



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00925

(22) Data de depozit: 21/11/2018

(41) Data publicării cererii:
29/05/2020 BOPI nr. 5/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• BERTEANU ELENA,
STR. DR. ALEXANDRU LOCUSTEANU
NR. 2, BL. 77A, ET. 3, AP. 15, BUCUREȘTI,
B, RO;
• TIHAN GRAȚIELA TEODORA,
SOS. GIURGIULUI, NR.63-65, BL.K, ET.9,
AP.37, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

• ZGĂRIAN ROXANA GABRIELA,
STR.VERIGEI, NR.3, BL.1, SC.1, ET.5,
AP.23, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• TATIA RODICA,
STR.EROU ADRIAN FULGA NR.3,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ȚOȚEA GEORGETA, STR.VIILOR, NR.52,
MOGOȘOAIA, IF, RO;
• IONIȚĂ MIOARA DANIELA, STR. JIULUI
NR. 6, BL. 6, SC. B, AP. 2, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TCACENCO LUMINIȚA, STR. EDUCAȚIEI
NR. 35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR.NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, ET.5,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• DEMETRESCU IOANA,
STR. CONSTANTIN DISESCU NR. 35BIS,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) MEMBRANE BIOPOLIMERICE CU FOSFATAZA ALCALINĂ
IMOBILIZATĂ ȘI ION METALIC DE Zn PENTRU APLICAȚII
BIOMEDICALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor suporturi biopolimerice sub formă de membrane pentru aplicații biomedicale. Procedeu, conform invenției, constă în cuplarea dispersiilor coloidale de gel chitosan supus dializei timp de 24 h, cu gelatină. Toate probele au fost reticulate cu agentul natural, genipin, prin imobilizarea de fosfatază alcalină din intestin bovin, în

prezență de $ZnSO_4$, rezultând membrane polimerice cu efect antibacterian împotriva bacteriilor *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Revendicări: 1
Figuri: 2



MEMBRANE BIOPOLIMERICE CU FOSFATAZA ALCALINA IMOBILIZATA SI ION METALIC DE Zn PENTRU APLICATII BIOMEDICALE

Inventia se refera la suporturi biopolimerice sub forma de membrane obtinute pe baza de chitosan (CHI) si gelatina (GEL) reticulate cu un agent de reticulare natural, genipin (GP), in care este immobilizata fosfataza alcalina din intestin bovin (ALP) in prezenta de ion metalic de Zn, pentru a fi utilizate in aplicatii biomedicale.

Cercetarile din ultima perioada in domeniul biomaterialelor au condus la rezultate remarcabile in obtinerea de noi produse cu aplicatii diverse, cu precadere in domeniul medical, in vederea cresterii calitatii vietii [1, 2]. Biomaterialele polimerice prezinta o serie de avantaje importante pentru largirea domeniului de aplicatie si anume: sunt biocompatibile, nealergene si bine tolerate de organism [3].

Din studiul literaturii de specialitate rezulta faptul ca s-au efectuat cercetari recente privind obtinerea unor materiale compozite pe baza de chitosan si nanoparticule de oxid de zinc, sub forma de crema cu absorbtie ridicata la nivelul pielii [4] sau hidrogel cu CaP pentru cresterea bioactivitatii si afinitatii proteinelor biologice active [5]. Pentru imbunatatirea proprietatilor fizico-biologice ale compozitelor s-au studiat diferite formule: chitosan-alcool polivinilic [6] si gel de chitosan reticulat cu genipin [7].

Chitosanul (CHI), polizaharida derivata din chitina (existenta in cochilii de crustacee, cuticule de insecte, etc.) este un biopolimer natural cu proprietati deosebite fiind biocompatibil, biodegradabil, hemostatic, antibacterian si antifungic [8]. CHI este utilizat ca suport pentru imobilizare si eliberare de medicamente sau in ingineria tisulara, formeaza produsi stabili, netoxici si inertii din punct de vedere farmacologic. Utilizarea polimerului natural, CHI, sau a unui amestec intre acesta si alt polimer in obtinerea unor matrici poroase si hidrofile are o importanta deosebita asupra imbunatatirii capacitatii de adeziune si proliferare a celulelor in aplicatiile de inginerie medicala [9,10].

