



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00221

(22) Data de depozit: 05/04/2019

(41) Data publicării cererii:
27/11/2020 BOPI nr. 11/2020

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

(72) Inventatori:
• AFLORI MAGDALENA,
STR. GRIGORE URECHE NR. 1,
BL. MĂRĂCINEANU, ET. II, AP. 9, IAȘI, IS,
RO;

• SERBEZEANU DIANA, ȘOS. NICOLINA
NR.90, BL.1001, SC.B, ET.2, AP.8, IAȘI, IS,
RO;
• IOANID EMIL GHIOCEL, STR.SĂRĂRIEI
NR.43, IAȘI, IS, RO;
• BUTNARU MARIA, SAT TOMEȘTI,
COMUNA TOMEȘTI, IS, RO;
• ANGHELOIU MARIN,
STR. GENERAL CULCER NR. 28,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI FILM POLIIMIDIC
PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE

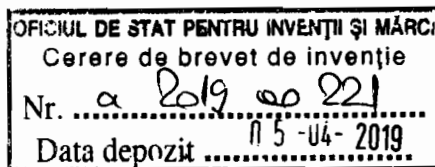
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biomaterial polimeric utilizat ca suport flexibil pentru aplicații biomedicale. Procedeu, conform invenției, constă în aceea că un film poliimidic de grosime 30 μ și dimensiuni 5x5, este supus unui tratament în plasmă rece de radiofrecvență, la puterea de 10W, respectiv, 60W, urmat de imersarea timp de 48 h într-o soluție preparată prin dizolvarea a 55, mg chitosan în acid

acetic glacial de concentrație 1...5%, spălare cu apă distilată și uscare într-o etuvă la temperatura de 30°C cu ventilație, rezultând un biomaterial polimeric biocompatibil cu o suprafață cu morfologie compactă și aspect neted, având o viabilitate celulară de aproximativ 80%.

Revendicări: 1





Procedeu de obținere a unui film poliimidic pentru aplicații biomedicale

Invenția de față se refera la un procedeu de obținere prin tratare în plasmă și imersarea în soluție de chitosan a unui film poliimidic în vederea obținerii unui material cu proprietăți biocompatibile.

Poliimidele reprezintă cea mai importanta clasă de materiale utilizate ca substraturi și materiale de izolație în combinație cu metale pentru cabluri de interconectare și site-uri cu electrod. Prin urmare, este natural ca industria dispozitivelor medicale să-și focuseze atenția asupra poliimidelor pentru dispozitivele medicale în general și în special pentru încapsularea și izolarea implanturilor active. În general, poliimidele sunt utilizate ca strat izolant, oferind protecție circuitelor de bază și metalelor, de efecte ca absorbția de umiditate, coroziunea, transportul ionilor și deteriorarea fizică. Proprietățile cheie ce le recomandă în domenii de vârf ale tehnologiei moderne sunt: stabilitate termică ridicată, rezistență mecanică mare, proprietățile excelente de izolare și rezistența chimică superioară. Una din cele mai utilizate poliimide ca biomaterial este poliimida cunoscuta sub numele comercial DuPont's PI2611 sau UBE's U-Varnish-S. Cel mai reprezentativ exemplu de poliimidă îl constituie polimerul obținut din 4,4'-diaminodifenileter și dianhidrida piromelitică, cunoscut sub denumirea de Film Kapton sau Film H. Totuși, acesta, în forma complet imidizată este dificil de prelucrat, fapt pentru care acest polimer trebuie supus prelucrării în stadiul intermediar, cel al acidului poliamidic.

Un procedeu util de modificare a suprafeței filmelor și membranelor este tratamentul în plasmă rece de înaltă frecvență. În timpul tratamentului în plasmă, se rup legăturile slabe din filmul de polimer și se înlocuiesc cu grupe reactive carbonil, carboxil, hidroxil, amino și altele, care pot interacționa în continuare mod specific cu alte grupări funcționale. Unele procese de modificare a suprafeței sunt special

concepute pentru a încorpora anumite grupări funcționale, de exemplu grupări amino, hidroxil sau metil, cu scopul de a influența interacțiunile nespecifice ale proteinei cu suprafața, influențând astfel interacțiunea celulară.

