



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00935

(22) Data de depozit: 29/11/2016

(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;
- UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- RĂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3, BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA NR. 43, BL. 012, SC. B, ET. 1, AP. 62, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- STĂNESCU PAUL OCTAVIAN, STR.VATRA DORNEI NR.9, BL.E 4, SC.2, AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

- GROSU ELENA, STR. ALMAȘU MARE NR. 13, BL. 57, SC. 2, ET. 2, AP. 24, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- PREDĂ PETRUȚA, BD. 1 DECEMBRIE NR. 52, BL. A2, SC. E, AP. 13, OLTENIȚA, CL, 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;
- GASPĂR-PINTILESCU ALEXANDRA, ȘOS. COLENTINA NR. 55, BL. 83, SC. A, AP. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- SECUI ANA-MARIA, BD. 1 DECEMBRIE 1918, NR. 22, BL. 3, SC. 1, AP. 28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- ȘTEFAN LAURA MIHAELA, STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 54, BL. B9, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **BIOCOMPOZITE POLIMERICE BIOCOMPATIBILE ȘI DEGRADABILE CU POTENȚIALE APLICAȚII BIOMEDICALE, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERÉ A ACESTORA**

(57) Rezumat:

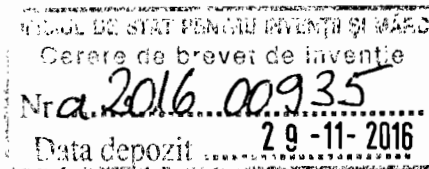
Invenția se referă la un compozit polimeric biocompatibil și degradabil, cu aplicații medicale, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Compozitul conform invenției este constituit, în procente masice, din 97...98% polihidroxiubutirat-co-valerianat, 1% vitamina E și 1...2% celuloză bacteriană. Procedeu conform invenției constă în prelucrarea în topitură a materiilor prime, la o temperatură de 180°C, timp de

amestecare de 6 min și o viteză de rotație de 40 rpm, urmată de presarea amestecului la cald la 185°C și o presiune de 147 bari, rezultând filme cu dimensiunea de 200 x 200 x 0,1 mm, stabile, având o viabilitate celulară 86,67...94% la 24 h, citocompatibile, biocompatibile și cu degradare controlată în timp.

Revendicări: 2

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 INVENTIEI

BIOCOMPOZITE POLIMERICE BIOCOMPATIBILE SI DEGRADABILE CU POTENTIALE APLICATII BIOMEDICALE SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Polihidroxiacanoatii (PHA) reprezinta o clasa importanta de biopoliesteri sintetizati din mai mult de 300 de specii de bacteria Gram-pozitive si Gram-negative.

In general, polihidroxiacanoatii se impart in doua grupe mari: PHA cu lungime scurta a lantului macromolecular (scl-PHAs), care contin unitati de monomer cu 3-5 atomi de carbon si PHA cu lungime medie a lantului macromolecular (mcl-PHAs) care contin unitati monomerice cu 6-18 atomi de carbon. Cei mai cunoscuti reprezentanti ai clasei PHA sunt: poli(3-hidroxiacetat) (P3HA) si poli(3-hidroxiacetat-co-valerianat) (P(3HA-co-3HV)). Aceste materiale prezinta proprietati mecanice comparabile cu polipropilena si polietilena, insa au o alungire la rupere mai mica si sunt mai fragili.

Pentru prima data, Lemoigne a izolat si caracterizat poli-3-hidroxiacetat (P(3HA)) din bacterii, intre anii 1923 si 1927 si a aratat ca din acest extract se poate obtine un film transparent. In 1959, a avut loc prima etapa de comercializare a sa, cand W.R. Grace & Company a brevetat un process de productie a P(3HA) utilizand bacterii (US Patent 3225766 (A)), desi slaba stabilitate termica si lipsa unei tehnologii de extractie au limitat aceasta aplicare [1].

Polihidroxiacetat (PHB) are proprietati biodegradabile si biocompatibile remarcabile, iar proprietatile sale fizico-mecanice pot fi imbunatatite prin modificarea compozitiei. PHB poate fi prelucrat asemanator materialelor termoplastice, este rezistent la apa, putand astfel fi utilizat pentru obtinerea unor materiale similare celor obtinute din materiale plastice conventionale. Prezinta o rezistenta mai buna la degradarea la UV fata de polipropilena, toxicitate redusa datorita faptului ca se degradeaza *in vivo* la acidul 3-hidroxiacetaric, un metabolit intalnit in componenta sangelui uman [2], dar este mai putin rezistent la actiunea solventilor. PHB prezinta temperatura de topire (T_m) in domeniul $174^{\circ}\text{C} - 180^{\circ}\text{C}$, un grad de cristalinitate mare (X_c) (60 pana la 70 %), si temperatura de tranzitie sticloasa (T_g) de 5°C [3]. Aceasta combinatie de T_g si cristalinitate inalta conduce la obtinerea de filme si materiale plastice foarte fragile.



PHB singur nu indeplineste toate specificatiile tehnice pentru utilizarea ca biomaterial in aplicatii medicale si ale ingineriei tisulare. Prin urmare, amestecarea PHB cu alti polimeri si aditivi este o strategie buna pentru fabricarea dispozitivelor medicale resorbabile, cum ar fi: fire de sututa chirurgicala, mese, grefe vasculare, esofag artificial, regenerarea nervilor, scaffolduri pentru ingineria tisulara, regenerarea pielii, cartilagii, eliberarea controlata a medicamentului [4-7].

In aplicatiile de inginerie tisulara este foarte important ca viteza de degradare a scaffold-urilor din PHA sa fie egala cu cea de regenerare a tesuturilor. Degradarea *in vitro* a poli-3-hidroxiocetanoatului a fost studiata prima data de catre Marois et al. [8] in apa si solutie de tampon fosfat. S-a raportat ca polimerul prezinta o simpla degradare hidrolitica, care incepe in regiunile amorfe urmata de domeniile cristaline. Aceasta degradare hidrolitica a fost caracterizata prin absorbtia de apa, scaderea masei moleculare si pierderea neglijabila a masei dupa 24 luni de incubare.

