JR., Russell AD. **1997**. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*. **25**: 279–283); degradarea proteinelelor intracelulare și a acizilor nucleici (Knetsch MLW., Koole LH. **2011**. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers*. **3**: 340-366), generarea speciilor reactive de oxigen (ROS), ca radicalii de oxigen ( $\text{O}_2^{\cdot}$ ) sau hidroxil ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) (Danilczuk M., Lund A., Saldo J., Yamada H., Michalik J. **2006**. Conduction electron spin resonance of small silver particles.



*Spectrochim. Acta A.* **63**: 189-191), transferul direct de ioni de argint, fără intermediul unui solvent de la nanoparticulele oxidate la țintele biologice (ca membrana celulei) (Knetsch MLW., Koole LH. **2011**. New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers.* **3**: 340-366).

Compozitele polimerice care conțin argint reprezintă un interes major pentru domeniul academic și industrial. Caracterul biocid, pe termen lung, stabilitatea termică și volatilitatea scăzută sunt factori decisivi în aplicațiile medicale. Au fost dezvoltate trei tehnici pentru prepararea nanocompozitelor antimicrobiene: (i) nanoparticulele de argint sunt amestecate cu polimerul sau sunt distribuite în matricea polimerului gazdă; (ii) nanoparticulele sunt sintetizate în timpul polimerizării, o tehnică care necesită utilizarea unor polimeri activi electronic care să permită reducerea sărurilor de argint la nanoparticule de argint, și (iii) dispersia nanoparticulelor în monomer, în acest caz polimerizarea este inițiată în prezența nanoparticulelor care sunt prinse simultan în rețeaua polimerului (Balan L, Schneider R, Lougnot DJ. **2008**. A new and convenient route to polyacrylate/ silver nanocomposites by light-induced cross-linking polymerization. *Prog Org Coat.* **62**: 351-357).

Prin tratarea policlorurii de vinil (PVC) cu NaOH și AgNO<sub>3</sub> a rezultat un compozit care a inhibat complet aderența microbiană și colonizarea *P. aeruginosa*, pe o perioadă de 72 h (Balazs DJ., Triandafillu K., Wood P., Chevlot Y., van Delden C., Harms H., Hollenstein C., Mathieu HJ. **2004**. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials.* **25**: 2139-2151).

S-a demonstrat că prin amestecarea PLA cu polimeri naturali se pot îmbunătăți proprietățile de biocompatibilitate, deoarece aceștia permit o atașare mai bună a celulelor umane la substratul polimeric. Colagenul este un polimer natural, foarte des utilizat în ingineria de refacere osoasă (Wahl D.A. and Czernuszka J.T., **2006**. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *European cells and Materials.* **11**: 43-56.), la fabricarea sistemelor de eliberare controlată de medicamente (Ruszczaka Z., Friess W. **2003**. Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* doi:10.1016/j.addr.2003.08.00703). Se cunoaște utilizarea colagenului la obținerea unor fire de policlorură de vinil de uz medical cu biocompatibilitate ridicată (**RO 113648 B1**).

Se cunoaște o metodă și compoziție pentru acoperirea unui dispozitiv medical cu ajutorul unei soluții formate dintr-un polimer hidrofob, de tipul polizaharidelor și un agent de reticulare de tipul aldehydelor (**Patent U.S. 7597903 B2**).

Dezavantajul metodei de acoperire a matricilor polimerice hidrofobe cu agenți antimicrobieni constă în faptul că aceste matrici polimerice nu prezintă grupe chimice active



capabile să interacționeze cu un agent antimicrobian. După tratamentul suprafeței matricii polimerice, agentul antibacterian nu poate fi legat de matricea polimerică și în consecință nu furnizează un efect de eliberare a agentului antimicrobian. 131

Din **U.S. Patent 7314857 B2** se cunoaște o compoziție antimicrobiană pentru inhibarea formării biofilmului care cuprinde o glicoproteină care captează fierul, o polipeptidă cationică și un agent de chelare sau o glicoproteină cu rol de captare a fierului și o polipeptidă cationică. În plus, agenții activi de suprafață și compușii cuaternari de amoniu pot fi combinați avantajos cu glicoproteine cu rol de captare a fierului într-o compoziție antimicrobiană.

Din brevetul **U.S. Patent 8747882 B2** se cunoaște utilizarea unei sări a unui acid organic (benzoat sau sorbat) pentru obținerea unei soluții de acoperire antimicrobiană a unui cateter urinar hidrofilic, pentru prevenirea infecției bacteriene. pH-ul soluției antimicrobiene de acoperire poate fi controlat cu ajutorul unui citrat sau a unei soluții tampon fosfatată.

Se cunoaște de asemenea, obținerea unui cateter urinar care asigură, atât pe termen scurt cât și lung, efecte microbiocidale asupra tulpinilor de microorganisme rezistente la antibiotice. Acest cateter este constituit din poliuretan hidrofobic, polietilen vinil acetat hidrofilic și o sare de argint (**U.S. Patent 8173151 B2**).

