



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00766

(22) Data de depozit: 23/11/2020

(41) Data publicării cererii:
30/05/2022 BOPI nr. 5/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• STĂNESCU PAUL-OCTAVIAN,
STR.VATRA DORNEI NR.9, BL.E4, SC.2,
ET.2, AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• RADU IONUȚ- CRISTIAN, NR.192,
SAT GLĂMBOCELU, COMUNA BOGAȚI,
AG, RO;
• ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA,
NR. 43, BL.012, SC. B, ET.1, AP. 62,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• TANASĂ EUGENIA,
STR.NADA FLORILOR, NR.2, BL.2, SC.2,
ET.7, AP.74, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CĂSĂRICĂ ANGELA,
STR.POPA STOICA FARCAS, NR.19,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI
NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94,
BUCUREȘTI, B, RO;
• COSTACHE MARIETA, STR. TELITA,
NR.12, BUCUREȘTI, B, RO;
• HUDIȚĂ ARIANA, STR.OLTEȚ, NR.25,
BRAȘOV, BV, RO;
• CHIRIAC ANITA LAURA,
INTRAREA CUCURUZULUI NR.20,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) MODEL DE PANSAMENT PE BAZĂ DE CELULOZĂ
BACTERIANĂ, CHITOSAN ȘI POLIMERI TERMOSENSIBILI
ÎNCĂRCAȚI CU MOLECULE BIOLOGIC ACTIVE
PENTRU TERAPIA RĂNILOR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui pansament cu eliberare controlată a unui antibiotic de tip sulfadiazina de argint pentru tratarea rănilor dermice cronice. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de preparare a unor nanoparticule cu structură miez-coajă prin polimerizarea monomerului N-izopropilacrilamidă (NIPAM) în prezența de agent de stabilizare alcool polivinilic (APV), în raport masic 50-50, inițiator persulfat de potasiu și 0, 5% v/v față de masa de reacție, oleat de metil (MO), încapsularea medicamentului prin dizolvarea sulfadiazinei de argint în

suspensia de nanoparticule APV-NIPAM/MO în mediu apos, sub agitare intensă, prepararea membranelor din chitosan reticulat fizic și celuloză tratată, încărcarea nanoparticulelor APV/NIPAM în membrane de chitosan/celuloză, rezultând un sistem cu eliberare controlată a sulfadiazinei de argint, care prezintă biocompatibilitate pe celule fibroblaste dermale în teste biologice.

Revendicări: 4
Figuri: 10



**MODEL DE PANSAMENT PE BAZA DE CELULOZA BACTERIANA, CHITOSAN
SI POLIMERI TERMOSENSIBILI INCARCATI CU MOLECULE BIOLOGIC
ACTIVE PENTRU TERAPIA RANILOR**

Inventia se refera la dezvoltarea **unui model de pansament** cu livrare controlata a antibioticelor (sulfadiazina de argint) din membrane de chitosan/celuloza si **a unui procedeu de obtinere si asamblare**. Conform inventiei, **modelul de pansament** cu eliberare controlata este gandit pentru tratarea ranilor dermice si este format din mai multe componente: nanoparticule termosensibile de alcool polivinilic (APV) si poli(N-izopropilacrilamida) (PNIPAM) incapsulate cu sulfadiazina de argint; membrane din chitosan/celuloza (chitosan reticulat fizic si celuloza tratata); sistem de eliberare controlata rezultat prin incarcarea nanoparticulelor (APV/PNIPAM) in membranele de chitosan/celuloza.

Nanoparticulele au o structura miez-coaja (core-shell) si sunt obtinute printr-o ~~reactie~~ reactie de polimerizare. Reactia presupune polimerizarea monomerului N-izopropilacrilamida in prezenta unui agent de stabilizare (APV), initiator (persulfat de potasiu) si a unui ulei (oleat de metil). Nanoparticulele se obtin din solutii de APV si NIPAM cu concentratii variate in intervalul 0,5 % -5% (masic). Oleatul de metil este in concentratie 0,5% fata de masa de reactie (v/v). Incapsularea medicamentului in nanoparticule se face prin dizolvarea sulfadiazinei in suspensia de nanoparticule sub agitare intensa. Membranele se obtin din solutie de chitosan si suspensie de microparticule de celuloza bacteriana. Microparticulele de celuloza se obtin prin maruntirea unor membrane de celuloza bacteriana. Nanoparticulele sunt incarcate in membrane in timpul prepararii amestecului de solutii de chitosan si alcool polivinilic.

INTRODUCERE

Tratarea ranilor dermice este intens abordata in literatura de specialitate avand in vedere incidenta destul de mare. Ranile dermice sunt de obicei asociate cu perturbari ale tesutului dermic precum ruperea sau discontinuitatea tesutului (intreruperea continuitatii tegumentului). Provenienta acestor rani dermice este destul de larga si se poate clasifica in rani accidentale, intentionate sau datorate unor afectiuni sau boli [1-4]. Procesul de vindecare al acestor rani este unul complex si dinamic deoarece necesita o interactiune specifica intre celulele dermice, factorii de crestere, vasele de sange sau matricea extracelulara (proces de cicatrizare). De asemenea, procesul de vindecare depinde de actiunea unor factori externi, acestia putand intarzia cicatrizarea: diabet zaharat, infectiile, steroizii si anabolizantele, necroza tisulara, oxigenarea inadecvata, tensiunea excesiva a suturii chirurgicale, etc. In plus, plagile profunde

creaza conditii optime pentru dezvoltarea locala a germenilor anaerobi. Procesul de vindecare parcurge cateva etape precum coagularea, inflamarea, proliferarea celulara si maturarea. Un rol foarte important in acest proces il au pansamentele. Acesta impiedica in primul rand infectarea ranii cu bacterii din exterior (germeni microbieni) [4-6]. Izolarea ranii se face de obicei cu materiale sterile si biocompatibile pe baza de polimeri. Una dintre multiplele cauze generatoare de rani dermice, ulcerul varicos, prezinta un interes special pentru acesta propunere de brevet. Acest lucru este datorat faptului ca ranile dermice generate de ulcerului varicos necesita o ingrijire mai atenta si pansamente speciale care sa indeplineasca mai multe roluri. Ulcerul varicos apare din cauza functionarii necorespunzatoare a sistemului sangvin care iriga pielea, acesta ne mai asigurand aportul de oxigen si nutrienti. Aparitia se face atunci cand pielea permite bacteriilor si aerului sa ajunga la tesutul de baza. Astfel, ranile datorate ulcerului varicos sunt in cea mai mare parte si pasibile de infectare. Pansamentele pentru tratarea unor astfel de rani trebuie sa asigure un mediu umed la suprafata ranii, sa fie capabil sa indeparteze exudatul si sa previna infectia sau schimbul de gaze sau apa cu exteriorul [5-9]. Literatura de specialitate prezinta numeroase brevete in care au fost dezvoltate pansamente pentru ranile dermice:

Brevetul **US009499852 B2** prezinta dezvoltarea de vezicule pentru terapia ranilor dermice capabile sa previna infectia bacteriana precum cea cu *Staphylococcus aureus* sau *Pseudomonas aeruginosa*. Sistemul de vezicule este obtinut din straturi duble de lipid pe baza de 1,2-dipalmitol-sn-glicero-3-fosfocoline (DPPC), 1,2-dipalmitol-sn-glicero-3-fosfatetanolamina (DPPE) si sterol. Stratul dublu lipidic este constituit din diferite cantitati de DPPC si DPPE (40-65%).