Se cunoaste faptul ca pentru imbunatatirea proprietatilor PHB se prefera utilizarea copolimerului sau, a polihidroxiobutirat-co-valerianatului (PHBV). In 1970, Imperial Chemical Industries Ltd. comercializeaza produsul P(3HB-co-3HV) sub numele de Biopol™ - un material termoplastic biodegradabil produs prin utilizarea bacteriei *Alcaligenes eutrophus*. In mod frecvent, diferite companii mici produc PHBV, de exemplu Copersucar-Biocycle (PHB Industrial-Brazil) produce PHBV (cu un continut de polihidroxi valerianat de 12%) din melasa de zahar, cu o cristalinitate de 45 % [9]. Recent, Procter&Gamble a inceput dezvoltarea de copolimeri ai PHB, polihidroxiobutirati-co-hidroxi alcanoati.

Copolimerii cu lungime scurta a lantului macromolecular, cum ar fi P(3HB-co-3HV) sunt utilizati cu prioritate fata de homopolimerii cu lungime scurta a lantului macromolecular deoarece prezinta temperatura de topire si cristalinitate mai mici, sunt mai usor de procesat in matrita si mai dure [10]. Proprietatile materialelor biodegradabile pot fi ajustate prin variatia continutului de hidroxivalerianat. O crestere a continutului de hidroxivalerianat conduce la cresterea rezistentei la impact si scaderea temperaturii de topire si tranzitie sticloasa [11], a cristalinitatii [12], a permeabilitatii la apa [11] si a rezistentei la tractiune [13].

Polihidroxi alcanoatii cu lungime medie a lantului macromolecular (mcl-PHA) actioneaza ca elastomeri intr-un domeniu ingust de temperatura, datorita temperaturii mici de topire a acestora



(39 – 61 °C). Temperatura lor de tranziție sticloasă este, de obicei, sub temperatura camerei (-43 până la -25 °C) iar gradul de cristalinitate este de circa 25 % [14].

Chiar dacă polihidroxicanoatii sunt recunoscuți ca fiind buni candidați pentru înlocuirea polimerilor de origine petroliera, utilizarea acestora într-un domeniu vast de aplicații este limitată datorită pretului de cost mare. Pretul de cost al polihidroxicanoatilor este de circa 15 ori mai mare față de cel al polimerilor convenționali, cum ar fi polipropilena [15].

Diverse amestecuri ale polihidroxicanoatilor au fost dezvoltate cu scopul de reducere a pretului de cost și de îmbunătățire a performanței PHA.

Amestecul PHA cu acid polilactic (PLA) este unul dintre cele mai studiate amestecuri, deoarece PHB și copolimerul său (PHBV) prezintă o structură chimică și procesare în mod similar cu PLA. Se cunoaște faptul că amestecarea polihidroxicanoatilor și a acidului polilactic (PLA) cu fibre celulozice conferă compozitului polimeric proprietăți mecanice bune (rezistență, rigiditate, duritate), precum și cost scăzut [16-18].

Se cunosc nanocompozite obținute din copolimerul PHB (PHBV) cu nanoceluloză [19], membrane ale compozitului PHB cu celuloză bacteriană (BC) [20] și amestecuri ale PHB cu etil celuloză [21].

Se cunosc, de asemenea, compozite ale poli(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-hexanoatului) P(3HB-co-3HHx) cu hidroxiapatită care sunt preparate prin separarea de fază și sublimarea ulterioară a solventului. Compozitul obținut prezintă o adeziune a celulelor și o proliferare celulară mai bună față de copolimerul P(3HB-co-3HHx) [22].

Se cunosc membrane hibride cu aplicație potențială în domeniul medical preparate prin tehnica electrospinning utilizând un amestec al soluțiilor de PHBV și chitosan [23].

De asemenea se cunosc nanocompozite ale PHBV obținute în soluție prin adăugarea de diverse cantități de nanoparticule modificate organic sau nemodificate, cum ar fi montmorilonitul Cloisite 30B [24].

Aceste compozite și amestecuri polimerice prezintă dezavantajul că se obțin cu ajutorul solventilor, la nivel de laborator.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea de biocompozite biocompatibile și degradabile, pe baza de un copolimer al polihidroxi-butiratului și celuloză bacteriană prin amestecarea în topitură, pe utilaje asemănătoare celor folosite la procesarea polimerilor convenționali.



Compoziția polimerică pe baza de polihidroxi-butirat-co-valerianat și celuloza bacteriană pentru obținerea compozitelor polimerice biocompatibile și degradabile, conform invenției, înlătură dezavantajele produselor cunoscute, prin aceea că sunt constituite dintr-un amestec format din: 97...98 % PHBV, 1% vitamina E și 1...2 % BC, procentele fiind exprimate în procente în greutate.

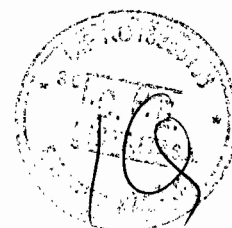
Procedeeul de obținere a compozitelor polimerice biocompatibile, conform invenției, constă în aceea că, prelucrarea amestecului polimeric se bazează pe aducerea materialelor prime în stare topită pe un Plastograf Brabender, prevăzut cu o cameră de amestecare de 50 cm³, la o temperatură de 180 °C, timp de amestecare 6 min., și o viteză a șnecurilor de 40 rotații pe minut. Înainte de utilizare, polihidroxi-butirat-co-valerianatul (PHBV) și celuloza bacteriană (BC) se usucă într-o etuvă cu circulație de aer, la temperatura de 50°C, timp de 3 h. Amestecul topit și omogenizat se presează la cald pe o presă de laborator în următoarele condiții: preîncalzire - timp de 5 minute, temperatura de 185 °C, presare - timp de 10 minute, temperatura de 185 °C și presiunea de 147 bari și răcire - timp de 20 minute și presiune de 147 bari în vederea obținerii de filme omogene, subțiri, cu dimensiunea 200x200x0,1 mm. Din acestea s-au prelevat epruvete pentru efectuarea testelor privind proprietățile biologice și fizico-chimice.

Invenția, conform descrierii de mai sus, prezintă **avantajul** că se obțin biocompozite pe baza de polihidroxi-butirat-co-valerianat, celuloza bacteriană și vitamina E care prezintă biocompatibilitate și degradabilitate adecvate utilizării pentru aplicații biomedicale.