Gelatina (GEL), tot un biopolimer natural, a inceput recent sa fie folosita ca biomaterial in ingineria tisulara [11-14]. Este o polipeptida liniara, prezinta o conformatie

parțial cristalină, formată dintr-un șir de aminoacizi (glicină, prolina, alanină, valină, hidroxiprolină), solubilă în apă și în soluții apoase de electroliți, dar și în unele lichide organice. Gelatina este un derivat al colagenului care nu mai are proprietatea de a se reorganiza sub formă de fibre. Filmele de gelatină pură au o structură fragilă și o capacitate mare de absorbție a apei, motiv pentru care utilizarea acesteia în combinație cu alt polimer natural, cum este CHI, este considerată o alegere potrivită [15,16].

Fosfataza alcalină (ALP) este o enzimă tisulară non-specifică din clasa hidrolazelor, o glico-proteină caracterizată prin acțiunea de defosforilare a moleculelor extracelulare. Din literatura de specialitate se cunoaște faptul că o creștere a activității fosfatazei alcaline este asociată cu o creștere a activității procesului de fagocitoză leucocitară, fără ca semnificația acestui fenomen să fie în totalitate înțeleasă. Deși intens studiată, activitatea biologică a enzimei în organism nu este pe deplin elucidată. Mai mulți autori sunt însă de acord cu posibilul rol al fosfatazei alcaline în promovarea calcificării osului [17]. Procesul de refacere a unui țesut traumatizat nu este simplu, ci reprezintă o integrare a mai multor procese interactive dinamice. Acesta se derulează în timp și implică elemente sanguine, matrice extracelulară și celule mezenchimale.

Genipin (GP) este un compus chimic existent în extractul de *Gardenia jasminoides*. Genipinul este un excelent reticulant natural pentru proteine, colagen, gelatină și chitosan. Prezintă o toxicitate scăzută, cu LD50 i.v. 382 mg/kg la soareci, deci, mult mai puțin toxic decât glutaraldehida și mulți alți reactivi sintetici de reticulare. În plus, GP poate fi utilizat ca agent de reglare pentru administrarea de medicamente, ca materie primă pentru prepararea pigmentului albastru de gardenie.

Prezenta invenție se referă la obținerea de suporturi biopolimerice bioactive sub formă de membrane obținute pe baza de chitosan (CHI) și gelatină (GEL) reticulate cu genipin (GP), în care este immobilizată fosfataza alcalină din intestin bovin (ALP) în prezența de ion metallic de Zn, în vederea utilizării acestora ca suport pentru creșteri de celule, menținând în același timp și un efect antibacterian.

Procedul de obținere a acestor membrane, conform invenției, constă în cuplarea dispersiilor coloidale de chitosan (CHI) cu o zi de dializă și gelatină (GEL), urmată de reticularea cu agentul natural, genipin (GP), prin immobilizarea de fosfataza alcalină din intestin bovin (ALP) în prezența de $ZnSO_4$ de diferite concentrații. Gelurile



omogene rezultate s-au turnat in vase Petri, pretratate cu glicerina, si s-au pastrat la temperatura camerei, timp de 1 luna, in vederea reticularii.

Compozitiile membranelor polimerice conform inventiei sunt alcatuite intr-un raport de greutate de: 1:1 intre CHI si GEL, 100:1 intre CHI cu GEL si GP, 40:1 intre CHI cu GEL si ALP, 1000:1 intre CHI cu GEL si ZnSO₄, 100:1 intre CHI cu GEL si ZnSO₄ si 50:1 intre CHI cu GEL si ZnSO₄. Membranele polimerice obtinute sunt uniforme, lucioase, elastice si de culoare albastra datorita prezentei genipinului.

Se prezinta in continuare 5 exemple de obtinere a membranelor polimerice:

Exemplul 1:

Membrana pe baza de CHI/GEL reticulata cu GP.

S-au preparat initial suspensiile coloidale ale celor doi biopolimeri, gelul de chitosan 1 %, (g/v), respectiv gelatina 1 %, (g/v).

Obtinerea gelului de chitosan. S-a preparat gelul de chitosan 1 %, prin dizolvare pe baie de apa, la 50 °C sub agitare continua, a amestecului format din chitosan si solutie acetica (acid acetic, acetat de sodiu). S-a obtinut un gel omogen si transparent, cu o valoarea a pH-ului de 5.15.