In brevetul **US2009/0326496 A1** sunt propuse pansamente pentru tratarea ranilor dermice pe baza de hidrogeluri polimerice armate cu fibre netesute din celuloza. Hidrogelul este format din straturi multiple. Prezenta fibrelor de carboximetilceluloza favorizeaza capacitatea de absorbtie a exudatului rezultat din structura ranii. Compozitia chimica a gelurilor este data de polimeri precum poliuretani si celuloza modificata (hidroxietilceluloza, hidroxipropilmetilceluloza) sau acrilati.

Pansamente pentru ranile dermice sunt prezentate si in brevetul **EP2370035 B1**. Aceste pansamente se bazeaza pe fibre polimerice hidrofobe din acetat de celuloza. Pansamentul contine si un material hirofil necesar pentru absorbtia exudatului. Acest pansament este capabil sa ofere aderenta pentru microorganismele nedorite si sa nu le permita pantrunderea la nivelul ranii. Aceasta capacitate de protectie a ranilor este realizata fara folosirea unor antibiotice.

Din brevetul **EP1587502 B1** se cunosc pansamente cu capacitate crescuta pentru absorbtia fluidelor (superabsorbant) rezultate la nivelul ranii. Pansamentul este format dintr-o parte interioara absorbanta si un strat subtire din silicon elastomeric cu rol de adeziv la suprafata pielii. Acest lucru permite pansamentului sa adere la suprafata pielii din jurul ranii si sa se muleze dupa forma anatomica de protejat.

In brevetul **US007119247 B2** sunt propuse pansamente sub forma de film pentru tratarea ranilor din zona cateterelor. Pansamentul este format dint-un strat de spuma cu fereastră de acces pentru verificarea zonei cateterului. In plus, pansamentul poate fi imbracat in jurul sau cu un strat de silicon necesar pentru o protectie si fixare avansata.

Brevetul **US007704523 B2** se axeaza pe dezvoltarea unui pansament pentru rani cronice precum ulcerele (varicos sau diabetic). Pansamentele pe baza de celuloza bacteriana modificata contin aditivi cu activitate antimicrobiana care blocheaza dezvoltarea culturilor bacteriene la nivelul ranii. Aditivii contin clorura de polihexametilen biguadina.

In concluzie, se poate afirma faptul ca brevetele care propun dezvoltarea de pansamente cu eliberare controlata de sulfadiazina (antibiotic) pe baza de nanoparticule polimerice incarcate in membrane de chitosan/celuloza sunt axate pe protectia ranilor dermice ce necesita o ingrijire speciala. In literatura se remarca lipsa dezvoltarii de pansamente pentru livrarea de antibiotice in cazul ranilor cronice, iar propunerea de brevet isi propune sa abordeze exact aceasta nisa.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unui model de pansament sub forma de membrane polimerice din chitosan/celuloza incarcate cu nanoparticule polimerice capabile sa asigure protectia ranilor cronice si sa elibereze controlat medicament. Pansamentul in ansamblul sau este un amestec de chitosan si celuloza bacteriana sub forma de membrana si nanoparticule incarcate. Astfel, membrana are mai multe roluri: acopera zona ranii oferind protectie impotriva factorilor externi precum bacterii, aer, umiditate, frig, etc. In acelasi timp este capabila sa preia exudatul generat de rana, sa asigure un mediu umed si sa fie suport pentru nanoparticulele de APV/PNIPAM incapsulate cu sulfadiazina. Aceste nanoparticule au rolul de a incapsula si de a elibera controlat sulfadiazina. O incarcare directa a medicamentului in membrana ar duce la o eliberare prea rapida.

Domeniul livrării de medicamente este intr-o permanenta dezvoltare si atrage schimbari de abordare in functie de aplicatia directa. Posibilitatea utilizarii polimerilor de origine naturala in obtinerea pansamentelor este un mare avantaj pentru acest domeniu. Polimeri precum chitosanul sau celuloza bacteriana asigura o biocompatibilitate ridicata cu zona afectata ce trebuie protejata. Mai mult, chitosanul este un promotor al refacerii celulare iar in tratarea ranilor dermice se pare ca poate reduce intensitatea durerii prin actiunea asupra terminatiilor

nervoase. Celuloza bacteriana are structura fibrilara si ofera pansamentului o rezistenta mecanica superioara dar si capacitatea de absorbtie a fluidelor.

Utilizarea unor materiale corespunzatoare, combinarea si tratatarea lor chimica este foarte importanta in dezvoltarea pansamentului destinat ranilor cronice propus de acest brevet. Principalii polimeri utilizati, chitosanul si celuloza au multiple aplicatii biomedicale.

Celuloza este o compus macromolecular natural din clasa polizaharidelor, fiind constituentul principal al membranelor celulelor vegetale. Celuloza este biopolimerul cu cea mai mare importanta economica, productia mondiala fiind in continua crestere datorita cererii in diverse domenii: ambalaje, constructii, industria alimentara, cosmetica, confectii textile, protectia mediului, industria petrolului sau medicina. Formula chimica este $(C_6H_{10}O_5)_n$ unde n variaza intre 700 - 800 si 2500 - 3000. Celuloza este formată din molecule de glucoza (unitati glucopiranozice) legate in pozitia β 1-4 [10-14]. Celuloză bacteriană (BC) este sintetizată de bacterii aparținând speciilor *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* sau *Sarcina*. O singură celula de bacterie care produce acidul acetic (*acetobacter xylinum*) poate asambla pana la 108 molecule de glucoză pe ora. Membrana acestor celule prezinta orificii prin care sunt evacuate grupuri de macromolecule de celuloza (nano-filiiere) ce sunt asamblate in exterior sub forma unei membrane gelatinoase foarte rezistenta si cu un continut ridicat în apa [12-18]. Cei mai eficienti producatori ai celulozei bacteriene sunt bacteriile acidului acetic gram-negative, *Acetobacter xylinum*. Una dintre cele mai importante caracteristici ale BC este puritatea chimica. Acest lucru o distinge fata de cea din plante care conține de obicei și hemiceluloza și lignina, a caror indepartare este dificil de realizat [18, 19].

Chitosanul (CS) este o polizaharida cu structura liniara, un polimer natural care se extrage din carapacea crustaceelor sau din peretele celular al fungilor. Industrial, este obtinut prin deacetilarea chitinei prin tratare in mediu bazic. Chitina rezulta in urma procesului de tratare a carapacelor de crustacee. CS este compus din unitati de D-glucozamina distribuite aleator (unitate deacetilata) si unitati de N-acetil-D-glucozamina (unitate acetilata). Proprietatile chitosanului sunt puternic influentate de doi parametri: gradul de deacetilare si masa moleculara. Gradul de deacetilare cel mai uzual pentru aplicatiile biomedicale este de 75%. Chitosanul este intens utilizat atat pentru aplicatii comerciale cat si aplicatii biomedicale. Acesta poate fi folosit in agricultura, pentru tratarea semintelor si ca bio-pesticid, ajutand plantele sa lupte impotriva infectiilor fungice. Pe scara industriala este de asemenea utilizat in procesele de filtrare a apei. Este considerat un bun hemostatic, de aceea chitosanul se utilizeaza in medicina pentru crearea unor bandaje destinate reducerii sangerarii cat si ca agent antibacterian, fiind utilizat in tratarea afectiunilor sau sangerarilor gingivale. Este cunoscut



pentru proprietatile sale de vindecare a ranilor si de a ajuta la refacerea osoasa. In plus, este un compus non-toxic si biocompatibil [1-4].

Concluzionand datele de literatura prezentate mai sus, propunerea de brevet se refera la obtinerea unui model de pansament pentru tratarea ranilor dermice cronice capabil sa elibereze controlat antibioticul sulfadiazina argentica. Modelul propus este constituit dintr-o membrana de chitosan/celuloza bacteriana incarcata cu nanoparticule de APV/PNIPAM. In aceste nanoparticule este incapsulata sulfadiazina argentica. Cererea evidentiaza metoda de preparare a acestor materiale cu compozitii variate, mecanismele de sinteza precum si testele de eliberare a sulfadiazinei din modelul de pansament. Testarea biologica a constat in evaluarea biocompatibilitatii membranei de chitosan/celuloza bacteriana incarcata cu nanoparticule de APV/PNIPAM.