Pentru obținerea biocompozitelor obținute în prezenta invenție s-au utilizat următoarele materii prime:

- Biopolimerul polihidroxi-butirat-co-valerianat (PHBV), conținând 12% polihidroxi-valerianat (PHV), achiziționat de la GoodFellow, UK - matrice polimerică; prezintă proprietăți similare cu poliolefinele, densitate 1,25 g/cm³, alungire la rupere 35 %, rezistența la tracțiune la rupere 23 MPa.
- Vitamina E ($\pm\alpha$ -Tocopherol), achiziționată de la Sigma-Aldrich – agent bioactiv, prezintă densitatea 0,95 g/cm³.
- Celuloza bacteriană (BC), sintetizată de Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Chimico-Farmaceutică București - sub formă de pulbere fină.

Celuloza bacteriană (BC) este obținută din resurse regenerabile și se caracterizează prin proprietăți favorabile, cum ar fi: remarcabile proprietăți mecanice, porozitate, absorbție de apă,



biodegradabilitate si excelenta afinitate biologica. Celuloza bacteriana poate fi considerata un material ideal pentru tratarea ranilor si arsurilor, realizarea vaselor artificiale de sange, scaffolduri pentru ingineria tisulara *in vitro* [25].

In continuare, se prezinta doua exemple de biocompozite polimerice biocompatibile si degradabile si procedeul de realizare a acestora, conform inventiei.

Exemplul 1:

Se amesteca in topitura pe un Plastograf Brabender, prevazut cu o cuva de amestecare de 50 cm³, la temperatura de 180 °C, timp de 6 minute si 40 rpm, 49 g PHBV (continand 12% PHV), 0,475 ml vitamina E si 0,5 g celuloza bacteriana. Inainte de utilizare, PHBV si celuloza bacteriana (BC) s-au uscat intr-o etuva cu circulatie de aer la temperatura de 50°C, timp de 3 h. Compozitul format din PHBV, vitamina E si celuloza bacteriana are urmatoarea compozitie de masa: 98 % PHBV, 1 % vitamina E si 1 % celuloza bacteriana. Amestecul obtinut se preseaza pe o presa de laborator in urmatoarele conditii: preincalzire - timp de 5 minute, temperatura de 185 °C, presare - timp de 10 minute, temperatura de 185 °C si presiunea de 147 bari si racire - timp de 20 minute si presiune de 147 bari in vederea obtinerii de filme omogene, subtiri, cu dimensiunea 200x200x0,1 mm. Amestecul rezultat este codificat PHBV/BC 1% si prezinta: o viabilitate celulara de 86,67 % la 24 h (Tabelul 1), citocompatibilitate (Tabelul 2), un continut de ADN total de 87,34 % (Tabelul 3), o concentratia de colagen secretata de catre celulele NCTC cultivate cu aceasta varianta de material de 0,434 mg/mL (Tabelul 5) si o pierdere de masa de 0,82 % (Tabelul 7).

Exemplul 2.

Se procedeaza conform procedeului descris in exemplul 1 si se amesteca in topitura pe un Plastograf Brabender, 48,5 g PHBV (12% PHV), 0,475 ml vitamina E si 1 g celuloza bacteriana. la temperatura de 180 °C, timp de 6 minute si 40 rpm. Biocompozitul format din PHBV, vitamina E si celuloza bacteriana are urmatoarea compozitie de masa: 97 % PHBV, 1 % vitamina E si 2 % celuloza bacteriana. Amestecul obtinut se preseaza pe o presa de laborator in urmatoarele conditii: preincalzire - timp de 5 minute si temperatura de 185 °C, presare - timp de 10 minute, temperatura de 185 °C si presiunea de 147 bari si racire - timp de 20 minute si presiune de 147 bari in vederea obtinerii de filme omogene, subtiri, cu dimensiunea 200x200x0,1 mm. Amestecul rezultat este codificat PHBV/BC 2% si prezinta: o viabilitate celulara de 94 % la 24 h (Tabelul 1), citocompatibilitate (Tabelul 2), un continut de ADN total de 89,2 % (Tabelul



3), o concentrația de colagen secretată de către celulele NCTC cultivate cu această variantă de material de 0,479 mg/mL (Tabelul 5) și o pierdere de masă de 1,12 % (Tabelul 7).

Rezultatele sunt prezentate în Tabelele 1 - 8 și Figurile 1 - 3 pe care se bazează formularea exemplilor de realizare a invenției. Rezultatele sunt discutate comparativ cu amestecul de referință și anume polihidroxi-co-valerianat (99 %) și vitamina E (1%), codificat PHBV.

Metode de caracterizare

Evaluarea citotoxicității biocompozitelor polimerice

Citotoxicitatea biocompozitelor polimerice a fost evaluată conform standardului SR EN ISO 10993-5:2009, folosind metoda contactului direct cu linia celulară stabilizată obținută din fibroblaste de soarece (linia celulară NCTC clona L929). Prin această metodă au fost evaluate: viabilitatea și morfologia celulelor L929 tratate cu biocompozitele polimerice.

Viabilitatea celulară a fost evaluată utilizând metoda reducerii sării de tetrazoliu (MTT-(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)). Celulele au fost cultivate în *Mediu Esențial Minimal* (MEM) care conține 10 % ser fetal bovin (Sigma, USA) și 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL streptomicina și 500 μg/mL neomicina. Suspensiile celulare cu densitatea de 4×10^4 celule/mL au fost adăugate în plăci cu 24 de godeuri și incubate 24 h la 37 °C, în condiții de umiditate și 5 % CO₂. Compozitele polimerice au fost adăugate în godeuri, iar plăcile au fost incubate în condiții standard 24h și 48h. Experimentul a fost realizat în triplicat. La sfârșitul perioadei de incubare, mediul de cultură a fost înlocuit cu soluție MTT iar plăcile au fost incubate 3 h la 37 °C. Soluția MTT a fost înlocuită cu izopropanol, urmând o agitare ușoară pentru solubilizarea cristalelor de formazan. Cuantificarea viabilității celulare s-a realizat prin metoda spectrofotometrică care se bazează pe convertirea de către dehidrogenazele celulelor metabolice active în formazan care este solubil în mediul de cultură. În cadrul testului s-a înregistrat densitatea optică pentru formazan ($\lambda = 570$ nm), utilizând un spectrofotometru de microplăci, Berthold Mithras LB 940 (Germania). Celule netratate cu compozite biopolimerice au servit ca martor de control, cu 100 % viabilitate celulară. În calitate de martor pozitiv s-a utilizat soluție de apă oxigenată, în concentrație de 0,003 %.