Prezenta invenție înlătură dezavantajele datorate utilizării solvenților și a polimerilor nebiodegradabili, soluția tehnică constând în obținerea prin prelucrarea în topitură la o temperatură de 170 °C, timp de 7 minute și o viteză de 60 rpm a unui amestec pe bază de 75,6...79,6 % în greutate acid polilactic (PLA) tip 2003D (NatureWorks), 7,56...7,96 % în greutate masterbatch Lapol 108 (LAPOL, LLC, USA), 11,34...11,94 % în greutate PEG BioUltra 4000 (Sigma), 0...5 % în greutate hidrolizat de colagen (Sigma-Aldrich) și 0...0,5 % în greutate nanoparticule de argint (US Research Nanomaterials, Inc.), cu dimensiunea particulelor de 20 nm, Ag 99,99 % acoperit cu 0.2 % polivinil pirolidonă (PVP). Bionanocompozitele obținute în cadrul invenției prezintă rezistență la tracțiune, alungire la rupere, biocompatibilitate și activitate antimicrobiană, ceea ce le recomandă pentru obținerea tuburilor de dren.

Procedeele de obținere a tubului de drenare, conform invenției, constă în aceea că, într-un extruder de laborator cu un singur șneac se extrude la o temperatură de 139 ...150 °C și o viteză de 30...60 rpm 75,6...79,6 % în greutate acid polilactic (PLA), 7,56...7,96 % în greutate masterbatch Lapol 108, 11,34...11,94 % în greutate PEG, 0...5 % în greutate hidrolizat de colagen și 0...0,5 % în greutate nanoparticule de argint.

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

- a. Se utilizează materiale prietenoase mediului;
- b. Se obțin materiale biocompatibile și antimicrobiene.



- c. Procedul de obținere a compozitelor antimicrobiene și a tuburilor de dren 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 caracter antimicrobian adecvate utilizării propuse.

Compozitele obținute au fost caracterizate prin determinarea proprietăților fizico-mecanice, a proliferării celulare, comportarea la formarea biofilmului și degradabilitatea *in vitro*. Tuburile de dren au fost caracterizate prin determinarea sterilității cu oxid de etilenă. Rezultatele sunt prezentate în Tabelele 1-3 și Figurile 1-3 pe care se bazează formularea exemplelor de realizare a invenției. Rezultatele sunt discutate comparativ cu amestecul de referință și anume acidul polilactic (80 %) plastifiat cu masterbatch Lapol 108 (8 %) și PEG 4000 (12 %).

Se dau, în continuare, 3 exemple de realizare a invenției:

#### **Exemplul 1:**

Se amestecă în topitură pe un Plastograf Brabender, la temperatura de 170 °C, timp de 7 minute și 60 rpm, 38 g PLA tip 2003D, 3,8 g masterbatch Lapol 108, 5,7 g PEG cu masa moleculară 4000 g/mol și 2,5 g hidrolizat de colagen. Înainte de utilizare, acidul polilactic și masterbatch-ul se usucă într-o etuvă cu circulație de aer la temperatura de 60 °C, timp de 24 h. De asemeni, hidrolizatul de colagen se usucă într-o etuvă cu circulație de aer la temperatura de 40 °C timp de 6 h. Compozitul format din PLA plastifiat și componentul pentru îmbunătățirea biocompatibilității – hidrolizatul de colagen are următoarea compoziție de masă: 76 % PLA, 7,6 % masterbatch Lapol 108, 11,4 % PEG și 5 % hidrolizat de colagen.

Amestecul rezultat se prelucrează pe un extruder cu un șneac, la o temperatură de 150 °C, viteza de rotație de 30 rpm. Extruderul este prevăzut cu o duză care are dimensiunea  $\phi = 4$  mm și un dorn cu dimensiunea de 3 mm, utilizate pentru obținerea unui tub cu diametrul interior  $3 \pm 0,1$  mm și diametrul exterior  $4 \pm 0,1$  mm.

Amestecul rezultat prezintă o viabilitate celulară de 88,9 % - Tabelul 1, o tendință mai mare de formare a biofilmului de 18821,1 CFU/ml față de 18210,9 CFU/ml a probei martor – Tabelul 2, o rezistență la tracțiune de 16 MPa, alungire la rupere 128 % iar modul Young 1970 MPa – Tabelul 3. Amestecul nu se degradează semnificativ după 30 zile de menținere în PBS, pierderea de masă fiind de 8 %, iar pe termen scurt, înregistrează o pierdere de masă de 2,9 % - Fig. 2. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea la 8 săptămâni a țesutului subcutanat al șoarecilor din jurul locului de implantare a materialului – Fig. 3, iar tubul de dren obținut este steril.

#### **Exemplul 2.**



Se procedează conform procedurii descris în exemplul 1 și se amestecă 37,8 g PLA tip 2003D, 3,78 g masterbatch Lapol 108, 5,67 g PEG cu masa moleculară 4000 g/mol, 2,5 g hidrolizat de colagen și 0,25 g nanoparticule de argint cu dimensiunea particulelor de 20 nm se amestecă în topitură pe un Plastograf Brabender, la temperatura de 170 °C, timp de 7 minute și 60 rpm. Nanocompozitul rezultat conținând biocompatibilizator, agent de creștere a biocompatibilității, cât și agent antimicrobian - nanoparticule de argint are următoarea compoziție de masă: 75,6 % PLA, 7,56 % masterbatch Lapol 108, 11,34 % PEG, 5 % hidrolizat de colagen, 0,5% nanoparticule de argint. Amestecul rezultat se prelucrează pe un extruder cu un șnec, la o temperatură de 145 °C, viteză de rotație de 40 rpm, pentru obținerea unui tub cu diametrul interior  $3\pm 0,1$  mm și diametrul exterior  $4\pm 0,1$  mm.