In continuare vor fi descrise materialele utilizate in studiul experimental cat si metodele necesare pentru obtinerea si testarea materialelor descrise in cererea de brevet.

2. MATERIALE SI METODE

2.1 MATERIALELE

Materialele folosite pentru realizarea cererii de brevet sunt urmatoarele: chitosan de masa moleculara redusa, celuloza bacteriana maruntita, sulfadiazina argentica, alcool polivinilic, N-izopropilacrilamida. Alte materiale si substante folosite: hidroxid de sodiu, fosfat acid de potasiu, apa, trishidroximetil aminometan, acid clorhidric, clorura de calciu.

Celuloza bacteriana este sintetizata de bacterii apartinand speciilor *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* si *Sarcina*. Celuloza bacteriana ofera mai multe avantaje decat celuloza obtinuta din plante (PC). Studii extinse asupra BC au dezvaluit ca aceasta este identica din punct de vedere chimic cu PC, dar are structura macromoleculara si proprietati diferite. BC difera de PC prin indicele mare de cristalinitate (60%) si prin diferitele grade de polimerizare. Morfologia macroscopica a BC depinde strict de conditiile culturii din care este sintetizata. Trasaturile structurale ale celulozei bacteriene (BC) sunt cu mult superioare fata de cele ale celulozei din plante. Structura nanofibrilara consta intr-un aranjament structural tridimensional ce permite obtinerea celulozei sub forma de straturi suprapuse cu suprafata specifica mare si cu porozitate ridicata. Mai mult, gradul de cristalinitate si proprietatile mecanice sunt mult mai mari ceea ce duce la o crestere a utilizarii in diverse domenii de activitate si in special in domeniul medical.

Sulfadiazina argentică este un antibiotic utilizat pentru tratamentul și prevenția infecțiilor la nivelul pielii datorate arsurilor severe și alte altor afecțiuni ale epidermei (rani cronice) cum ar fi ulcere varicoase. Mai este folosită pentru profilaxia infecțiilor bacteriene în cazul grefelor de piele. Este compus care face parte din categoria sulfamidelor.

Alcool polivinilic este un polimer sintetic netoxic, cu numeroase aplicații biomedicale datorită biocompatibilității și versatilității chimice. Se prezintă sub formă de pulbere sau granule de culoare albă, incolor și inodor. O caracteristică importantă a alcoolului polivinilic este solubilitatea în apă. Această caracteristică este dependentă de masa moleculară și gradul de hidroliză. Gradul de hidroliză influențează în principal solubilitatea APV în apă. Astfel, un APV cu un grad mare de hidroliză (98-99%) este greu solubil în apă și necesită temperaturi ridicate pentru solubilizare, în timp ce un APV cu un grad mai mic de hidroliză (88-90%) are solubilitatea mărită în apă și se dizolvă la temperaturi mai mici. Masa moleculară influențează în principal viscozitatea soluțiilor obținute.

Este un polimer sintetic obținut printr-o reacție polimer analogă ce presupune hidroliza poliacetatului de vinil în mediu bazic. Are numeroase aplicații alimentare, în industria medicamentelor, cosmetica sau medicina. Principalele caracteristici de care depinde utilizarea biomedicală sunt gradul de hidroliză și masa moleculară. Gradul de solubilitate și implicit utilizarea în soluții apoase sunt dependente de aceste două caracteristici.

Poli(N-izopropilacrilamida) (PNIPAM) este un polimer sintetic cu înaltă utilizare în domeniul biomedical datorită proprietăților termosensibile și bune biocompatibilități.

Această caracteristică este dependentă de structura chimică și ține de balanța hidrofil-hidrofob. Polimerul are caracter dual dar balanța se înclină spre unul din caractere în funcție de temperatură. PNIPAM este capabil să răspundă la stimuli ce presupun variații de temperatură. În unele situații este capabil să răspundă și la stimuli dați de variația pH-ului. Aceste caracteristici îi conferă posibilitatea utilizării pentru dezvoltarea de sisteme de eliberare controlată sau ingineria tisulară.

2.2. METODE

2.2.1. Obținerea soluției de chitosan

Chitosanul este un polimer ce conține pe catena numeroase grupe amino responsabile pentru stabilirea de interacțiuni fizice pe baza de legături de hidrogen. Pentru solubilizare în soluții apoase aceste legături fizice trebuie să fie îndepărtate. Soluția o reprezintă utilizarea unui mediu acid capabil să protonizeze grupele amino. În acest sens, solubilizarea chitosanului este realizată în mediu acid (acid clorhidric) 0,1M. A fost obținută o soluție de chitosan de masa moleculară

redusa (50000-190000 g/mol) cu concentratia 7% (w/v) in mediu acid prin adaugarea treptata a polimerului in solutia de dizolvare. Dupa obtinere, solutia de chitosan este stocata in frigider la temperatura de 5 °C.

2.2.2. Obtinerea suspensiei de celuloza bacteriana

Celuloza bacteriana are o structura fibrilara ceea ce ii confera proprietati mecanice superioare comparativ cu celuloza microcristalina din plante. In ceea ce priveste solubilitatea, structura fibrilara este un dezavantaj iar procesul necesita conditii drastice (diferiti solventi sau conditii de temperatura). Celuloza pentru dezvoltarea modelelor de pansamente a fost folosita sub forma de suspensie de microparticule dupa ce membrana de celuloza a fost in prealabil maruntita prin tratament mecanic. Dupa obtinere, suspensia de celuloza bacteriana este stocata in frigider.

2.2.3. Obtinerea solutiei de alcool polivinilic

Solutia de alcool polivinilic este obtinuta prin adaugarea treptata a polimerului in apa la temperatura de 40 °C. Adaugarea polimerului in portii prestabilite se face pentru evitarea formarii aglomeratelor si pentru o dizolvare mai rapida. Au fost obtinute solutii cu concentratii in intervalul 0,5%-5% (procente masice). Solutia cu concentratii ridicate (pana la 5%, procent masic) necesita un timp mai mare pentru dizolvare (aproximativ 4-5 ore).

2.2.4. Obtinerea nanoparticulelor termosensibile de APV/PNIPAM si incapsularea cu sulfadiazina argentica

Procedeul de obtinere a nanoparticulelor de APV/PNIPAM necesita parcurgerea mai multor etape:

- Obtinerea amestecului APV/NIPAM (caracterizat prin raport masic 50-50) si adaugarea initiatorului. Solutia de monomer NIPAM este preparata in paralel cu solutia de APV prezentata mai sus. Se obtin solutii apoase de NIPAM (0,5%-5% masic) prin adaugarea monomerului in apa la temperatura camerei. La sfarsitul procesului de dizolvare se adauga si initiatorul (persulfat de potasiu- KP). Cele doua solutii sunt filtrate si lasate la amestecat timp de 2-3 ore.
- In solutia apoasa de APV/NIPAM/KP se adauga oleatul de metil (MO) astfel incat sa se obtina un raport volumetric de 0,5:100 (v/v) in favoarea solutiei apoase. Amestecul este lasat la agitare intensa timp de aproximativ 12 ore pentru generarea suspensiei.
- Suspensia de APV/NIPAM/KP/MO este incalzita timp de 4-5 ore la temperatura de 60 °C pentru reactia de polimerizare. Dupa polimerizare se obtin nanoparticule cu structura miez-coaja/invelis de APV/PNIPAM/MO suspendate in mediul apos.