Rezultatele viabilitatii celulare pentru linia celulara NCTC clone L929 tratata cu biocompozitele polimerice comparativ cu martorul de cultura si martorul pozitiv, la 24 h și 48 h sunt prezentate in Tabelul 1.

Tabelul 1

Cod proba	MTT 24 h, %	MTT 48 h, %
Referinta	96,33	104,77
Exemplul 1	86,67	100,48
Exemplul 2	94,00	98,81
Martor de cultura	100	100
Martor pozitiv (Apa oxigenata)	11,0	6,7

Biocompozitele polimerice testate au condus la un procent foarte bun de viabilitate celulara, acest lucru indicand un grad ridicat de biocompatibilitate in conformitate cu scala de citotoxicitate (viabilitate celulara de peste 80 % semnifica efect necitotoxic, biocompatibilitate).

Examinarea **morfologiei celulare** a fost efectuata prin cultivarea a 1 mL de mediu cu celule de densitate 4×10^4 celule/mL in placi cu 12 godeuri. Dupa 24 h de incubare in conditii standard (pentru aderarea celulelor in godeuri si formarea monostratului) a fost adaugat mediu proaspat si biocompozitele polimerice cu suprafata de $0,5 \text{ cm}^2$, apoi placile au fost incubate 48h in aceleasi conditii. Ulterior, dupa indepartarea probelor polimerice, celulele au fost fixate in Bouin si colorate cu hematoxilina-eozina. Culturile au fost vizualizate prin microscopie optica cu ajutorul microscopului inversat Carl Zeiss Axio Observer D1, iar imaginile au fost stocate folosind aparatul de fotografiat digital, Axio Cam MRC (Germania).

Aspectul morfologic al culturii celulare, dupa 48 h de contact cu biocompozitele polimerice este prezentat in Fig. 1.



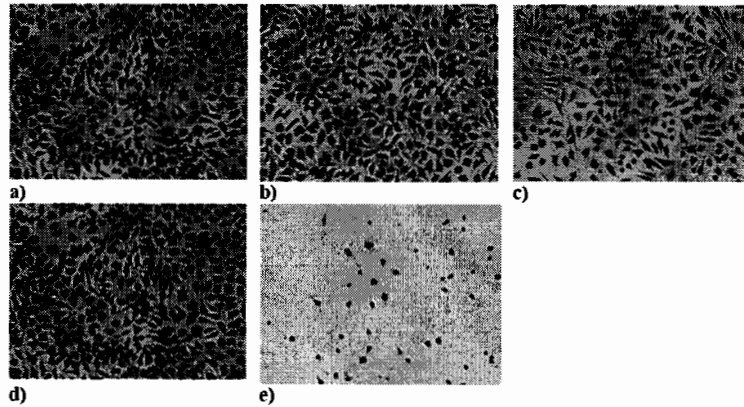


Figura 1. Imagini obținute cu microscopul optic inversat (MOI) și stocate cu aparatul de fotografiat digital Axio Cam MRC ale morfologiei celulare pentru linia L929 după 48 h. Celulele au fost fixate cu Bouin și colorate cu hematoxilina-eozina (x20)

a) Referința; b) PHBV/BC 1%; c) PHBV/BC 2%; d) Martor de cultura; e) Martor pozitiv

Martorul de cultura prezintă aspect morfologic caracteristic liniei celulare stabilizate de tip NCTC, alcătuită din celule fibroblaste de formă rotundă și poligonală; la 48 h cultura celulară NCTC se află în fază aproape confluentă. La 48 h de la adăugarea probelor în godeuri, cultura celulară aflată în contact cu referința (PHBV) și biocompozitele pe baza de PHBV și celuloză bacteriană prezintă caracteristicile morfologice specifice liniei celulare tip NCTC, faza de creștere celulară este aproape de confluentă (Fig. 1), în concordanță cu rezultatele obținute pentru viabilitatea celulară, determinată prin metoda MTT. Cultura celulară aflată în contact cu martorul pozitiv, soluția de apă oxigenată (0,003 %), la 48 h prezintă degradare celulară evidentă, morfologia celulelor este total schimbată, celulele având formă sferică și dimensiuni diminuate, membranele celulare sunt alterate iar conținutul intracitoplasmatic este distrus.

Evaluarea proliferării celulare prin analiza ciclului celular

Studiul proliferării celulare s-a efectuat prin analiza ciclului celular prin citometrie în flux. Ciclul celular cuprinde ansamblul evenimentelor biochimice și morfologice responsabile de proliferarea celulară și este divizat în patru faze: G1, S, G2 (interfază) și M (mitoză).

Modificările observate în dinamica ciclului celular, între fracțiile celulare aflate în fazele G0/G1, S și G2/M se bazează pe măsurarea conținutului în ADN, reprezentat ca histogramă de fluorescență în probele celulare recoltate după 24 h de tratament cu biocompozitele de testat.

Pentru analiza ciclului celular, fibroblaste de soarece NCTC clona L929 (provenită din Colectia Europeană de Culturi Celulare - ECACC) au fost însemantate în plăci de cultură cu 6 de



godeuri, la o densitate celulara de 5×10^4 celule/mL. Linia celulara NCTC a fost cultivata in mediu MEM suplimentat cu 10 % ser fetal bovin si 1 % antibiotice (penicilina-streptomicina-neomicina), fiind mentinuta la 37°C, intr-o atmosfera umeda cu 5 % CO₂ si apoi tratata cu biocompozitele de testat. Dupa 24 h, celule au fost tripsinizate si fixate in etanol 70 %, apoi depozitate peste noapte, la 4 °C.

Celulele au fost apoi spalate cu PBS (Phosphate Buffered Saline) si incubate cu RNaza A (0,5 mg/mL) la 37 °C timp de 30 min. A urmat marcarea celulelor ce s-a realizat prin incubarea acestora cu iodura de propidiu (100 µg/mL), la 4°C, timp de 30 de minute. Analiza secvențialitații ciclului celular s-a efectuat cu ajutorul citometrului in flux LSR II (Becton Dickinson) iar estimarea continutul de ADN celular a fost cuantificat cu ajutorul softului ModFit.