Nanocompozitul rezultat prezintă o viabilitatea celulară de 93,6 % - Tabelul 1, o tendință mai redusă de formare a biofilmului de 12393,4 CFU/ml față de 18210,9 CFU/ml a probei martor – Tabelul 2, o rezistență la tracțiune de 14,1 MPa, alungire la rupere 126,6 % iar modul Young 1891 MPa – Tabelul 3. El nu se degradează semnificativ după 30 zile de menținere în PBS, pierderea de masă fiind de 8 %, iar pe termen scurt, înregistrează o pierdere de masă de 2,6% - Fig. 2. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea la 8 săptămâni a țesutului subcutanat al șoarecilor din jurul locului de implantare a materialului Fig. 3, iar tubul de dren obținut este steril.

### Exemplul 3.

Conform procedurii descris în exemplul 1 se amestecă, 39,8 g PLA tip 2003D, 3,98 g masterbatch Lapol 108, 5,97 g PEG cu masa moleculară 4000 g/mol și 0,25 g nanoparticule de argint cu dimensiunea particulelor de 20 nm. Nanocompozitul rezultat conținând atât biocompatibilizator cât și agent antimicrobian nanoparticule de argint are următoarea compoziție: 79,6 % PLA, 7,96 % masterbatch Lapol 108, 11,94 % PEG și 0,5 % nanoparticule de argint. Amestecul rezultat se prelucrează pe un extruder cu un șnec, la o temperatură de 139 °C, viteză de rotație de 60 rpm pentru obținerea unui tub cu diametrul interior  $3\pm 0,1$  mm și diametrul exterior  $4\pm 0,1$  mm. Nanocompozitul rezultat prezintă o viabilitate celulară de 98,8 % - Tabelul 1, o tendință mai redusă de formare a biofilmului de numai 8187,9 CFU/ml față de 18210,9 CFU/ml a probei martor – Tabelul 2, o rezistență la tracțiune de 32 MPa, alungire la rupere 216,8 % iar modul Young 2058 MPa – Tabelul 3. El nu se degradează semnificativ după 30 zile de menținere în PBS, pierderea de masă fiind de 5 %, iar pe termen scurt înregistrează o pierdere de masă de 1,2 % - Fig. 2. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea la 8 săptămâni a țesutului subcutanat al șoarecilor din jurul locului de implantare a materialului - Fig. 3, iar tubul de dren obținut este steril.





121

## Metode de caracterizare

Din amestecurile polimerice obținute conform procedeelelor descrise mai sus s-au obținut prin presare plăci cu dimensiunea de (150x150x1) mm și filme cu dimensiunea de (150x150x0,1) mm în vederea caracterizării fizico-mecanice și biologice. Parametrii de presare sunt: presiune de lucru: 147 bar; temperatura de presare: 175 °C, timp de preîncălzire 3...5 min; timp de presare: 5...10 min; timp de răcire: 45...50 min. Spre comparație s-a utilizat o probă martor care conține 80 g PLA 2003D, 8 g masterbatch Lapol 108 și 12 g PEG BioULTRA 4000, atât sub formă de placă și film cât și de tub, realizată în aceleași condiții ca și compozitele de mai sus.

## Rezultate obținute

### *Evaluarea in vitro a citotoxicității biocompozitelor polimerice*

Biocompatibilitatea *in vitro* a fost evaluată determinând citotoxicitatea biocompozitelor polimerice studiate, în acord cu standardul SR EN ISO 10993-5:2009, folosind metoda contactului direct cu linia celulară stabilizată obținută din fibroblaste de șoarece (linia celulară NCTC clone L929). Au fost evaluate viabilitatea și morfologia celulelor L929 tratate cu biocompozitele polimerice.

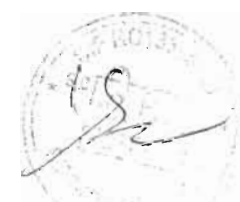
Viabilitatea celulară a fost evaluată prin analiza MTT-(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Cuantificarea viabilității celulare se realizează prin metoda spectrofotometrică și se bazează pe convertirea de succinat dehidrogenază a sării de terazoliu de tipul MTT-(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) în formazan. Cantitatea de formazan este direct proporțională cu numărul de celule viabile și este determinată spectrofotometric, după dizolvarea într-un solvent adecvat.

Morfologia celulară a fost analizată prin colorarea celulelor cu Hematoxilina-Eozina, după contactul direct al celulelor cu probele secționare cu suprafață de 0,5 cm<sup>2</sup>.

Prin metoda MTT a fost pusă în evidență viabilitatea celulelor fibroblaste stabilizate L 929, tratate 24 h și respectiv 48 h cu filmele rezultate. Determinarea viabilității celulare a fost efectuată în scopul stabilirii caracterului necitotoxic al materialelor, în funcție de care s-a stabilit biocompatibilitatea materialelor. Rezultatele viabilității celulare sunt prezentate în Tabelul 1.