Incapsularea medicamentului in nanoparticule se face prin metoda indirecta. Astfel, suspensia de nanoparticule se concentreaza prin incalzire pentru eliminarea unei cantitati semnificative de apa. In suspensia concentrata se adauga medicamentul sub agitare intensa. Dupa adaugarea medicamentului, suspensia este lasata la incapsulat timp de 12 ore.

Dupa incapsulare, suspensia este din nou concentrata prin incalzire la temperatura de 60 °C astfel incat sa rezulte o masa umeda de nanoparticule.

2.2.5. Obținerea membranelor de chitosan/celuloza si incarcarea cu nanoparticule termosensibile

Prepararea modelelor pansamentelor consta, de asemenea, in mai multe etape:

- Prepararea unor solutii anexe de hidroxid de sodiu si clorura de calciu necesare pentru reticularea fizica a chitosanului si stabilizarea microparticulelor de celuloza. A fost preparata o solutie apoasa de hidroxid de sodiu de concentratie 5% (w/v) si o solutie apoasa de clorura de calciu de concentratie 10% (w/v).

- Se prepara amestecul solutie chitosan/suspensie celuloza in care se adauga diferite cantitati de nanoparticule termosensibile (raport masic nanoparticule/membrana in intervalul 5...30 / 95...70). Se prezinta urmatoarele formulari: 15/85 raport masic – nanoparticule/membrana cu nanoparticule din 0,5% concentratie (0,5% MO v/v); 30/70 raport masic– nanoparticule/membrana cu nanoparticule din 0,5% concentratie (0,5% MO v/v); 15/85 raport masic – nanoparticule/membrana cu nanoparticule din 5% concentratie (0,5% MO v/v); 30/70 raport masic – nanoparticule/membrana cu nanoparticule din 5% concentratie (0,5% MO v/v);

- Fiecare formulare este depusa in cate un vas Petri pentru generarea formei de membrana. Amestecul este tratat cu solutia de hidroxid de sodiu timp de 10 minute pentru reticularea fizica a chitosanului si tratarea celulozei. Solutia de hidroxid este indepartata si este adaugata a doua solutie, clorura de calciu, pentru stabilizarea celulozei tratate initial. Stabilizarea cu solutia de clorura dureaza aproximativ 10 minute. Membranele obtinute sunt spalate pe suprafata cu apa distilata pentru indepartarea urmelor de clorura de calciu si hidroxid de sodiu. Dupa spalare, membranele incarcate sunt uscate la temperatura camerei timp de 2-3 zile pentru indepartarea apei. Uscarea se face la temperatura joasa (25 °C) pentru a evita ruperea sau deformarea membranelor.

2.2.6. Caracterizarea morfologica a nanoparticulelor termosensibile si a membranelor prin Microscopie electronica de baleiaj (SEM) si Microscopie electronica prin transmisie (TEM)

Nanoparticulele termosensibile obtinute din doua concentratii (0,5% si 5% masic), membrana de chitosan simplu cat si membrana finala au fost investigate din punct de vedere morfologic

pe doua aparate: microscop electronic Quanta Inspect F (SEM) echipat cu tun de electroni. si un microscop electronic TECNAI F30 G2 S-TWIN (TEM) operat la 300 kV si echipat cu analizor EDAX

2.2.7. Teste de eliberare a sulfadiazinei argentice

Pentru testele de eliberare nanoparticulele au fost uscate in vederea stabilirii unei mase constante de analizat. Testele de eliberare au presupus adaugarea nanoparticulelor uscate intr-o membrana de celuloza. Membrana de celuloza a fost imersata intr-un flacon cu solutie tampon. Sulfadiazina eliberata din platforma trece prin membrana de celuloza si ajunge in solutia tampon. Din solutie se colecteaza la intervale stabilite de timp proba pentru analiza UV-VIS (Spectrometru Shimadzu). In cazul membranelor finale, acestea sunt imersate in flacoane cu solutie tampon. Medicamentul eliberat in solutia tampon este direct colectat pentru analiza UV-VIS. Pentru pastrarea unui volum constant de solutie tampon, dupa fiecare colectare se adauga un volum de solutie tampon proaspata.

2.2.8. Caracterizarea fizico-chimica a membranelor prin spectroscopie FTIR

Membrana finala de chitosan/celuloza bacteriana a fost investigata din punct de vedere fizico-chimic pe un aparat Bruker Vertex 70 FT-IR spectrometru cu o rezolutie la 4 cm^{-1} si 32 de scanari consecutive (FTIR);

2.2.5. Evaluarea biocompatibilitatii membranelor de chitosan/celuloza incarcate cu nanoparticule de APV/PNIPAM pe celule fibroblaste dermale umane apartinand liniei CCD1070Sk

Model celular in vitro

Pentru testarea *in vitro* a biocompatibilitatii membranelor de chitosan/celuloza bacteriana incarcate cu nanoparticule de APV/PNIPAM s-a utilizat ca și model celular in vitro linia celulară de fibroblaste dermale umane CCD – 1070SK. In figura 8 este prezentata morfologia tipica a acestor celule. Toate procedurile care implica manipularea culturilor celulare au fost realizate în camera curata, utilizand echipamentele specifice cu care este dotata. Celulele au fost cultivate pe tot parcursul realizării studiilor în condiții standard de cultură, prin incubare la $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, intr-o atmosferă umeda de 5% CO_2 . Mediul de cultura in care s-a menținut aceasta linie celulara este Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM), care se prepara prin suplimentarea unui flacon de DMEM low glucose cu 3,5 g de glucoza, 1,5 g carbonat acid de sodiu, 10% ser fetal bovin (SFB) si 1% antibiotic antimicotic (ABAM), care in continuare va fi denumit mediu de cultura complet DMEM.



Evaluarea viabilitatii celulare a fibroblastelor dermale umane CCD – 1070Sk cultivate pe membranele de chitosan/celuloza incarcate cu nanoparticule de APV/PNIPAM, prin testul MTT.

Modelul 3D propus pentru analiza *in vitro* a constat intr-o membrana de celuloza bacteriana si chitosan incarcata cu nanoparticule Tip I (APV și PNIPAM 5%) sau Tip II (APV și PNIPAM 0,5%) incarcate cu sulfadiazina argintica. Controlul a fost reprezentat de o membrana de celuloza bacteriana si chitosan.

Pentru evaluarea interactiei fibroblastelor dermale cu modelul 3D propus, celulele CCD - 1070Sk au fost insamantate pe suprafata membranelor polimerice la o densitate initiala de 5×10^4 celule/cm² si mentinute in contact direct cu aste modele 3D timp de 5 zile. Viabilitatea acestor celule a fost investigata la 24 de ore si 5 zile de la insamantare prin testul spectrofotometric MTT.

Pentru realizarea testului MTT, dupa 24 ore si 5 zile de la insamantare, mediul de cultura a fost indepartat si toate probele au fost spalate cu PBS pentru a elimina orice urma de SFB care ar putea interfera cu compusul MTT. Probele au fost apoi incubate într-o solutie de MTT (1mg/mL), timp de 4 ore, la 37 °C, într-o atmosfera umeda de 5% CO₂. Dupa expirarea timpului, solutia MTT a fost indepartata, iar cristalele de formazan formate (fig. 9) au fost solubilizate in DMSO. Densitatea optica a solutiei violet astfel obtinute a fost cuantificata prin spectrofotometrie, intensitatea coloratiei violet fiind direct proportionala cu numarul celulelor vii din proba, utilizand spectrofotometrul Flex Station III (Molecular Devices), la o lungime de unda de 550 nm. Datele obtinute au fost prelucrate statistic si reprezentate grafic utilizand softul GraphPad Prism 6.0 (One Way ANOVA).