Histogramele obtinute in urma analizei ciclului celular a celulelor tratate cu biocompozitele obtinute sunt prezentate in Fig. 2.

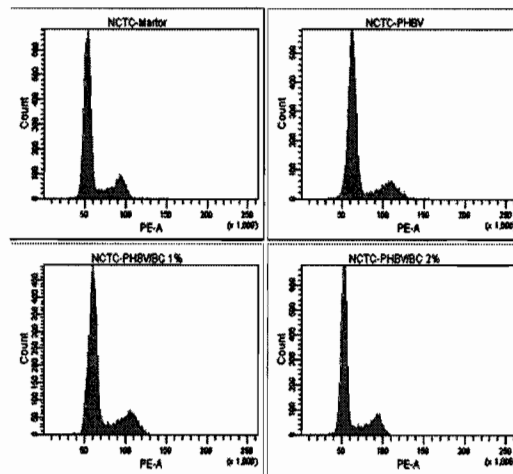


Figura 2. Histogramele ciclului celular ale celulelor cultivate in prezenta filmelor de PHBV si PHBV cu diferite concentratii de celuloza bacteriana

Se observa ca in cazul tuturor probelor analizate, histogramele ciclului celular sunt similare histogramei martorului. Rezultatele obtinute la distributia celulara in fiecare faza a ciclului celular a celulelor tratate cu PHBV si biocompozitele PHBV/BC sunt prezentate in Tabelul 2.

Tabelul 2

Cod proba	G0/G1	S	G2/M
Martor de control	73,35	13,57	12,87
Referinta	70,65	15,51	14,21



Exemplul 1	70,74	15,92	13,65
Exemplul 2	71,89	15,75	13,62

Analiza distributiei celulare in fazele ciclului celular releva faptul ca tratamentul cu PHBV si compozitele pe baza de PHBV si celuloza bacteriana, timp de 24 h, nu a afectat ritmul de progresie celulara normal al celulelor NCTC. Comparativ cu martorul, s-a observat o usoara diminuare a fractiei celulare aflate in faza G0/G1 concomitent cu cresterea fractiei celulare in faza S. Astfel, distributia celulara in faza G0/G1 este de 73,35 % pentru cultura martor, iar in cazul probelor aceasta variaza intre 70,65 % (PHBV) si 71,89 % (PHBV/BC 2 %). Simultan, are loc o crestere a fractiei celulare aflate in faza S ce variaza intre 15,51% (PHBV) si 15,92 % (PHBV/BC 1%), comparativ cu martorul (13,57 %).

Rezultatele obtinute in urma analizei ciclului celular prin citometrie in flux au aratat ca celulele cultivate in prezenta compozitelor pe o perioada de 24 h prezinta o distributie in fazele ciclului celular similara martorului, fapt ce sugereaza ca tratamentul nu a afectat cresterea si proliferarea celulara. Faza G0/G1 este o faza foarte importanta din timpul ciclului celular deoarece determina o celula sa intre sau nu in diviziune. In timpul fazei G1, celulele cresc in marime si sintetizeaza ARN si proteinele necesare pentru sinteza de ADN si dureaza aprox. 1/3 din durata intregului ciclu celular. Valorile obtinute in acest experiment nu indica blocarea celulelor in nici o faza a ciclului celular. Astfel, biocompozitele testate sunt citocompatibile si permit mentinerea ritmului normal de crestere al celulelor.

Determinarea continutului de ADN total

Continutul de ADN este direct proportional cu numarul de celule (considerand 8 pg ADN per celula) si, prin urmare, metoda este folosita pentru determinarea proliferarii celulare. Celulele fibroblaste din linia celulara NCTC clona L929 au fost incubate in prezenta probelor testate: PHBV, PHBV/BC 1% si PHBV/BC 2 %, timp de 5 zile, in conditii standard de cultivare. Apoi, mediul de cultura a fost indepartat, celulele s-au spalat cu PBS, pH 7,4, dupa care au fost incubate intr-un tampon de liza celulara (citrat de sodiu salin 30 mM (SSC) si SDS 0,2 mg/mL), la 37 °C, timp de 1 h cu agitare usoara. Ulterior, 10 µL de supernatant s-au utilizat pentru determinarea continutului de ADN folosind kitul Quant-iT dsDNA HS (Invitrogen), conform instructiunilor producatorului. Peste cei 10 µL de supernatant s-au adaugat 190 µL de solutie de lucru, probele au fost incubate 2 min. la temperatura camerei, dupa care s-a masurat fluorescenta



fiecarei probe la fluorimetrul Qubit. Rezultatele s-au raportat la continutul in ADN al martorului de cultura (celule cultivate in absenta probelor) si considerand ca martorul de cultura netratat a avut o proliferare celulara de 100 %. Comportamentul celulelor din punct de vedere al proliferarii a fost evaluat prin determinarea fluorimetrica a continutului in ADN din lizatul celular recoltat la sfarsitul perioadei de cultivare. Rezultatele obtinute privind continutul de ADN al celulelor fibroblaste clona L929 cultivate in prezenta filmelor de PHBV si respectiv PHBV/BC, timp de 5 zile sunt prezentate in Tabelul 3. Rezultatele sunt calculate ca medie a 3 determinari \pm SD.

Tabelul 3

Proba	Continut in ADN celular (%)
Cultura martor	100 \pm 2,5
Referinta	80,04 \pm 1,2
Exemplul 1	87,34 \pm 3,4
Exemplul 2	89,2 \pm 1,6

Rezultatele privind continutul in ADN al celor 2 probe pe baza de PHBV si celuloza bacteriana au variat intre 87,34% pentru proba PHBV/BC 1 % si 89,2 % pentru proba PHBV/BC 2 % (Tabelul 3). Aceste rezultate indica faptul ca biocompozitele pe baza de PHBV au stimulat proliferarea celulara dupa 5 zile de cultivare in conditii standard.

Analiza viabilitatii celulare prin citometrie in flux

Viabilitatea celulelor cultivate in prezenta filmelor polimerice s-a analizat si prin citometrie in flux, cu ajutorul kitului Live and Dead conform recomandarilor producatorului (Thermo Fisher Scientific). Aceasta tehnica permite discriminarea celulelor vii de celulele moarte, prin marcarea simultana cu calceina (compus cu fluorescenta verde, marker al activitatii esterazice celulare ce caracterizeaza celulele vii) si bromura de etidiu (compus cu fluorescenta rosie, marker al deteriorarii membranei celulare ce caracterizeaza celulele moarte) si analiza acestora prin citometrie in flux.