Ca o noutate a acestei metode, gelul de chitosan s-a supus procesului de dializa timp de 24 ore. pH-ul gelului dupa dializa a crescut la valoarea de 5,6.

Chiar daca chitosanul are multe proprietati remarcabile datorita gruparilor sale functionale, proprietatile unei membrane pot fi imbunatatite prin incorporarea unui al doilea polimer si anume gelatina.

Obtinerea gelului de gelatina. S-a preparat gel de gelatina 1 %. Astfel 1 g de pulbere de GEL a fost imersata in 100 mL apa deionizata si incalzita la 60 °C pana la obtinerea unui gel omogen. pH-ul final al gelului este 5.56.

Cele doua componente, gelul de CHI si gelul de GEL, intr-un raport de greutate de 1:1 intre CHI si GEL s-au omogenizat energetic cu solutia apoasa de GP, timp de 30 de minute, la 400 rpm, pe un agitator magnetic. Amestecul rezultat, cu un raport de greutate de 100:1 intre CHI cu GEL si GP s-a lasat in repaus pentru indepartarea bulelor de aer formate, s-a turnat in vas Petri, pretratate cu glicerina, si s-a uscat la temperatura camerei, timp de o luna. In final s-a obtinut o membrana albastra, semitransparenta si elastica.



Exemplul 2:**Membrana pe baza de CHI/GEL reticulata cu GP si ALP imobilizata.**

S-a lucrat in acelasi mod ca la exemplul 1, dar cu imobilizarea enzimei (ALP) intr-un raport de greutate de 40:1 intre CHI cu GEL si ALP. In final s-a obtinut o membrana albastra, semitransparenta si elastica.

Exemplul 3:**Membrana pe baza de CHI/GEL reticulata cu GP, cu ALP imobilizata si ZnSO₄ 0,01 %.**

S-a lucrat in acelasi mod ca la exemplul 2, cu deosebirea ca s-au inclus ioni de Zn²⁺ prin adaugarea solutiei apoase de ZnSO₄ de concentratie 0,01 %. Raportul de greutate intre CHI cu GEL si ZnSO₄ este de 1000:1. In final s-a obtinut o membrana albastra, semitransparenta si elastica.

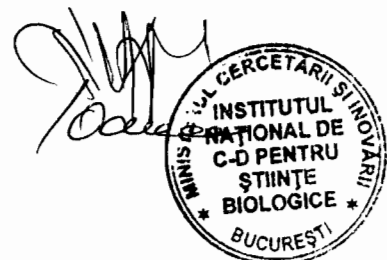
Exemplul 4:**Membrana pe baza de CHI/GEL reticulata cu GP, cu ALP imobilizata si ZnSO₄ 0,1 %.**

S-a lucrat in acelasi mod ca la exemplul 3, cu deosebirea ca s-au inclus ioni de Zn²⁺ prin adaugarea solutiei apoase de ZnSO₄ de concentratie 0,1 %. Raportul de greutate intre CHI cu GEL si ZnSO₄ este de 100:1. In final s-a obtinut o membrana albastra, semitransparenta si elastica.

Exemplul 5:**Membrana pe baza de CHI/GEL reticulata cu GP, cu ALP imobilizata si ZnSO₄ 0,2 %.**

S-a lucrat in acelasi mod ca la exemplul 4, cu deosebirea ca s-au inclus ioni de Zn²⁺ prin adaugarea solutiei apoase de ZnSO₄ de concentratie 0,2 %. Raportul de greutate intre CHI cu GEL si ZnSO₄ este de 50:1. In final s-a obtinut o membrana albastra, semitransparenta si elastica.

Procedeul de obtinere este simplu, utilizeaza materii prime ieftine si accesibile si nu necesita aparatura complexa.



Materiale

S-au utilizat urmatoarele substante de calitate analitica: Chitosan (CHI) - pulbere de chitosan extrasa din cochilii de crab, cu vascozitate > 400 mPa.s, (SIGMA); Gelatina porcina (GEL) (FLUKA); Genipin (GP), $\geq 98\%$, pudra (SIGMA); Fosfataza alcalina (ALP) din intestin bovin (SIGMA); $ZnSO_4$ CHEMICAL Company.