**Tabelul 1:** Viabilitatea celulară pentru linia celulară NCTC clone L929 tratată cu biocompozitele polimerice comparativ cu celulele martor, la 24 h și 48 h

Cod proba	MTT 24 h, %	MTT 48 h, %
Martor de cultură (Mc)	100	100



PLA/MB/PEG (referința)	95,7	81,4
Exemplul 1	88,9	84,5
Exemplul 2	93,6	86,5
Exemplul 3	98,8	91,9
Apă oxigenată (M+)	11,0	6,7

127

Viabilitatea celulară a probelor investigate a fost de peste 80 %, comparativ cu martorul de cultură, ceea ce sugerează că acestea nu au exercitat efect citotoxic asupra celulelor fibroblaste, deci materialele sunt biocompatibile. Celulele tratate cu bionanocompozitul PLA/MB/PEG/AgNPs au înregistrat cel mai mare procent de viabilitate celulară de 98,8 % și respectiv 91,9 %, după 24 h și respectiv 48 h de contact.

Morfologia celulară a fost analizată prin colorarea celulelor cu Hematoxilina-Eozina, după contactul direct al celulelor cu probele secționate cu suprafață de 0,5 cm<sup>2</sup>. Caracterul necitotoxic al materialelor a fost confirmat și de aspectul morfologic al celulelor tratate cu bionanocompozitele enunțate anterior. Aspectul morfologic al culturii celulare, după 48 h de contact cu bionanocompozitele este prezentat în Fig. 1.

Martorul de cultură. Cultura celulară utilizată ca atare în experiment a fost cea de fibroblaste dermale de șoarece, linie celulară stabilizată – NCTC (L929 clone), al cărei aspect morfologic este dat de celule cu formă rotundă și poligonală, nucleu circular conținând 2-3 nucleoli și granulație intracitoplasmatică fină; la 48 h de experiment cultura celulară NCTC a fost preponderent în fază subconfluentă (Fig. 1f).

Aspectul celulelor aflate în contact timp de 48 h cu probele pe bază de PLA de compoziții diferite au prezentat o morfologie asemănătoare matorului de cultură, ceea ce sugerează caracterul biocompatibil al tuturor acestor probe studiate. S-au observat însă diferențe ale densității celulare în cultură, proliferarea celulelor fiind influențată de compoziția specifică fiecărei probe. Un grad mai redus de proliferare comparativ cu matorul de cultură s-a observat la celulele puse în contact cu proba PLA plastifiată (Fig. 1a), în timp ce cultura celulară aflată în contact cu proba PLA/MB/PEG/AgNPs (Fig. 1d) a avut densitatea celulară apropiată de cea a matorului de cultură.

### **Studierea biofilmului depus pe suprafața materialelor obținute - activitate antifungică**

Dezvoltarea biofilmelor monospecifice a fost realizată folosind modelul static, în plăci cu 24 de godeuri. Probele sub formă de bucăți cu suprafața de 1 cm x 1 cm (secționate din plăcile polimerice) au fost sterilizate prin expunere la oxid de etilenă. Probele au fost repartizate în godeuri iar apoi au fost acoperite complet cu 1,5 ml inocul microbial cu densitate standard, preparat pentru tulpina microfungică *Candida albicans* ATCC 10231 în Sabouraud lichid (Merck, Germania). După



126

pregătire, plăcile au fost incubate 24 h la 37 °C. După 24 h, etapa de preaderență, probele au fost spălate de trei ori cu PBS (Phosphate Buffered Saline) (Biochrom), cu scopul de a îndepărta celulele neaderate, apoi su fost replasate în mediu TSB proapăt (Tryptic Soy Broth - un mediu de uz general, folosit pentru cultivarea unei mare varietăți de microorganisme, inclusiv fungi, bacterii aerobe, anaerobe) și incubate pentru alte 24, 48 și 72 h. Cuantificarea biofilmelor formate a fost realizată cantitativ prin metoda de numărare a celulelor viabile, și anume de determinare a UFC/ml (Unități Formatoare de Colonii/ml).

După fiecare perioadă de incubare, 24 h, 48 h și respectiv 72 h, probele au fost spălate ușor cu PBS steril, pentru a nu se distruge biofilmul și apoi plasate în tuburi Eppendorf de 2 ml, care conțin câte 1 ml PBS, urmate apoi de vortexare 1 min., cu scopul de a dispersa în suspensie celulele din biofilmul format. Din suspensia formată s-au realizat microdiluții seriale succesive, apoi s-au spotat câte 10 μL, în triplicat, pe mediu agarizat de PCA (Plate Count Agar)/Sabouraud, pentru determinarea numărului de celule viabile.

Numărul de celule microbiene viabile (UFC) se determină cu relația (1):

$$\text{UFC/ml} = N \times 1/D \times 10^2 \quad (1)$$

unde:

N = media coloniilor numărate la nivelul celor trei spoturi,

$10^2$  = factorul de corecție a volumului,

D = diluția la care s-a efectuat citirea.