Astfel, fibroblaste de soarece NCTC (clona L929) au fost insamantate in placi de cultura cu 6 de godeuri, la o densitate celulara de 5×10^4 celule/mL. Celulele NCTC au fost cultivate in mediu MEM suplimentat cu 10 % ser fetal bovin si 1 % antibiotice (penicilina-streptomicina-neomicina), fiind mentinute la 37 °C, intr-o atmosfera umeda cu 5 % CO₂. La 24 h de la insamantare, acestea au fost tratate cu biocompozitele de testat. Dupa 24 h, celule au fost



tripsinizate si apoi spalate cu PBS. A urmat marcarea celulelor, ce s-a realizat prin incubarea acestora cu calceina si bromura de etidiu, timp de 15 min. Celulele au fost spalate si reluate in PBS. Analiza viabilitatii celulare s-a realizat cu ajutorul citometrului in flux LSR II (Becton Dickinson) si a softului FACSDiva.

Viabilitatea celulelor apartinand liniei NCTC cultivate in prezenta biocompozitelor pe baza de PHBV, analizata prin citometrie in flux este prezentata in Tabelul 4.

Tabelul 4

Cod proba	Viabilitatea celulelor, %
Martor	100
PHBV	97,5
PHBV/BC1%	97,0
PHBV/BC2%	97,1

Rezultatele prezentate in Tabelul 4 arata ca dupa tratamentul celulelor cu biocompozitele pe baza de PHBV si BC, timp de 24 de ore, acestea si-au mentinut viabilitatea la acelasi nivel cu o cultura de celule martor (100%), deci biocompozitele sunt biocompatibile.

Dozarea colagenului

Determinarea influentei imuno-histo-chimice a materialelor studiate asupra sintezei componentilor matricei extracelulare pe celule in culturi prin metode spectrofotometrice s-a realizat prin dozarea colagenului secretat de celule in prezenta biomaterialelor studiate.

Celulele liniei NCTC (clona L929) provin din tesut conjunctiv subcutanat murin si au capacitatea de a sintetiza fibre de colagen [26].

Celulele liniei NCTC (5×10^4 celule/mL) au fost incubate in prezenta materialelor studiate, la 37 °C, timp de 5 zile. Supernatantele celulare au fost recoltate si stocate la -20 °C, fiind utilizate ulterior pentru dozarea colagenului total si a colagenului tip I.

Dozarea colagenului total

Concentratia de colagen secretata de catre celulele NCTC cultivate cu variantele de material s-a determinat folosind metoda Sircol [27] Aceasta se bazeaza pe abilitatea colorantului Sirius Red de a se lega de aminoacizii constituinti ai colagenului, formand un complex, care va precipita. Astfel peste 100 µL proba s-a adaugat 1 mL de reactiv (Sirius Red 0,1 % dizolvat intr-o solutie de acid picric saturat) si s-a incubat sub agitare continua, timp de 45 min. Apoi probele



s-au centrifugat la 10000 rpm, timp de 10 min. Supernatantele s-au inlaturat, iar peletul s-a solubilizat cu reactiv alcalin (NaOH 0,5M). Absorbanta probelor s-a inregistrat la 540 nm folosind cititorul de placi Tecan Sunrise.

Datele obtinute cu ajutorul metodei Sircol au aratat ca toate variantele de materiale testate au stimulat sinteza de colagen secretata de catre celulele NCTC cultivate cu variantele de materiale, timp de 5 zile, comparativ cu martorul de cultura (Tabelul 5).

Tabelul 5

Proba	Colagen total (mg/mL)
Cultura martor	0,346
PHBV	0,401
PHBV/BC 1%	0,434
PHBV/BC 2%	0,479

In cazul variantelor de material testate, cantitatea de colagen secretata a crescut semnificativ, o data cu cresterea continutului de celuloza bacteriana (de la 0,401 mg/mL la respectiv 0,479 mg/mL) comparativ cu proba control (0,346 mg/mL).

Metoda Sircol se utilizeaza in general pentru monitorizarea productiei de colagen solubil de catre culturile celulare *in vitro*, inasa trebuie tinut cont de faptul ca colorantul nu face distinctie intre tipurile diferite de colagen ce pot fi secretate.

Dozarea colagenului tip I

Colagenul tip I secretat de celulele NCTC in mediul de cultura a fost dozat din supernatantele colectate folosind indicatiile producatorului kitului Elisa (MyBiosource). Metoda de cuantificare se bazeaza pe o tehnica Elisa de tip competitiv ce presupune utilizarea unui anticorp monoclonal specific pentru colagen tip I, imobilizat pe o placa de 96 de godeuri si o solutie de antigen de colagen tip I marcat cu peroxidaza. Dupa perioada de incubare a probelor in placa de cultura si in prezenta antigenului marcat s-a adaugat o solutie substrat specifica peroxidazei, formandu-se in final un compus de culoare albastra. Reactia enzimatica este stopata, iar solutia rezultata, de culoare galbena, se citeste la 450 nm, cu ajutorul unui cititor de placi. Intensitatea culorii este invers proportionala cu concentratia de colagen tip I, intrucat colagenul din proba si cel adaugat in forma conjugata cu enzima competitioneaza pentru numarul de situsuri de pe anticorpul imobilizat. O curba de etalonare este construita in functie de absorbanta inregistrata pentru concentratiile standardelor utilizate.



Rezultatele obtinute privind cantitatea de colagen tip I secretata de catre celulele NCTC cultivate cu PHBV si PHBV/BC, timp de 5 zile sunt prezentate in Tabelul 6.

Tabelul 6

Proba	Colagen tip I (ng/mL)
Cultura martor	62,346
Referinta	45,818
Exemplul 1	51,575
Exemplul 2	57,333

Variantele PHBV, PHBV/BC1% si PHBV/BC2 au prezentat valori ale colagenului tip I apropiate de cea a martorului, observandu-se o usoara crestere a productiei acestuia la adaugarea componentului BC in compozitie.

Rezultatele experimentelor realizate au evidentiat faptul ca toate materialele testate sunt biocompatibile, metabolismul celulelor NCTC fiind stimulat sa produca proteine ale matricei extracelulare, de tipul colagenului.