S-au preparat urmatoarele tipuri de membrane:

- A: CHI:GEL (1:1), GP.
- B: CHI:GEL (1:1), ALP, GP.
- C: CHI:GEL (1:1), ALP, GP, $ZnSO_4$ 0,01 %.
- D: CHI:GEL (1:1), ALP, GP, $ZnSO_4$ 0,1 %.
- E: CHI:GEL (1:1), ALP, GP, $ZnSO_4$ 0,2 %.

Metode de caracterizare propice noilor membrane biopolimerice:

Pomind de la o serie de studii privind metodele de caracterizare fizico-chimica si biochimica a materialelor implantabile s-au selectat metode de caracterizare specifice formularilor materialelor implantabile. Astfel, selectia biomaterialelor elaborate, precum si potentialul aplicativ deosebit al acestora pot fi stabilite dupa evaluarea relatiilor care exista intre structura, proprietati si efectele biologice. Proprietatile biomaterialelor depind atat de caracteristicile materiilor prime, cat si de cele ale biomaterialelor obtinute prin combinarea componentelor individuale.

Biocompatibilitatea si efectul antimicrobian.

1. Evaluarea biocompatibilitatii biomaterialelor cu aplicatii medicale este o cerinta complexa. Aceasta complexitate deriva din faptul ca biomaterialele medicale sunt fabricate dintr-o gama complexa de materiale si sunt destinate unor scopuri variate, cu grade de contact diferite cu corpul uman, mergand de la un contact tranzitoriu cu pielea sau sangele, la un contact permanent.



Testele de biocompatibilitate si evaluare a biomaterialelor se realizeaza pentru a determina toxicitatea potentiala, rezultata in urma contactului dintre acestea si corpul uman. Biomaterialele nu trebuie, in mod direct sau prin intermediul constituentilor materialului, sa produca efecte adverse locale sau sistemice, sa fie carcinogenice sau sa dezvolte orice alt tip de efect secundar. In acest caz, evaluarea oricarui bioprodus nou, destinat folosirii umane necesita date obtinute in urma unor testari sistematice pentru a demonstra ca beneficiile rezultate din folosirea produsului final depasesc cu mult orice risc potential.

Evaluarea biocompatibilitatii probelor s-a determinat prin metoda spectrofotometrica MTT, utilizandu-se o linie stabilizata de celule fibroblaste de soarece NCTC (L 929) in baza unui protocol stabilit in cadrul Departamentului de Biologie Celulara si Moleculara, INCDSB.

In figurile 1 si 2 sunt prezentate viabilitatea si morfologia culturilor de celule.

Rezultatele de viabilitate celulara si morfologia celulelor demonstreaza o biocompatibilitate buna, membranele polimerice preparate nu prezinta toxicitate fata de celulele fibroblaste si pot fi utilizate pentru uz uman.

2. Efectul antibacterian.

Activitatea antibacteriana a membranelor polimerice preparate a fost determinata pentru bacteriile *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection) si *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizand metoda turbidimetrica. Bacteriile au fost cultivate peste noapte pe Columbia Agar-5 % sange de berbec la 37°C, apoi o suspensie bacteriana (inoculum) a fost preparata cu bulion nutritiv astfel incat sa aiba 0.5 unitati McFarland.

Membranele testate au fost introduse in tuburi de polipropilena peste care s-a adaugat suspensia bacteriana. Intr-un tub s-a pastrat suspensia bacteriana fara a fi in contact cu nici un material de testat. Toate recipientele au fost incubate 24 h, la 37°C, apoi absorbanta a fost citita la 600 nm cu ajutorul unui analizor CHEMWELL 6010. Experimentul s-a efectuat pe cate trei probe din fiecare membrana.

Indicele de crestere a inhibarii bacteriene (I%) a fost calculat utilizand urmatoarea ecuatie:



$$I(\%) = \frac{(C_{24}-C_0)-(S_{24}-S_0)}{(C_{24}-C_0)} \times 100, \quad (1)$$

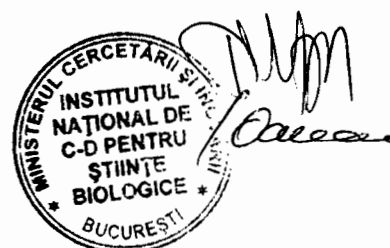
unde: „C”- reprezinta densitatea optica citita la 600 nm pentru inoculul bacterian inainte de incubare si dupa 24 de ore;

„S”- reprezinta densitatea optica citita la 600 nm pentru suspensia bacteriana in contact cu proba inainte de incubare si dupa 24 de ore.