Activitatea antibiofilm a bionanocompozitelor polimerice a fost evaluată față de tulpina microfungică de referință *Candida albicans* ATCC 10231 (densitate ~  $0^5$ - $10^6$  UFC/ml). Biofilmul monospecific dezvoltat pe suprafața materialelor a fost evaluat la 24 h, 48 h și 72 h (Tabelul 2).

**Tabelul 2:** Numărul de celule viabile desprinse din biofilmul de *Candida albicans* ATCC 10231 dezvoltat pe PLA plastifiată, biocompozit și bionanocompozite la 24 h, 48 h și 72 h

Cod proba	24 h	48 h	72 h
PLA/MB/PEG (referința)	18210,9	10812,4	8703,2
Exemplul 1	18821,1	8705,2	6615,5
Exemplul 2	12393,4	9752,1	6305,4
Exemplul 3	8187,9	10753,4	4025,2

Rezultatele obținute din evaluările biofilmelor au arătat că materialele obținute prezintă efect antifungic, manifestat atât asupra procesului de colonizare a substratului, cât și asupra dezvoltării unui biofilm fungic matur (Tabelul 2). De asemenea, în cazul acestor materiale s-a observat că



dezvoltarea biofilmului matur de 48 h și respectiv 72 h este mai redusă, comportament dovedit de numărul mic de celule viabile incluse în biofilm.

#### *Determinarea proprietăților mecanice de tracțiune*

Proprietățile de tracțiune (rezistența la rupere, alungirea la rupere, modulul lui Young) au fost determinate conform ISO 527-2:2012. Pentru testarea epruvetelor tip halteră cu grosimea de 1 mm (plăci) a fost utilizată mașina de tracțiune INSTRON (USA) cu soft incorporat. Rezultatele raportate reprezintă valoarea medie a cinci epruvete și deviația standard.

Efectul colagenului hidrolizat și al AgNPs asupra comportamentului mecanic al PLA (rezistența la tracțiune, alungirea la rupere la tracțiune și modulul lui Young) sunt ilustrate în Tabelul 3.

**Tabelul 3:** Proprietățile de tracțiune ale probelor PLA plastifiată, biocompozitului și bionanocompozitelor obținute

<b>Cod probă</b>	<b>Rezistența la rupere la tracțiune (MPa)</b>	<b>Alungirea la rupere (%)</b>	<b>Modulul lui Young (MPa)</b>
PLA/MB/PEG (referința)	36,57 ± 2,43	245,35 ± 13,1	1837 ± 59
Exemplul 1	16 ± 3,96	127,95 ± 7,85	1970 ± 47
Exemplul 2	14,12 ± 2,95	126,58 ± 8,56	1891 ± 69
Exemplul 3	32 ± 6,8	216,84 ± 45,37	2058 ± 105

Din Tabelul 3 se observă faptul că rezistența la tracțiune scade pentru proba PLA plastifiată față de PLA de referință; de asemeni, introducerea colagenului conduce la scăderea în continuare a rezistenței la tracțiune. Introducerea nanoparticulelor de Ag nu are un efect semnificativ asupra proprietăților de tracțiune ale bionanocompozitelor obținute. Totuși, ținând cont de cerințele fizico-mecanice ale drenurilor urinare (rezistența la tracțiune la rupere trebuie să fie de minim 10 MPa, alungirea la rupere trebuie să fie de minim 100 %) se poate aprecia faptul că cele două tipuri de materiale (PLA/MB/PEG/HC/AgNPs și PLA/MB/PEG/AgNPs) îndeplinesc cerințele minime privind proprietățile de tracțiune pentru a fi utilizate în domeniul medical.

#### *Evaluarea in vitro a degradabilității biocompozitelor polimerice*

Evaluarea degradabilității biocompozitelor polimerice s-a efectuat prin imersarea eșantioanelor de (10x3x0,01) cm (obținute din filme) în PBS, pH = 7,4, la temperatura de 37 °C, pentru diferite



124

intervale de timp. Degradarea materialelor a fost evaluată prin determinarea variației de masă. Probele au fost supuse testului *in vitro* după uscarea acestora la 40 °C în etuva MEMMERT, timp de 24 h și aducerea la masă constantă. De asemenea, probele s-au uscat în etuvă la 40 °C, timp de 24 h, înainte de fiecare determinare a variației de masă.

În Fig. 2 se prezintă pierderea de masă a amestecurilor realizate la diferite interval de timp. Se observă faptul că probele care conțin colagen hidrolizat (PLA/MB/PEG/HC și PLA/MB/PEG/HC/AgNPs) înregistrează o pierdere de masă de circa 7 % după 3 zile de imersare. Aceste probe prezintă cea mai mare pierdere de masă față de probele fără colagen, probabil datorită atacului rapid al PBS-ului în spațiile dintre lanțurile polimerice, plastifiant și colagen. Pentru utilizarea pe termen scurt (24 h) a drenurilor, receptura care conține PLA plastifiată și agent antimicrobian prezintă o pierdere de masă de circa 1 %.