Evaluarea *in vitro* a degradabilității biocompozitelor polimerice

Evaluarea degradabilitatii biocompozitelor polimerice studiate in actuala lucrare a fost realizata prin imersarea esantioanelor de (10x3x0,01) cm (obținute din filme) in PBS, pH = 7,4, la temperatura de 37 °C, pentru diferite intervale de timp. Degradarea materialelor a fost evaluata prin determinarea variatiei de masa si prin investigarea modificarilor termice si structurale (DSC si ATR-FTIR). Probele au fost supuse testului dupa uscarea la 40 °C in etuva MEMMERT, timp de 24 h și aducerea la masa constanta. De asemenea, probele s-au uscat in etuva la 40 °C, timp de 24 h, inainte de fiecare determinare a variatiei de masa.

Pierderea de masa

In Tabelul 7 se prezinta pierderea de masa a amestecurilor pe baza de PHBV si celuloza bacteriana, imersate in PBS, la diferite intervale de timp.

Tabelul 7

Perioada de imersare in PBS	Pierdere de masa, %		
	Referinta	Exemplul 1	Exemplul 2
1 zi	0	0,003	0



2 zile	0,0900 ± 0,001	0,0787 ± 0,016	0,1228 ± 0,082
3 zile	0,1534 ± 0,021	0,1638 ± 0,002	0,2686 ± 0,085
4 zile	0,1898 ± 0,061	0,2266 ± 0,085	0,2904 ± 0,016
5 zile	0,2064 ± 0,052	0,2502 ± 0,060	0,3711 ± 0,084
6 zile	0,2550 ± 0,045	0,3320 ± 0,098	0,4800 ± 0,052
10 zile	0,3400 ± 0,064	0,4950 ± 0,050	0,6990 ± 0,093
14 zile	0,4740 ± 0,020	0,6880 ± 0,030	0,8240 ± 0,043
18 zile	0,6560 ± 0,050	0,8130 ± 0,040	1,0502 ± 0,091
22 zile	0,6930 ± 0,04	0,8020 ± 0,040	1,0512 ± 0,074
26 zile	0,7300 ± 0,020	0,8130 ± 0,040	1,0841 ± 0,097
30 zile	0,7390 ± 0,010	0,8230 ± 0,070	1,1200 ± 0,042

Din Tabelul 7 se observa faptul ca pierderea de masa este influentata de continutul de celuloza bacteriana. Proba care contine celuloza bacteriana 2 % inregistreaza cea mai mare pierdere de masa ($1,12 \pm 0,04$ %) dintre probele testate, dupa 30 zile de imersare.

Pierderea de masa a biocompozitelor de tipul PHBV/BC este atribuita penetrarii solventului in spatiile dintre lanturile macromoleculare, permitand hidroliza suprafetelor si ulterior degradarea. Rezultatele obtinute indica faptul ca PHBV/BC 2 % este favorabila degradarii pe termen lung, putand fi utilizata pentru design-ul dispozitivelor medicale cu degradabilitate controlata, in timp ce, pe termen scurt (utilizare 1-2 zile), probele experimentate sunt stabile.

Analiza termica prin DSC

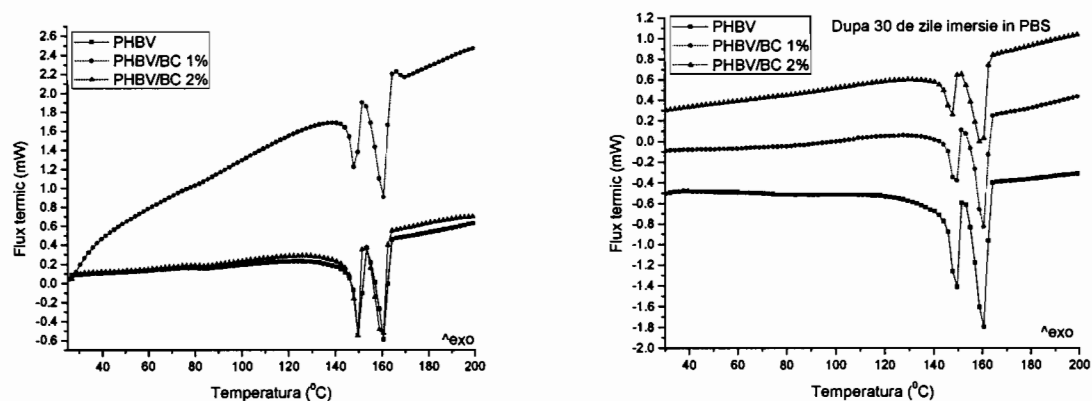
Diagramele DSC ale materialelor inainte si dupa imersarea in PBS au fost inregistrate pe un aparat DSC (823^e Mettler Toledo). Profilul de temperatura a fost 30-200 °C, iar viteza de incalzire a fost de 5 °C/min. Din diagramele termice DSC au fost evaluate: temperatura de topire (T_m), entalpia de topire (ΔH_m) si gradul de cristalinitate (X_c) utilizand urmatoarea ecuatie:

$$X_c \% = 100 \times \Delta H_m / \Delta H_m^0 \quad (1)$$

unde: ΔH_m este entalpia de amestecare a probelor (J/g); ΔH_m^0 este entalpia pentru 100 % PHBV cristalin - $\Delta H_m^0 = 146$ J/g). S-a tinut cont de valoarea fractiei de masa a PHBV din compozitia amestecurilor.



In Fig. 2 se prezinta diagramele termice obtinute prin analiza DSC pentru probele pe baza de PHBV si celuloza bacteriana initiale si supuse la imersarea in PBS timp de 30 de zile



(a)

(b)

Figura 2. Diagramele DSC pentru receptorile pe baza de PHBV si celuloza bacteriana, prima incalzire

(a) Initial; (b) Dupa imersare 30 de zile in PBS la 37°C

Temperatura de topire (T_m), entalpia de fuziune (ΔH_m) si gradul de cristalinitate (X_c) ale amestecurilor realizate au fost evaluate din curbele DSC prezentate in Fig. 2 inainte si dupa expunerea in PBS iar valorile acestor parametri sunt mentionate in Tabelul 8.