Tabel 1. Activitatea antibacteriana a membranelor polimerice.

| Membrane | I (%) | |
|--|-------------------------|------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| A – CHI:GEL (1:1), GP | 31,81±1,02 | 30,64±0,73 |
| B – CHI:GEL (1:1), ALP, GP | 10,21±0,42 | 7,32±0,24 |
| C – CHI:GEL (1:1), ALP, GP, ZnSO₄ 0,01 % | 37,16±0,78 | 31,89±0,32 |
| D – CHI:GEL (1:1), ALP, GP, ZnSO₄ 0,1 % | 49,44±1,26 | 48,59±0,68 |
| E – CHI:GEL (1:1), ALP, GP, ZnSO₄ 0,2 % | 53,61±1,52 | 52,11±0,92 |

Studiul experimental demonstreaza ca utilizarea agentului de reticulare natural (GP) si incorporarea ionilor metalici de Zn determina cresterea efectului antibacterian pentru ambele tipuri de bacterii, *Escherichia coli* si *Staphylococcus aureus* (Tabel 1).



Concluzii:

Inventia se refera la obtinerea de membrane pe baza de biopolimeri naturali si enzima imobilizata in prezenta de $ZnSO_4$.

S-au realizat si testat materiale polimerice sub forma de membrane, pe baza de chitosan cu o zi de dializa si gelatina sub forma de geluri, prin reticulare cu genipin, cu imobilizare de ALP in prezenta de ioni metalici de Zn^{2+} in vederea cresterii biocompatibilitatii si a efectului antibacterian.

Noutatea in obtinerea acestor membrane o reprezinta formula amestecului, precum si procedeul de obtinere a acestora, cu dializa gelului de chitosan, urmarind astfel imbunatatirea biocompatibilitatii si a efectului antibacterian.



Revendicari:

1. Formule de membrane biopolimerice pe baza de gel de chitosan cu o zi de dializa si gel de gelatina, reticulate cu agentul de reticulare natural, Genipin, cu enzima ALP immobilizata si ioni metalici de Zn^{2+} . Compozitiile membranelor polimerice conform inventiei sunt alcatuite intr-un raport de greutate de: 1:1 intre CHI si GEL, 100:1 intre CHI cu GEL si GP, 40:1 intre CHI cu GEL si ALP, 1000:1 intre CHI cu GEL si $ZnSO_4$, 100:1 intre CHI cu GEL si $ZnSO_4$ si 50:1 intre CHI cu GEL si $ZnSO_4$. Membranele polimerice obtinute sunt uniforme, lucioase, elastice si de culoare albastra datorita prezentei genipinului si sunt **caracterizate prin aceea ca** asigura efect antibacterian impotriva a doua bacterii *Escherichia coli* ATCC 25922 si *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 si o buna adeziune si proliferare a celulelor fibroblaste de soarece NCTC (L929) cu aspect morfologic normal.