#### *Evaluarea in vivo a biocompozitelor polimerice*

Implantarea biocompozitelor polimerice s-a realizat după anestezierea șoarecilor cu ketamină/xilazină pentru a minimaliza durerea și disconfortul animalelor utilizate în testări. Au fost utilizați 4 șoareci tip CD1-Nude (CD1-Foxn1<sup>nu</sup>); greutate 20-25 g/șoarece (având greutatea medie de 22,5 g) per fiecare tip de material testat. Implantarea s-a realizat dorsal, prin efectuarea unei incizii și introducerea materialului de testat. Verificarea viabilității tuturor animalelor s-a efectuat cel puțin o dată pe zi, iar examinările clinice detaliate au fost efectuate și înregistrate o dată pe săptămână. Greutatea corporală a fost măsurată săptămânal. Perioada de observație a fost de 8 săptămâni. După sacrificarea animalelor, locul de implantare a biomaterialului a fost examinat pentru a evalua orice reacții tisulare adverse evidente la materialul implantat. La 8 săptămâni, imediat după sacrificare, materialul de testare s-a îndepărtat cu grijă din locul de implantare, având grijă să provoace cât mai puține daune țesuturilor adiacente. Țesuturile din locul de implatare (piele, muschi) au fost rezecate și conservate în formol tamponat (soluție de formaldehidă aproximativ 4 %) și apoi parafinate. Secțiuni de aproximativ 5 microni grosime au fost preparate din fiecare regiune de implantare a materialelor de testat sau control. Lamelele au fost colorate cu hematoxilină și eozină.

Nu au existat efecte legate de implantarea biomaterialelor asupra greutateii corporale. Toate animalele au prezentat creștere în greutate corporală normală până la sacrificare. Nu au fost observate semne clinice anormale. Nu au existat anomalii macroscopice la evaluarea la 8 săptămâni. Examinarea macroscopică a țesutului din jurul locului de implantare nu a relevat prezența hematoamelor la locul de implantare la 8 săptămâni, însă a evidențiat prezența unui țesut fibrotic de aproximativ 1 mm, inseparabil sau aderent la țesuturile din jur, încapsulând materialul testat (Fig.



3). Histopatologic, nu au fost observate modificări legate de implantarea biomaterialelor la animale. Nici o dovadă de necroză sau degenerare musculară nu a fost observată în această perioadă. 123

#### *Controlul sterilitatii*

Eșantioanele de dren se însămânțează direct în mediile de cultură astfel încât volumul produsului să nu fie mai mare de 10 % din volumul mediului de cultură. Mediile de cultură (Mediul I - Fluid thioglycollate medium și Mediul II – Sabouraud lichid) se toarnă în eprubete sterile (aprox. 10 ml), în condiții aseptice. Mediul I se regenerează timp de 20 minute la 100 °C în baie Marie și apoi se răcește brusc. Se utilizează câte două eprubete din fiecare mediu pentru o probă. Se deschide aseptice ambalajul cu proba de însămânțat. Cu o foarfecă sterilă se ridică proba din ambalaj, se taie din ea o porțiune de aprox. 1 cm și se introduce în eprubeta cu mediu. Se repetă operațiunea, în mod identic până când se termină de însămânțat tot grupul de eprubete. La terminarea lucrului, eprubetele însămânțate cu proba sterilizată se incubează timp de 7 zile, astfel: eprubetele cu Mediul I la temperatura 30 - 35 °C și eprubetele cu Mediul II la temperatura 20 - 25 °C. Eprubetele cu mediu însămânțate se examinează zilnic pe timpul incubării pentru evidențierea macroscopică a creșterii microbiene. Dacă în toate eprubetele însămânțate cu proba de analizat, mediul de cultură își păstrează transparența inițială în comparație cu proba martor pe toată durata de incubare, atunci proba examinată este sterilă. În caz contrar, proba este nesterilă.

Tuburile de dren obținute din biocompozitele polimerice au fost sterile.