3. REZULTATE OBTINUTE IN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENTIE

3.1. Obtinerea nanoparticulelor termosensibile

In cadrul cererii de brevet a fost obtinut model de pansament pentru eliberarea controlata de antibiotic in domeniul tratarii ranilor dermice. In prima parte au fost dezvoltate nanoparticule termosensibile cu structura miez-coaja/invelis pe baza de alcool polivinilic si poli(N-izopropilacrilamida). In acest sens, au fost dezvoltate *tipuri de nanoparticule* din solutii cu concentratii in intervalul 0,5%-5% (masic). Pentru exemplificare sunt prezentate 2 tipuri de nanoparticule in care a fost incapsulata sulfadiazina argintica prin dizolvare in suspensia de nanoparticule (Figura 1, solutii 0,5% si 5% masic).

3.2. Obtinerea membranelor finale (model de pansamente) incarcate cu nanoparticule termosensibile

Nanoparticulele au fost incarcate in timpul prepararii membranelor si astfel au fost exemplificate 4 formulari diferite in care variaza raportul chitosan/celuloza si raportul cantitate nanoparticule/cantitate membrana:

- raport masic 15/85 – cantitate nanoparticule/cantitate membrana cu nanoparticule din 0,5% concentratie (0,5% MO v/v); raport masic 30/70 – cantitate nanoparticule/cantitate membrana cu nanoparticule din 0,5% concentratie (0,5% MO v/v); raport masic 15/85– cantitate nanoparticule/cantitate membrana cu nanoparticule din 5% concentratie (0,5% MO v/v); raport masic 30/70 – cantitate nanoparticule/cantitate membrana cu nanoparticule din 5% concentratie (0,5% MO v/v);

3.3. Caracterizarea morfologica a nanoparticulelor termosensibile si a membranelor prin Microscopie electronica de baleiaj (SEM) si Microscopie electronica in transmisie (TEM)

Nanoparticulele au fost caracterizate din punct de vedere morfologic si al structurii interne. Diferente semnificative apar intre nanoparticulele preparate din solutii cu concentratie 0,5% si cele din solutii cu concentratie 5%. Analiza SEM prezinta o dimensiune mai redusa in primul caz, dimensiunea medie fiind undeva intre 40 si 50 nm. In cazul celor din concentratie de 5% dimensiunea se situeaza in intervalul 100-200 nm. Ambele formulari prezinta nanoparticule individualizate si cu morfologie rotunda (Figura 2). Analiza structurarii interne este pusa in evidenta prin analiza TEM. Astfel, structura de miez-coaja este evidentiata in figura 3 pentru particulele cu dimensiuni mai mari (5% w/v).

Membranele finale au fost si ele caracterizate din punct de vedere morfologic. Pentru a pune in evidenta structura modelelor data de compozitia chitosan/celuloza, a fost necesara si analiza morfologica a unei membrane simple din chitosan. Figura 4 prezinta morfologia suprafetei unei astfel de membrane. Comparativ, figura 5 expune morfologia suprafetei unei membrane finale (model pansament) cu diferente semnificative. Diferentele de morfologie a suprafetei sunt puse pe seama prezentei celulozei bacteriene. Aceasta se pare ca este majoritar distribuita la suprafata membranei probabil datorita unei compatibilitati reduse cu chitosanul. In plus, imaginile SEM (Figura 5) pun in evidenta faptul ca microparticulele de celuloza bacteriana sunt prezente pe suprafata membranei si probabil chitosanul este prins in structura interna a membranei. Acest lucru arata faptul ca celuloza este stabilizata si ramane prinsa pe suprafata chitosanului. Stabilizarea celulozei este realizata de catre clorura de calciu dupa un tratament in mediu bazic.

3.4. Teste de eliberare a sulfadiazinei argentice

Analiza testelor de eliberare a medicamentului a fost realizata in solutie tampon la pH neutru si temperatura corpului. Figura 6 evidentiaza curbele de eliberare pentru sulfadiazina incapsula in cele doua tipuri de nanoparticule. Comportamentul de eliberare nu prezinta diferente semnificative in prima parte a testului (120 de minute), ci spre sfarsitul procesului de eliberare unde nanoparticulele obtinute din 0,5% concentratie ating o eficienta mai mare (89%), dar intr-un timp mai lung.

3.5. Caracterizarea fizico-chimica a membranelor prin spectroscopie FTIR

Analiza FTIR prezinta spectrul chitosanului, polimerul majoritar din modelul de pansament, si spectrul modelului. Principale maxime caracteristice apar in domeniul 3366 cm^{-1} specific pentru gruparile hidroxil/amino, in domeniul 2900 cm^{-1} specific pentru legaturile carbon-hidrogen, in domeniul 1600 cm^{-1} specific pentru gruparea carbonil si N-H de deformare si in domeniul $1500-1100\text{ cm}^{-1}$ specific pentru legaturile C-C, C-O sau legatura esterica. Modificarile aparute in spectrul final sunt puse pe seama unei structurari diferite a chitosanului datorita procesului de reticulare fizica.

3.6. Testarea biocompatibilitatii membranelor de chitosan/celuloza incarcate cu nanoparticule de APV/PNIPAM

Dupa prelucrarea statistica a datelor cu ajutorul softului GraphPad Prism si reprezentarea grafica a acestora (fig. 10), se poate observa ca la 24 ore de la insamantare viabilitatea celulelor de pe membranele de celuloza bacteriana si chitosan incarcate cu nanoparticule de tip I si II este similara cu cea a celulelor cultivate pe membrane control.

Aceiasi observatie este valabila si dupa 5 zile de cultivare a celulelor, ceea ce indica faptul ca impregnarea membrane de celuloza bacteriana si chitosan cu nanoparticulele de tip I sau II nu ii modifica biocompatibilitatea. Mai mult, dupa 5 zile de la insamantare, viabilitatea celulelor este data de valorile absorbantelor detectate la 550 nm care sunt semnificativ mai mari decât dupa 24 de ore de cultivare, ceea ce indica faptul ca celulele CCD-1070Sk au proliferat pe suprafata membranelor 3D propuse spre testare.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obtinute in urma realizarii acestor studii se pot formula urmatoarele concluzii:

- Au fost obtinute nanoparticule termosensibile din APV/PNIPAM provenite din solutii cu concentratii in intervalul 0,5% -5% (masic).
- Sulfadiazina argintica a fost incapsulata in nanoparticulele termosensibile
- A fost realizata reticularea fizica a chitosanului si stabilizarea microparticulelor de celuloza

- Nanoparticulele termosensibile au fost incarcate in membrane
- Materialele au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic (FTIR), morfologic (SEM; TEM) si al comportamentului de eliberare a sulfadiazinei argentice (teste de eliberare)
- A fost validata biocompatibilitatea biomaterialelor pe celule fibroblaste dermale apartinand liniei celulare CCD1070Sk la 5 zile de la insamantare.

In concluzie, scopul si obiectivele cererii de brevet au fost indeplinite, acesta contribuind la dezvoltarea cunostintelor in domeniul obtinerii si utilizarii pansamentelor pentru vindecarea ranilor. Acest model de pansament cu medicament are proprietati imbunatatite pentru pentru tratarea ranilor dermice cronice si este constituit din chitosan, celuloza bacteriana, poli(N-izopropilacrilamida) si alcool polivinilic.



REVEDICARI

1. **Modelul de pansament cu eliberare controlata** este constituit din mai multe componente, respectiv membrane suport din chitosan/celuloza bacteriana si nanoparticule termosensibile din alcool polivinilic si poli(N-izopropilacrilamida), iar **procedeu de obtinere si asamblare** porneste e de la o reactie de polimerizare a monomerului N-izopropilacrilamida in prezenta alcoolului polivinilic si a oleatului de metil.