Tabelul 8

Cod proba	Initial			Dupa imersie 30 de zile in PBS		
	ΔH_m , J/g	T_m , °C	X_c , %	ΔH_m , J/g	T_m , °C	X_c , %
Referinta	43,48	160,89 150,22	30,08	70,18	160,834 148,93	48,55
Exemplul 1	34,82	160,46 148,71	24,33	56,97	160,04 148,89	39,81
Exemplul 2	45,73	160,06 149,39	32,29	57,98	159,75 147,34	40,94

Din Fig. 2 se observa aparitia a doua picuri endoterme de topire pentru probele testate asociate cu topirea diferitor tipuri de cristalite din structura PHBV. De asemeni, introducerea celulozei bacteriene nu afecteaza valorile temperaturii de topire, inasa, gradul de cristalinitate (X_c) al PHBV scade pentru PHBV/BC 1% fata de proba de control, in timp ce pentru proba PHBV/BC 2 % creste.



De asemeni, din Tabelul 8 se observa faptul ca gradul de cristalinitate al probelor pe baza de PHBV si celuloza bacteriana a crescut dupa imersarea in PBS comparativ cu probele neexpuze, cu circa 61 % in cazul PHBV, 63 % in cazul PHBV/BC 1% si respectiv cu 26 % in cazul PHBV/BC 2 %, in concordanta cu pierderea de masa prezentata in Tabelul 7, ceea ce indica degradarea lor.

Analiza FT-IR

Caracteristicile spectrale ale amestecurile realizate (filme) au fost analizate atat initial cat si dupa imersare in PBS, prin spectroscopie in infrarosu cu transformata Fourier cu tehnica ATR utilizand un cristal de ZnSe cu un unghi de incidenta de 45°.

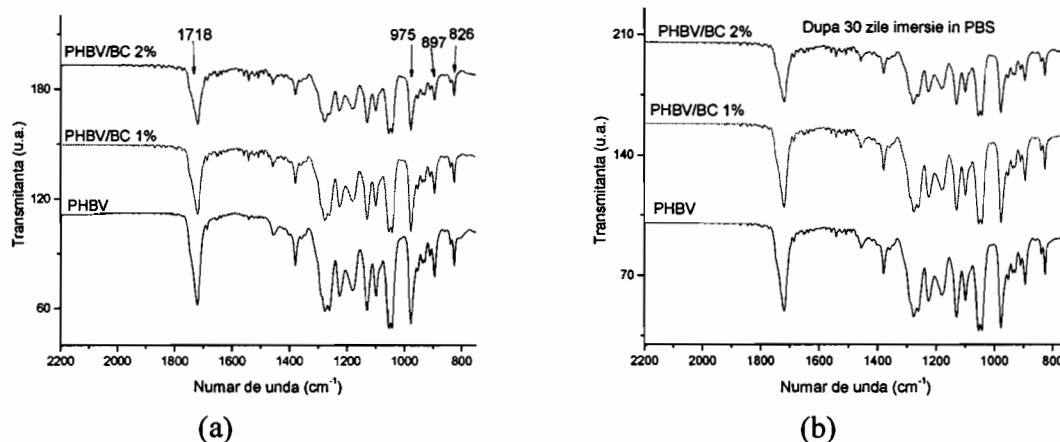


Figura 3. Spectrele ATR-FTIR pentru receptorile pe baza de PHBV si celuloza bacteriana (a) inregistrate initial; (b) dupa 30 zile imersare in PBS

Spectrele FT-IR inregistrate pentru probele pe baza de PHBV si celuloza bacteriana prezinta benzi de absorbtie la urmatoarele numere de unda: 1718 cm^{-1} (vibratia de intindere a legaturii C=O din gruparea cristalina a PHBV), 1277 cm^{-1} si 1055 cm^{-1} (vibratia de intindere a C-O-C), 1178 cm^{-1} (vibratia de intindere a C-O-C din regiunea amorfa), cu mici modificari ale intensitatii benzilor de absorbtie datorate interactiunii dintre matricea polimerica si celuloza bacteriana (Fig. 3). In comparatie cu spectrul FT-IR inregistrat pentru proba de control (PHBV) se constata ca intensitatile celor trei benzi cristaline de la 975 cm^{-1} , 897 cm^{-1} si 826 cm^{-1} au scazut pentru probele PHBV/BC1% si PHBV/BC2%, neexpuze cat si a celor expuse la actiunea PBS. De asemeni, aria benzii de absorbtie de la 1718 cm^{-1} specifica cristalinitatii PHBV a scazut in cazul probelor care contin celuloza bacteriana in comparatie cu proba PHBV (control), probele



imersate in PBS prezentand o arie mai mare a acestei benzi de absorbtie fata de probele initiale, ceea ce indica degradarea chimica. Aceste rezultate sunt in buna corelare cu gradul de cristalinitate prezentat in Tabelul 8.

Rezultatele obtinute releva faptul ca biocompozitele biocompatibile testate ar putea fi utilizate la dezvoltarea de noi biomateriale polimerice degradabile, cu aplicatii atat la confectionarea dispozitivelor medicale pentru ingineria tisulara, cu rata scazuta de degradare, dar si pentru sisteme de tipul cateterelor cu utilizare pe termen scurt.



REVENDICARI

1. Biocompozit polimeric **caracterizat prin aceea ca**, ca este constituit dintr-un amestec format din: 97...98 % polihidroxitirac-co-valerianat, 1% vitamina E și 1...2 % celuloza bacteriana, procentele fiind exprimate in procente in greutate.

2. Procedeu de obtinere a materialului definit la revendicarea 1, **caracterizat prin aceea ca**, materiile prime se prelucreaza in topitura la o temperatura de 180 °C, timp de amestecare de 6 minute si o viteza de rotatie a snecului de 40 rotatii pe minut, urmata de presarea la cald la 185 °C si o presiune de 147 bari, din care rezulta filme cu dimensiunea 200x200x0,1 mm, avand biocompatibilitate si degradabilitate adecvate pentru aplicatii biomedicale (inregistreaza o viabilitate celulara de 86,67 – 94 % la 24 h, favorizeaza ritmul normal de crestere al celulelor, prezinta un continut de ADN total de 87,34 - 89,2 %, o concentratia de colagen secretata de catre celulele NCTC cultivate cu aceste biomateriale de 0,434 - 0,479 mg/mL si o pierdere de masa de 0,82 - 1,12 % dupa 30 de zile imersare in PBS).