În brevetul WO2019014926 (A1) este descris un procedeu de aplicare a unui dispozitiv medical implantabil fabricat prin încapsularea corpului dispozitivului într-un ansamblu de încapsulare multistrat, care conține cel puțin un strat de film organic de parilenă sau rășină poliimidică și cel puțin un strat de film anorganic biocompatibil, dispuse consecutiv prin laminare, având fie stratul interior format din film organic iar cel exterior format din film anorganic, fie stratul interior format din film anorganic iar cel exterior din film organic. Acest ansamblu multistrat de încapsulare prezintă biocompatibilitate bună, este un bun izolator față de apa și oxigenul din fluidele biologice ale corpului uman și prelungește astfel durata de viață a dispozitivului, rezolvând în mod eficient problema încapsulării dispozitivelor medicale implantabile tradiționale.

Un dezavantaj al acestui procedeu este că aplicarea lui necesită o tehnologie complexă.

Invenția din brevetul TW201823486 (A) prezintă un procedeu de preparare a unei plăci flexibile de circuite integrate, pe un suport poliimidic neadeziv, constând în activarea succesivă a filmului poliimidic, prin descărcare în plasmă, sub vid, urmată de placarea circuitului electric pe bază de cupru, pe suprafața activată a filmului poliimidic. Procedeu simplu, nu necesită utilizarea de adezivi, costul de fabricare este scăzut iar gradul de poluare redus, fiind recomandat pentru producerea de circuite flexibile integrate, neadezive și ultra-subțiri.

Un dezavantaj al acestui procedeu este că nu poate fi folosit în aplicații biomedicale.

Modificarea suprafeței filmelor poliimidice este și subiectul general al invenției prezentate în brevetul CN106220885 (A). În particular, invenția se referă la

un procedeu și un dispozitiv de activare a suprafeței filmelor poliimidice, prin descărcare în plasmă, constând dintr-un generator de înaltă frecvență, un canal de reglare a temperaturii de lucru și un echipament auxiliar. Metoda și dispozitivul prezintă avantajul de a minimiza dependența dintre intensitatea câmpului electric și planaritatea filmului poliimdic, și rezolvă probleme cum ar fi rezistența scăzută la decojire, la răzuire și la deformare a filmelor poliimidice.

Un dezavantaj al acestui procedeu este că este costisitor și nu are aplicabilitate în domeniul biomedical.

De cele mai multe ori, materialele și dispozitivele implantate pe bază de materiale poliimidice au fost evaluate în ceea ce privește citotoxicitatea *in vitro* și răspunsul histologic *in vivo*. Variabilitatea largă a formulărilor de tip poliimdic poate duce la diferențe importante în performanța lor față de factori mai stricți ai biocompatibilității, cum ar fi trombogenicitatea, interacțiunea cu celulele sau țesuturile versatile și stabilitatea. Acești factori necesită investigarea biocompatibilității materialelor poliimidice în noi domenii de cercetare.

Un dezavantaj al filmelor și membranelor pe bază de poliimidă constă în faptul că sunt deficitare în privința proprietăților de interacțiune a substratului polimer cu celulele, interacțiuni care sunt esențiale pentru aplicații biomedicale care vizează terapia transdermică și/sau repararea/regenerarea țesuturilor.

Gama materialelor ce pot fi utilizate pentru biocompatibilizarea filmelor tratate în plasmă este variată. Cele mai utilizate sunt colagenul, chitosanul, albumina, gelatina,, etc.

Chitosanul provine dintr-un produs natural numit chitină, care se găsește în exoscheletul (carapacea) crustaceelor marine (creveți, crabi roșii, homari etc.) și în structura internă a altor nevertebrate (moluște).

Modificarea suprafeței poliimididelor cu chitosan nu a fost investigată până în prezent. Prezenta invenție este prima abordare a modificării suprafeței efectuată în

condiții minim distructive și un procedeu simplu de aplicat, nepoluant, care implică costuri minime.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu de tratare în plasmă a poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidei urmată de modificarea suprafeței cu chitosan, cu scopul extinderii gamei filmelor poliimidice cu aplicații biomedicale, ca biosenzori, implanturi neurale, sau retiniene, regenărari ale țesuturilor.

Invenția de față înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că în scopul biocompatibilizării, un film poliimidic este supus unui tratament în plasmă rece de radio frecvență (13,56 MHz), la puterea de 10-60W, urmat de imersarea imediată timp de 48h într-o soluție preparată prin dizolvarea a 55,5mg chitosan în acid acetic glacial concentrație 1-5%, spălare ulterioară cu apă distilată obținută printr-un sistem de filtrare Milli-Q (Millipore) și uscare într-o etuvă la temperatura de 30°C cu ventilație, biocompatibilizarea fiind evidențiată prin utilizarea testului MTT.

Procedeeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Este un procedeu ecologic
- Se poate aplica pe instalații existente
- Este sigur în exploatare
- Numarul etapelor tehnologice este redus
- Permite proiectarea de proprietăți specifice și o capacitate de cuplare cu compuși bioactivi
- Produsul este netoxic și stabil în timp
- Produsul obținut este ieftin și poate fi adaptat la o gamă largă de aplicații biomedicale.

Se dau în continuare două exemple de realizare a invenției:

Exemplul 1: Filmul poliimidic de grosime 30 μm și dimensiuni 5x5 cm este

introdus într-o instalație de plasmă rece care cuprinde o incintă cilindrică de cuarț în exteriorul căreia sunt dispuși patru electrozi în formă de quadrupol, electrozi conectați la generatorul de radio frecvență 13.5 MHz. Inițial în incintă se face vid de 0.5×10^{-1} mbar după care se introduce azot ca gaz de lucru la presiunea de 2×10^{-1} mbar. Se amorsează descărcarea timp de 5 minute la o putere de 10W. După ce a fost tratat în plasmă filmul poliimidic se imersează imediat, timp de 48h într-o soluție de chitosan la temperatura camerei. Soluția de chitosan a fost preparată prin dizolvarea chitosanului (55,5mg) în acid acetic glacial concentrație 1% cu agitare de 1500 rpm la temperatura camerei (23°C). După 48h filmul poliimidic este scos din soluția de chitosan, este spălat cu apă distilată obținută printr-un sistem de filtrare Milli-Q (Millipore) și uscat într-o etuvă la temperatura de 30°C cu ventilație timp de 10h. Filmul este păstrat în condiții sterile.

Exemplul 2: Filmul poliimidic de grosime 30 μm și dimensiuni 5x5 cm este introdus într-o instalație de plasmă rece care cuprinde o incintă cilindrică de cuarț în exteriorul căreia sunt dispuși 4 electrozi în formă de quadrupol, electrozi conectați la generatorul de radio frecvență 13.5 MHz. Inițial în incintă se face vid de 0.5×10^{-1} mbar după care se introduce azot ca gaz de lucru, la presiunea de 2×10^{-1} mbar. Se amorsează descărcarea în plasmă timp de 5 minute la o putere de 60W. După ce a fost tratată în plasmă filmul poliimidic se imersează imediat, timp de 48h într-o soluție de chitosan. Soluția de chitosan a fost preparată prin dizolvarea chitosanului (55,5mg) în acid acetic glacial concentrație 5% cu agitare de 1500 rpm la temperatura camerei (23°C). După 48h filmul poliimidic este scos din soluția de chitosan, este spălat cu apă distilată obținută printr-un sistem de filtrare Milli-Q (Millipore) și apoi uscat într-o etuvă la temperatura de 30°C cu ventilație timp de 10h. Filmul este păstrat în condiții sterile.

În vederea determinării ulterioare a viabilității celulare, calitatea și morfologia filmelor poliimidice obținute conform exemplelor 1 și 2 au fost studiate

cu ajutorul unui profilometru Alpha-Step D-500 Stylus Profiler KLA-Tencor, SUA. După cum se poate observa din tabelul 1, acestea au media rugozității Ra (măsurată microscopic pe o suprafață de 25 x 25 μm) în intervalul de 137.46 – 256.32 nm. Filmele poliimidice prezintă o suprafață cu o morfologie compactă cu un aspect neted, fără crăpături sau goluri, cu o grosime și o compoziție cât mai omogenă și, prin urmare, pot fi utilizate ca suporturi flexibile în aplicația vizată.

Dinamica suprafeței unui polimer/biomaterial se poate descrie cu ajutorul măsurătorilor de unghi de contact deoarece se examinează stratul de suprafață la o adâncime comparabilă cu raza de acțiune a forțelor interfaciale implicate în restructurarea suprafeței. Astfel, se obține fracția elementelor structurale nepolare și polare de pe suprafață. Unghiul de contact static a fost măsurat prin metoda picăturii de lichid (*sessile drop*), la temperatura camerei, cu un aparat KSV CAM 101 (KSV Instruments, Helsinki, Finlanda). Pentru acest studiu s-au folosit apă bidistilată și etilen glicol. Pentru a avea un rezultat statistic, s-au făcut măsurători pe trei regiuni diferite ale suprafeței și s-au înregistrat câte 10 imagini pentru fiecare lichid în parte.

Tabel 1. Ra și Valorile unghiurilor de contact pentru produsii noi obținuți.