2. **Modelul de pansament cu eliberare controlata** conform *revendicarii 1*, caracterizat prin aceea ca el contine nanoparticule termosensibile constituite din amestecuri PNIPAM si APV cu raport masic 50:50 si au 0,5% oleat de metil drept miez, incapsulate cu un antibiotic, sulfadiazina argintica, si incarcate in membrana de chitosan/celuloza pentru obtinerea modelului de pansament. Concentratiile solutiilor apoase de monomer NIPAM si APV sunt in intervalul 0,5%-5% (masic).

3. **Modelul de pansament cu eliberare controlata** conform *revendicarii 1*, caracterizat prin aceea ca este constituit din membrane chitosan/celuloza bacteriana rezultate printr-un procedeu de reticulare fizica a chitosanului si o stabilizare a microparticulelor de celuloza bacteriana si incarcate cu nanoparticule termosensibile avand rapoarte masice nanoparticule/membrana in intervalul 5...30 / 95...70.

4. **Modelul de pansament cu eliberare controlata** conform *revendicarii 1*, caracterizat prin aceea ca microparticulele de celuloza bacteriana **au fost stabilizate in prezenta de clorura de calciu si pre-tratate in mediu basic.**

LEGENDA FIGURI

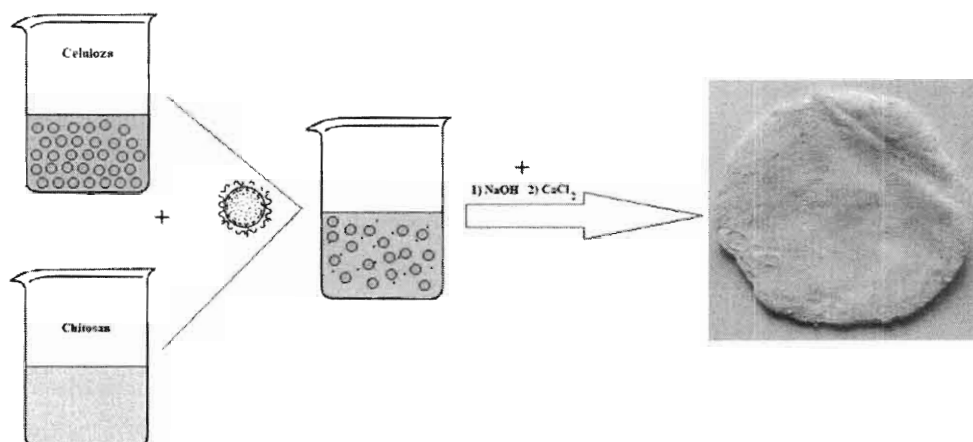


Figura 1. Reprezentare schematica a procedurii de obtinere/asamblare pentru model de pansament

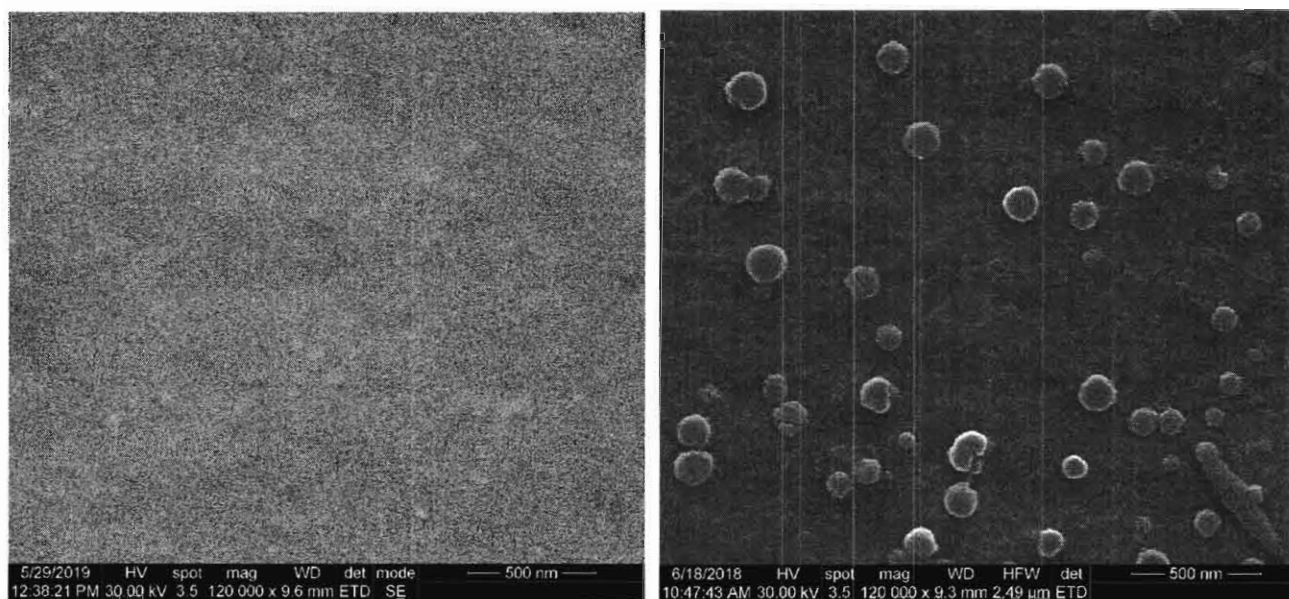


Figura 2. Nanoparticule termosensibile (0,5% stanga; 5% dreapta)