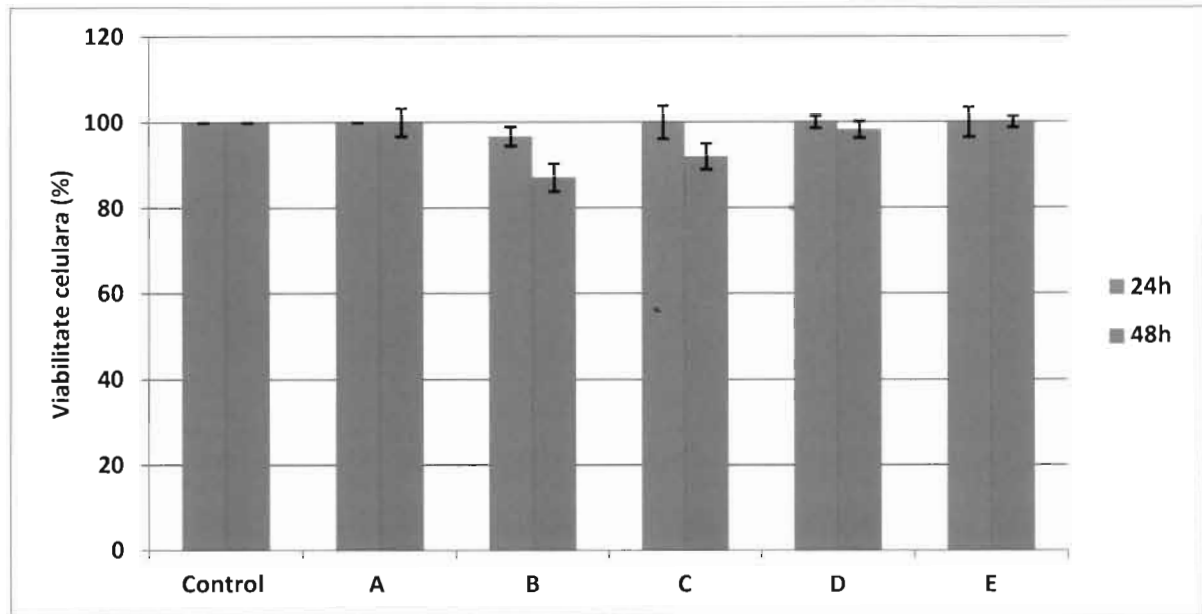


Figura 1. Viabilitatea celulelor fibroblaste pe membranele polimerice.

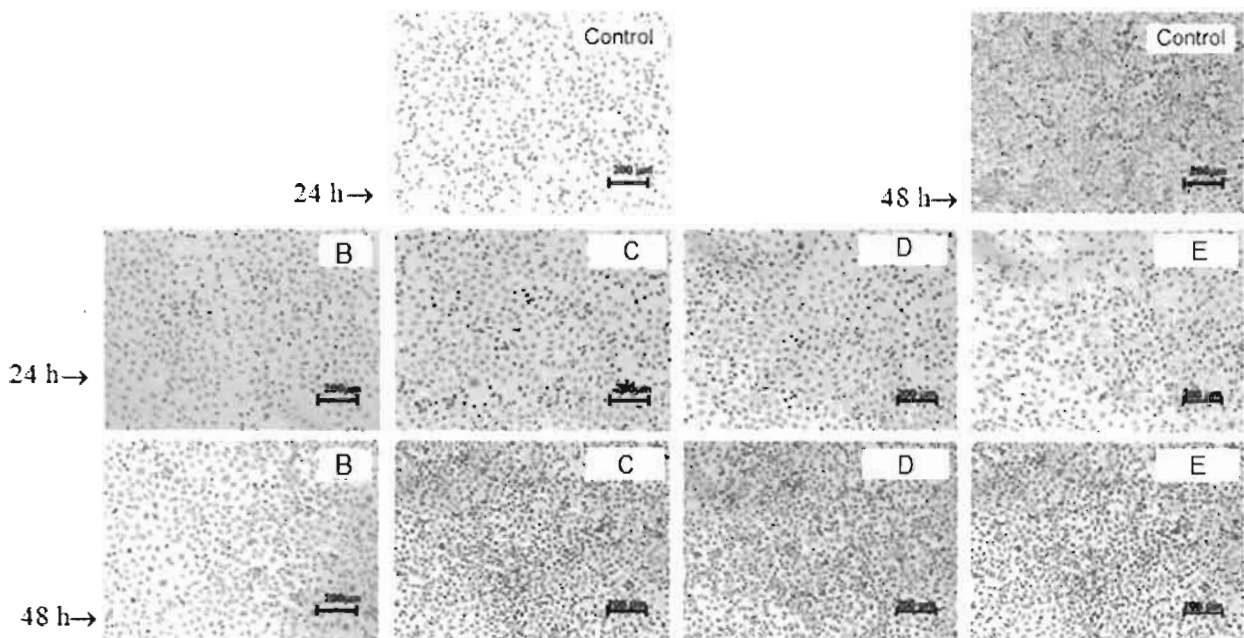


Figura 2. Morfologia celulelor fibroblaste la 24 h si 48 h pentru Control si membrane polimerice; Scala: 200 μ m.