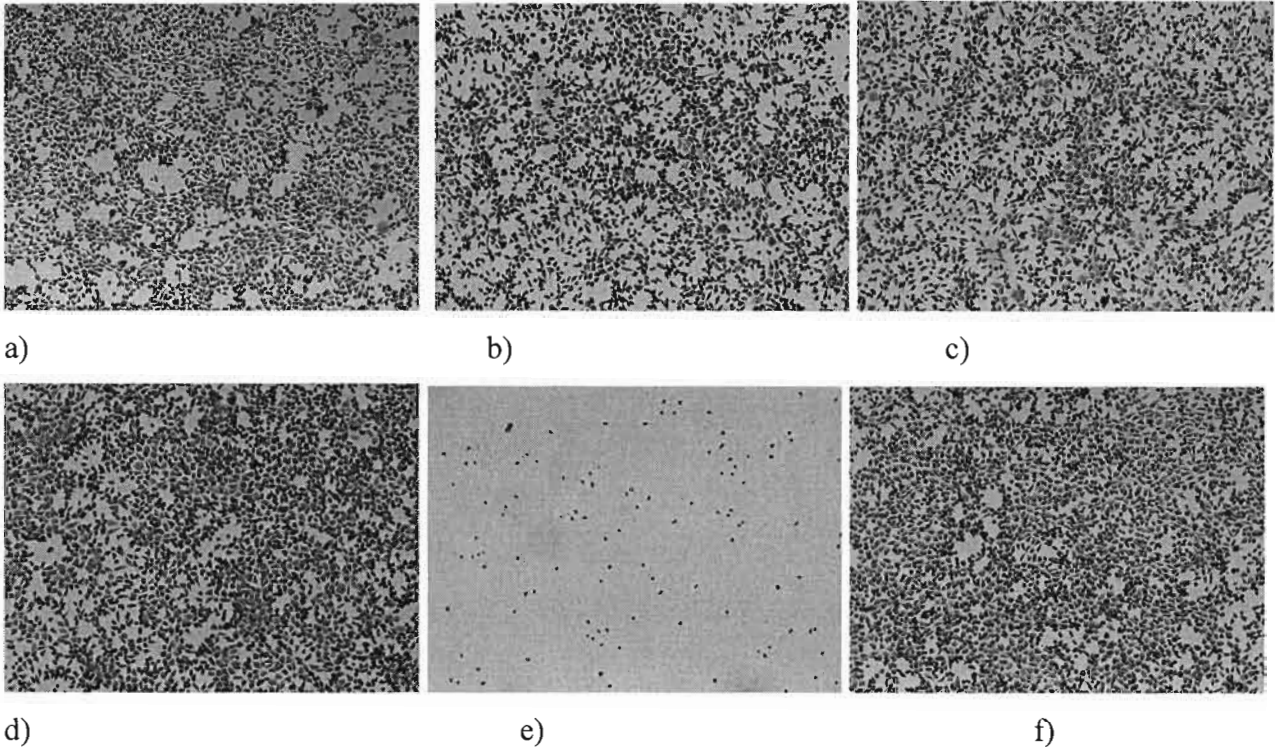
**REVENDICĂRI**

1. Bionanocompozite polimerice pe bază de acid polilactic, plastifianți, colagen hidrolizat și un agent antimicrobian, **caracterizate prin aceea că** se obțin prin prelucrarea în topitură la o temperatură de 170 °C, timp de 7 minute și o viteză de 60 rpm a unui amestec pe bază de 75,6...79,6 % în greutate acid polilactic (PLA) tip 2003D, 7,56...7,96 % în greutate masterbatch Lapol 108, 11,34...11,94 % în greutate PEG, 0...5 % în greutate hidrolizat de colagen și 0...0,5 % în greutate nanoparticule de argint, care prezintă proprietăți fizico-mecanice adecvate pentru obținerea de tub antimicrobian urinar (rezistența la rupere 16-32 MPa, alungirea la rupere de 126,5-216,8 %, modulul de elasticitate de 1891-2058 MPa, au o proliferare celulară de 88,96-98,77 %, rezistență la formare de biofilm/activitate antifungică față de *Candida albicans* ATCC 10231, sunt stabile pe termen scurt (pierdere de masă de 1,2-2,9 %), fiind totuși degradabile după un timp mai îndelungat) și nu prezintă modificări referitoare la implantarea la animale.

2. Biocompozite polimerice conform revendicarea 1, **caracterizate prin aceea că** sunt constituite din amestecuri formate din procente în greutate de 76 % PLA tip 2003D, 7,6 % masterbatch Lapol 108 și 11,4 % PEG cu masa moleculară 4000 g/mol și 5 % hidrolizat de colagen.

3. Procedeu de obținere a biocompozitelor și bionanocompozitelor pe bază de PLA, hidrolizat de colagen și nanoparticule de argint **caracterizat prin aceea că** prelucrarea are loc în topitură la o temperatură de 170 °C, timp de 7 minute și o viteză de rotație a șneului de 60 rpm. Amestecul rezultat este trecut extruder cu un șneac, prevăzut cu o duză care are diametrul,  $\phi$  de 4 mm și un dorn cu diametrul,  $\phi$  de 3 mm, la o temperatură de 135-150 °C, viteză de rotație de 30-60 rpm obținându-se în final un tub urinar cu diametrul interior  $3\pm 0,1$  mm și diametrul exterior  $4\pm 0,1$  mm.

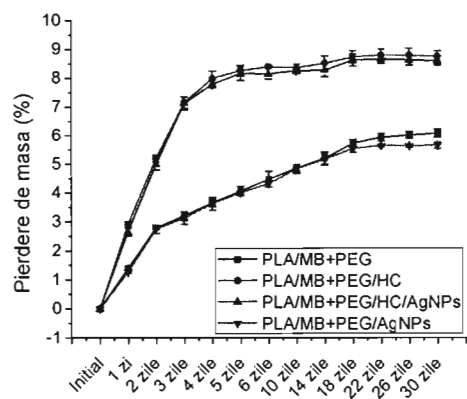




**Figura 1.** Imaginii obținute cu microscopul optic inversat (MOI) și stocate cu aparatul de fotografiat digital Axio Cam MRC, ale morfologiei celulare pentru linia L929 după 48 h  
a) PLA/MB/PEG; b) PLA/MB/PEG/HC; c) PLA/MB/PEG/HC/AgNPs; d) PLA/MB/PEG/AgNPs;  
e) Apă oxigenată 0,03 %; f) Martor de cultură. Celulele au fost fixate cu Bouin și colorate cu hematoxină-eozină. (x20)