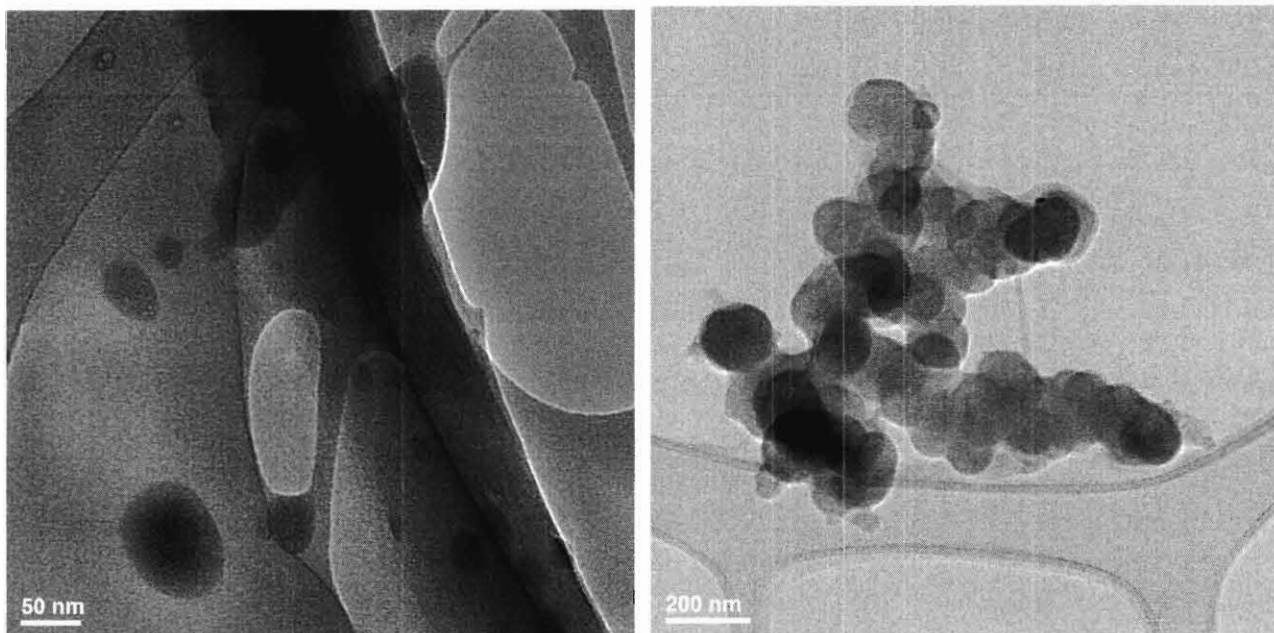


Figura 3. Microfotografii TEM ale nanoparticulelor

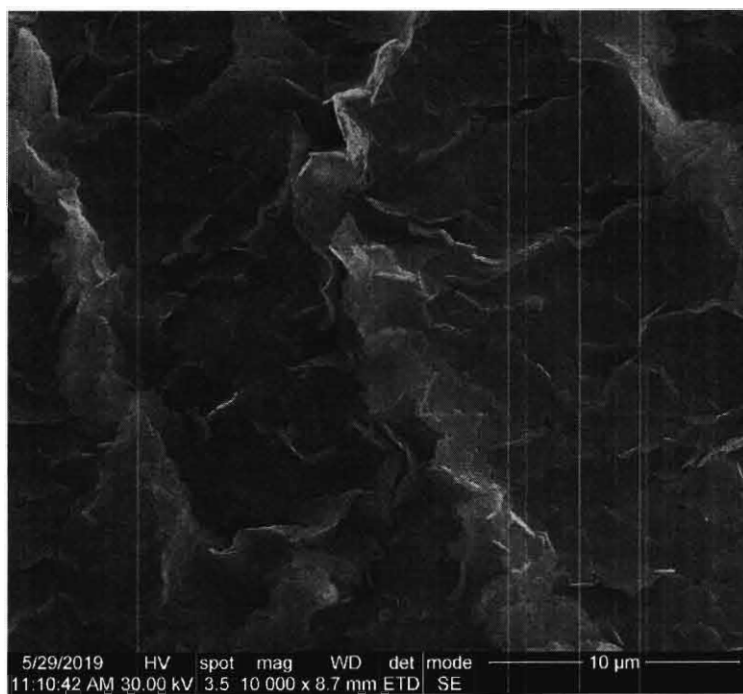


Figura 4. Microfotografii SEM ale unei membrane de chitosan

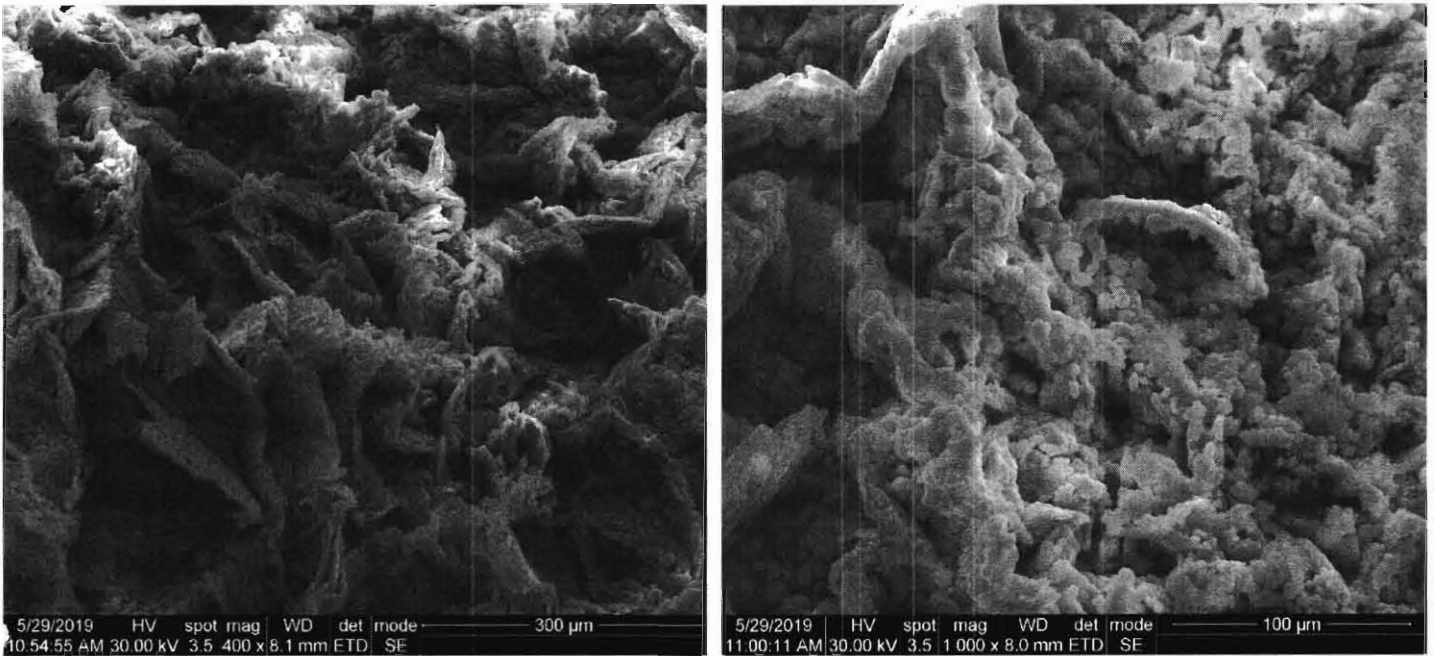


Figura 5. Microfotografiile SEM ale suprafeței membranei cu evidențierea celulozei stabilizate cu clorura de calciu