Cod Probă	Ra (nm)	Unghi de contact (Θ)	
		Apa	Etilenglicol
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă - chitosan	137.46	75.4	53.6
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă - chitosan-10W	248.04	99	36.3
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă - chitosan-60W	256.32	76.6	58.9

Rezultatele măsurătorilor unghiului de contact și a profilometrului au arătat o creștere mare a rugozității de la 137.46 nm la 256.32 nm suprafeței filmelor poliimidice modificate cu chitosan, odată cu creșterea puterii descărcării de la 10W la 60W.

Valorile unghiurilor de contact pot fi folosite pentru a estima tensiunea superficială a solidului. Pe baza acestor măsurători se pot calcula parametri ce caracterizează suprafața solidului și capacitatea de absorbție a acestuia (umectabilitatea), ca de exemplu: energia liberă a suprafeței, tensiunea interfacială solid-lichid, lucrul de adeziune etc. Valorile acestor mărimi sunt ilustrate în Tabelul 2.

Tabel 2. Parametrii ce caracterizează suprafața filmului poliimdic

Cod Probă	Lucrul de adeziune w_a (mN/m)	Energia liberă γ_{sv} (mN/m)	Componenta polară γ_{sv}^p (mN/m)	Component a dispersivă γ_{sv}^d (mN/m)	Energia interfacială solid/lichid γ_{SL} (mN/m)
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă-chitosan	91.13	30.79	13.27	17.52	12.46
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă - chitosan-10W	141.49	80.3	77.43	2.87	11.6
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă-chitosan-60W	145.6	89.86	88.40	1.47	17.06

Evaluarea potențialului citotoxic al filmelor poliimidice tratate în plasmă și modificate cu chitosan, pe linii celulare fibroblaste primare din derm de iepure *Albino rabbit*, pasaj celular 3, s-a realizat utilizând testul cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (testul MTT).

Pentru calculul viabilității celulare în astfel de sisteme de cultură a fost aplicată următoarea formulă:

$$\text{Viabilitatea celulară, \%} = \frac{\text{Absorbanta în cultura probă}}{\text{Absorbanta în cultura control}} \times 100$$

În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele testului MTT, în care viabilitatea celulară a fost exprimată sub forma unei medii, obținute din prelucrarea triplicatelor valorilor de absorbantă. Viabilitatea celulară în culturile martor a fost considerată ca fiind 100, iar valorile experimentale – procentaje rezultate din valoarea martorului.

Din tabelul de mai jos se poate observa că filmele poliimidice tratate în plasmă rece de radio frecvență la diferite puteri, 10W și respectiv 60W, nu au prezentat valori ale viabilității celulare cu diferențe semnificative. Filmele ținute în condiții de contact direct cu liniile celulare fibroblaste primare din derm de iepure *Albino rabbit* pasaj celular 3, au menținut viabilitatea celulară după 48, respectiv 72 ore de incubare. Valorile viabilității celulare de aproximativ 80%, au evidențiat faptul că materialul polimeric tratat la două puteri diferite nu induce acțiuni citotoxice asupra celulelor.

Tabel 3. Rezultatele testului MTT

Timp(h) Cod Probă	Viabilitate celulară (%)		
	24	48	72
Control	100	100	100
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă- chitosan	81.38	79.42	75.21
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă- chitosan-10W	85.58	82.45	80.24
poli-4,4'-oxidifenilen piromelitimidă- chitosan-60W	88.11	85.56	83.75

Revendicare

Procedeu de obținere a unui film poliimidic pentru aplicații biomedicale caracterizat prin aceea că: în scopul biocompatibilizării un film poliimidic cu dimensiunea de 5x5 cm, grosimea 30 μ m a fost supus unui tratament în plasmă rece de radio frecvență 13.56 MHz, timp de 5 minute în atmosferă de azot la o presiune de 2×10^{-1} mbar, puterea în descărcare având valori cuprinse în intervalul 10-60W, și imersat timp de 48h într-o soluție de chitosan ce a fost preparată prin dizolvarea a 55,5 mg chitosan în acid acetic glacial cu valori ale concentrației cuprinse în intervalul 1-5% cu agitare de 1500 rpm la temperatura camerei (23°C), apoi filmul poliimidic a fost spălat cu apă distilată obținută printr-un sistem de filtrare Milli-Q (Millipore) și apoi uscat într-o etuvă la temperatura de 30°C cu ventilație timp de 10h, evaluarea potențialului citotoxic al filmului poliimidic făcându-se utilizând testul cu bromură de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (testul MTT) pe linii celulare fibroblaste primare din derm de iepure *Albino rabbit*, pasaj celular 3.