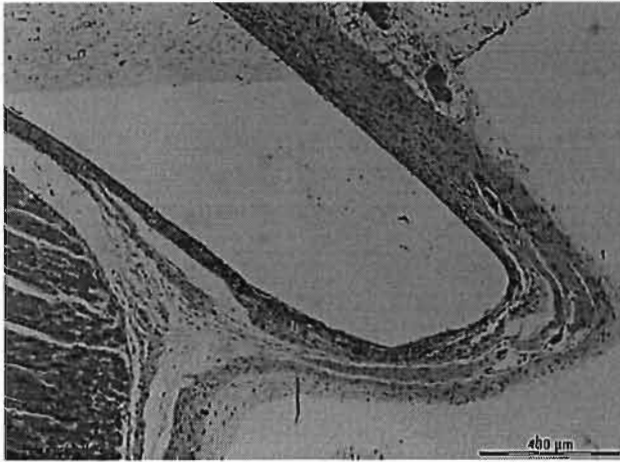


12p

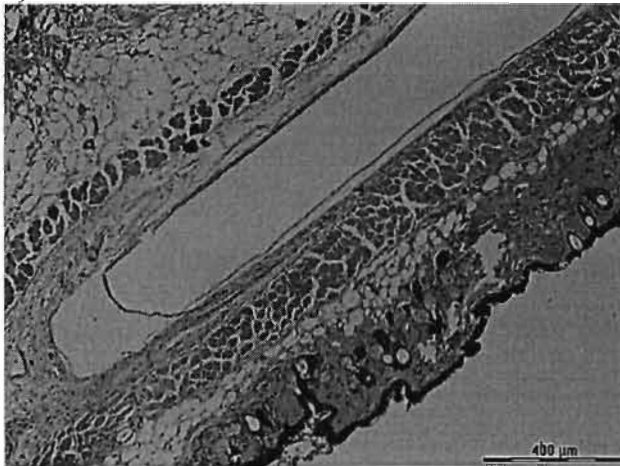


**Figura 2.** Pierdere de masă a amestecurilor imersate in PBS, timp de 30 zile

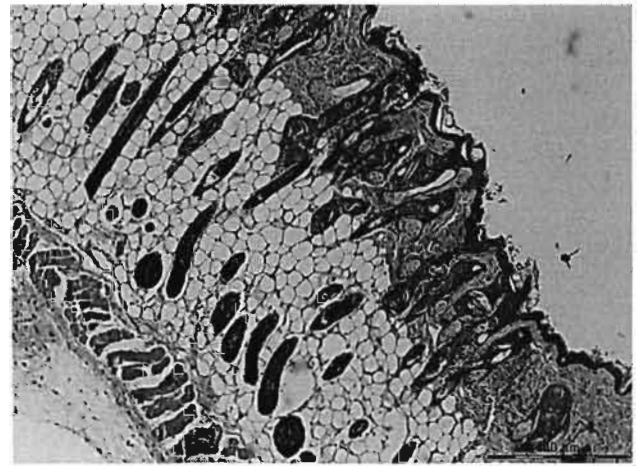




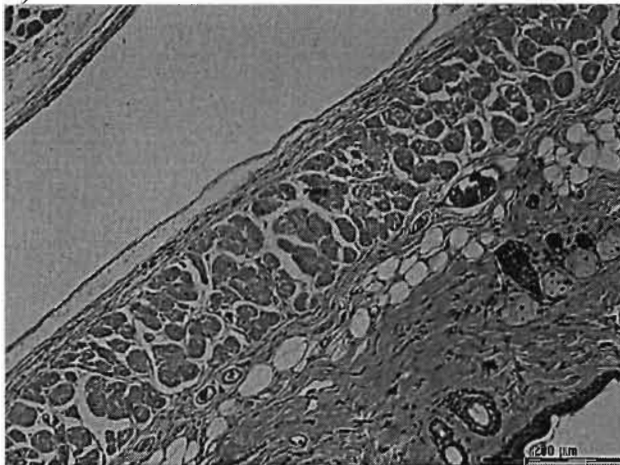
a)



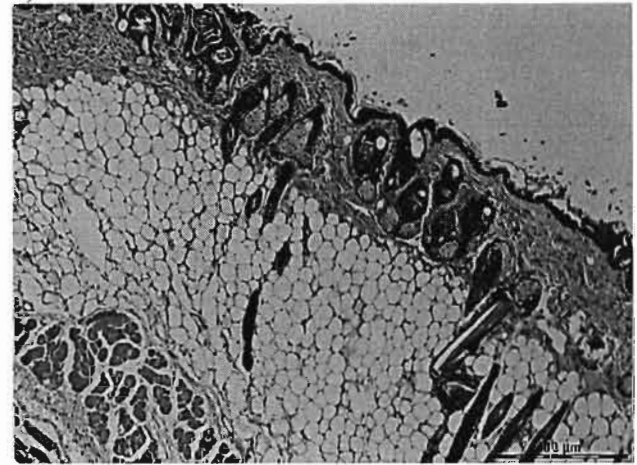
b)



c)



d)



e)

**Figura 3.** Examinarea macroscopică a țesutului subcutanat după 8 săptămâni la locul de implantare al biomaterialelor și formarea de capsule fibrotice

a) Probă control; b) PLA/MB/PEG; c) PLA/MB/PEG/HC; d) PLA/MB/PEG/HC/AgNPs; e) PLA/MB/PEG/AgNPs