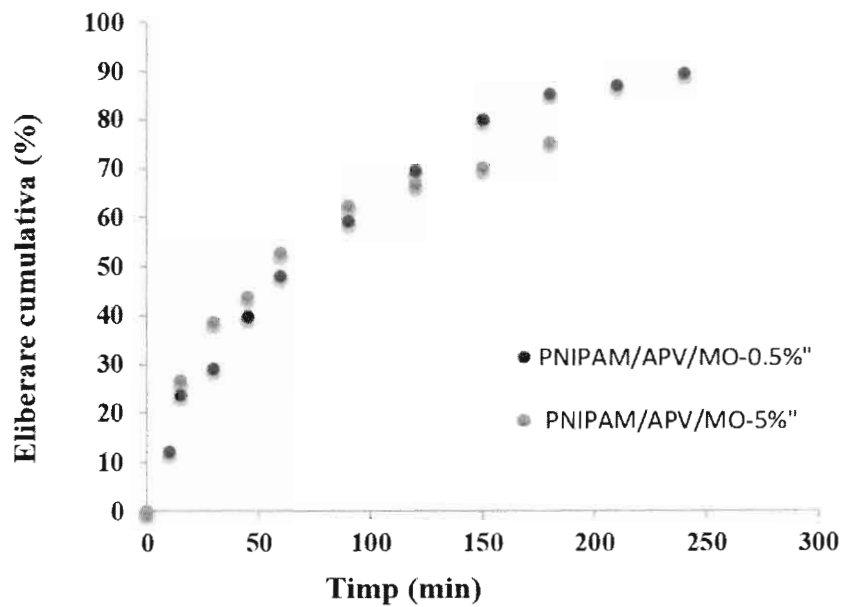


Figura 6. Teste de eliberare a sulfadiazinei argintice

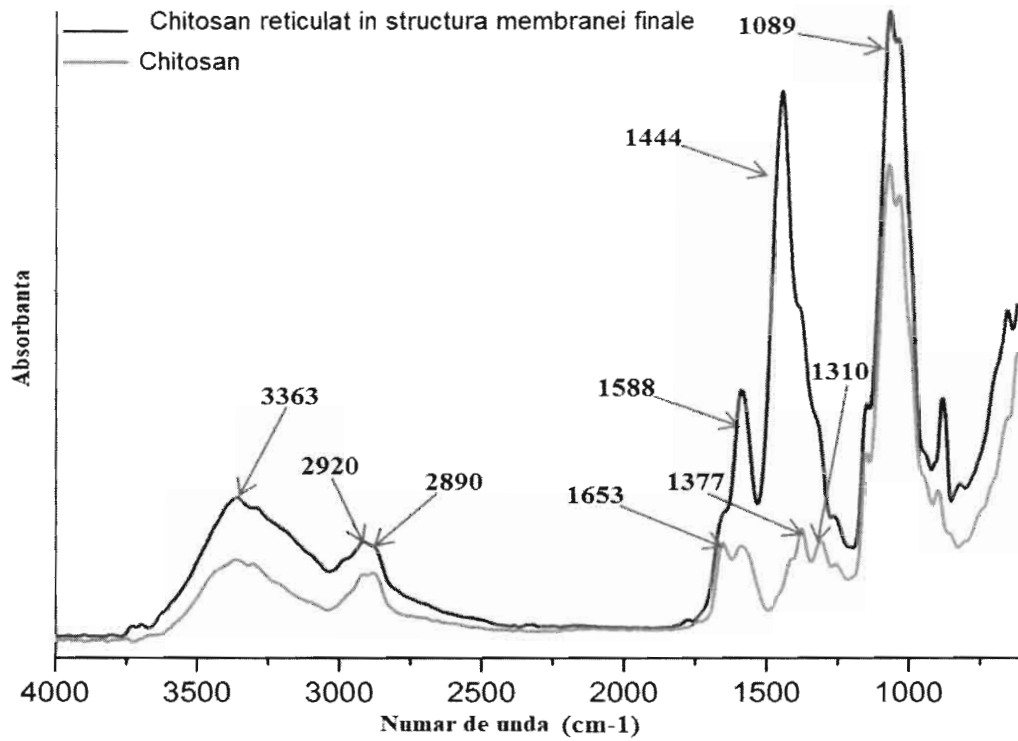


Figura 7. Analiza FTIR pentru chitosan si membrana obtinuta in final

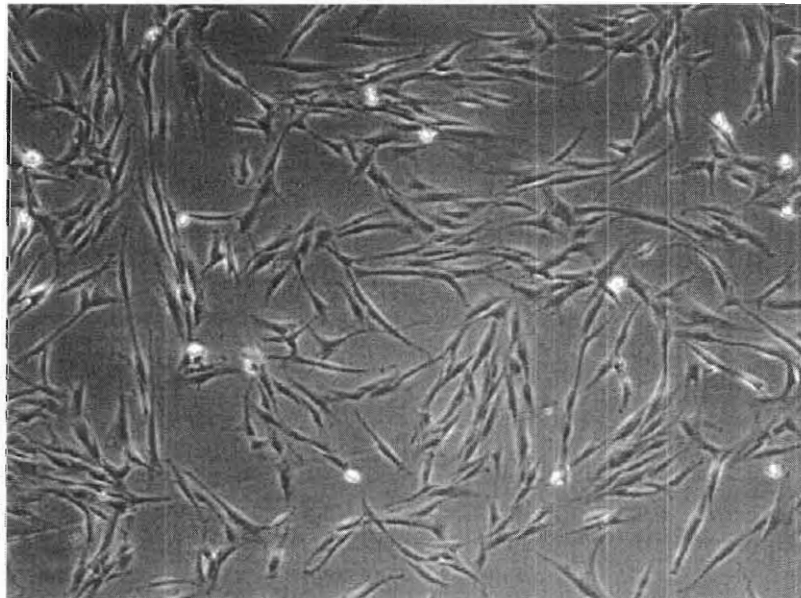


Figura 8. Imagine in contrast de faza a celulelor CCD – 1070Sk in cultura

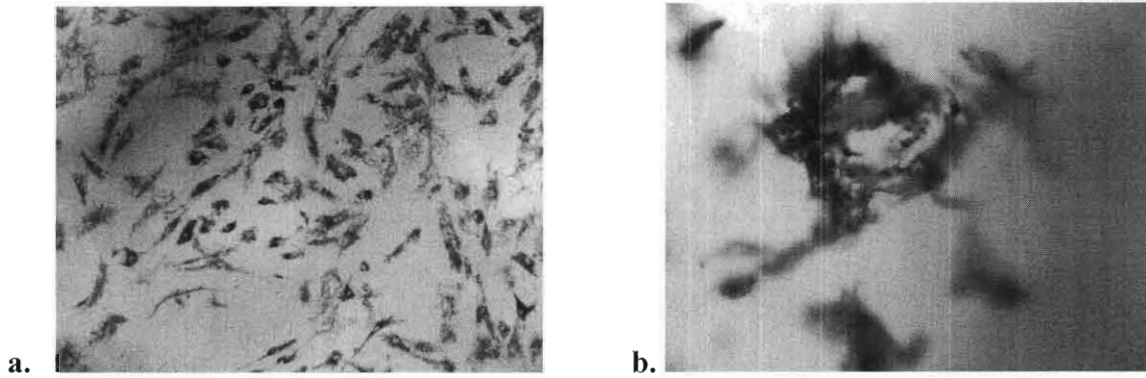


Fig. 9. Imagini in contrast de faza (a. OB 10x și b. OB 20X) in care se observa cristalele de formazani care s-au format in interiorul celulelor CCD-1070Sk cultivate pe suprafata membranelor polimerice

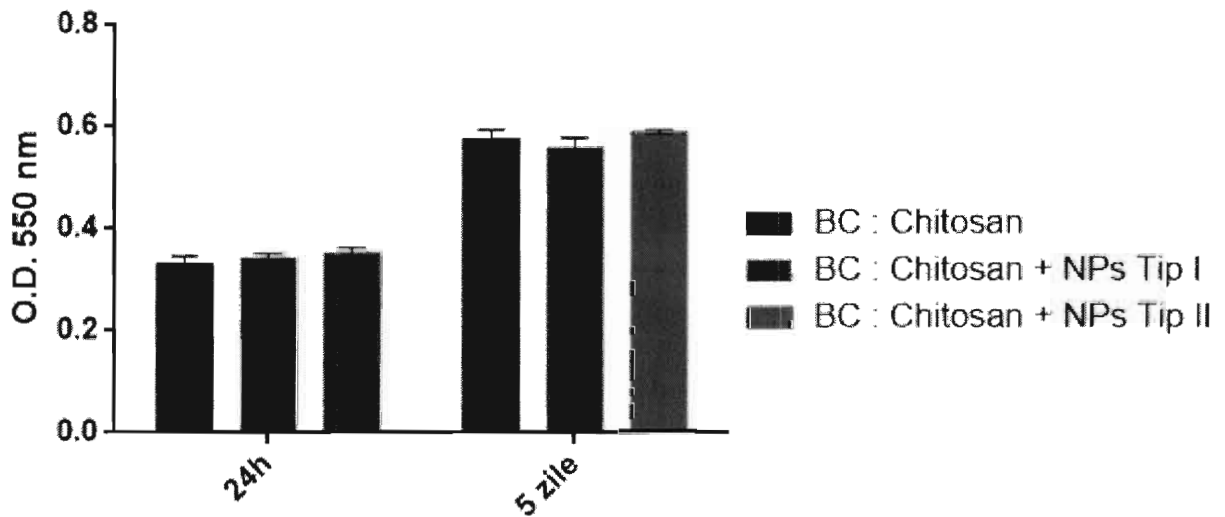


Figura 10. Grafic reprezentand viabilitatea celulelor CCD – 1070Sk la 24 ore si 5 zile de la insamantarea pe modelele 3D propuse