

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237657**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **429938**

(51) Int.Cl.  
**A61K 31/56 (2006.01)**  
**A61K 31/74 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **15.05.2019**

(54) **Modyfikowany polimer termoplastyczny o właściwościach przeciwzapalnych  
oraz sposób jego otrzymywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**16.11.2020 BUP 24/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**17.05.2021 WUP 10/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH,  
Katowice, PL**

**ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W KATOWICACH, Katowice, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ SWINAREW, Mysłowice, PL**

**JADWIGA GABOR, Chorzów, PL**

**STANISŁAW BORYCZKA, Sosnowiec, PL**

**URSZULA MAZUREK, Sosnowiec, PL**

**KRZYSZTOF JASIŃSKI, Katowice, PL**

**JOANNA GOŁA, Siemianowice Śląskie, PL**

**JAROSŁAW PALUCH, Sosnowiec, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Mariusz Grzesiczak**

**PL 237657 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest modyfikowany polimer termoplastyczny o właściwościach przeciwzapalnych oraz sposób jego otrzymywania.

Betulina [lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol] jest powszechnie występującym w przyrodzie triterpenem pentacyklicznym typu lupanu. Duże jej ilości znajdują się w zewnętrznej warstwie kory białych gatunków brzozy (zawartość 25–30%), stąd też kora stanowi łatwo dostępny surowiec, jako produkt uboczny w fabrykach papieru, do otrzymywania betuliny w procesie ekstrakcji, nie wymagającym wielkich nakładów finansowych, nawet na skalę przemysłową (patent US6392070B1). Betulina i łatwo otrzymywane z niej pochodne wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, takie jak: przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, hepatoprotective, przeciwkamicze i inne, które pojawiają się już przy bardzo niskich stężeniach, przy braku toksyczności zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (T.G. Tolstikova, I.V. Sorokina, G.A. Tolstikov, O.B. Flekhter, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2006, 32, 37–49; T.G. Tolstikova, I.V. Sorokina, G.A. Tolstikov, O.B. Flekhter, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2006, 32, 261–276; S. Alakurtti, T. Mäkelä, S. Koskimies, J. Yli-Kauhaluoma, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, 29, 1–13). Dzięki tym cechom betulina przedstawiona wzorem 1, znana od ponad 200 lat, posiadająca interesującą strukturę z dwoma grupami hydroksylowymi, to jest przy C-3 i C-28 oraz grupę izopropenylową przy C-19, stanowi dogodny materiał wyjściowy do wielu modyfikacji chemicznych, w tym również do syntezy polimerów, jako bifunkcyjny monomer pochodzenia naturalnego.

Pomimo że betulina i jej syntetycznie zmodyfikowane pochodne posiadają interesujące właściwości farmakologiczne o szerokim spektrum działania, istnieje tylko kilka rozwiązań proponujących zastosowanie tej grupy związków do otrzymywania materiałów polimerowych oraz kompozytów.

Znane jest wykorzystanie pochodnej (3,28-diakryloilo)betuliny jako bifunkcyjnego monomeru w reakcji kopolimeryzacji z olejem sojowym modyfikowanym dwoma dodatkowymi funkcjami: akryloilową i epoksydową. Polimeryzacja przeprowadzona w warunkach reakcji wolnorodnikowej pod wpływem UV doprowadziła do otrzymania usieciowanego polimeru charakteryzującego się znacznie lepszą trwałością termiczną [N. Auclair, A. Kaboorani, B. Riedl, V. Landry, *Ind. Crops Prod.*, 2015, 76, 530–537].

Kolejny znany opis literaturowy: [M.N. Gorbunova, G.F. Krainova, I.A. Tolmacheva, V.V. Grishko, *Russ. J. Appl. Chem.*, 2012, 85, 1137–1141] dotyczy syntezy kopolimerów betuliny w oparciu o reakcję maleinianu-28-O-betuliny z *N*-winylo-2-pirolidionem lub octanem winylu lub akrylonitrylem. Pomimo że maleinian betuliny praktycznie nie ulega homopolimeryzacji, to łatwo wchodzi w reakcję kopolimeryzacji z *N*-winylo-2-pirolidionem, octanem winylu i akrylonitrylem w obecności wolnorodnikowego inicjatora azobis(izobutyronitrylu) (AIBN) z wytworzeniem liniowych kopolimerów. Otrzymane produkty są rozpuszczalne w chloroformie, DMSO, DMF, THF, benzenie, acetonie i innych rozpuszczalnikach organicznych, natomiast nie rozpuszczają się w wodzie. Ocena aktywności cytotoksycznej *in vitro* otrzymanych kopolimerów wykazała ich znaczne działanie w kierunku hamowania rozwoju komórek nowotworowych rhabdomyosarcoma (RD TE32), co wskazuje na możliwość ich wykorzystania w medycynie i biotechnologii.

Podobny opis [M.N. Gorbunova, G.F. Krainova, D.M. Kisel'kov, V.O. Nebogatikov, *Russ. J. Appl. Chem.*, 2016, 89, 439–446] obejmuje syntezę kopolimerów betuliny na drodze reakcji winylooctanu-28-O-betuliny lub 4-winylobenzoenu-28-O-betuliny z winylo-2-pirolidionem lub akrylonitrylem w obecności wolnorodnikowego inicjatora azobis(izobutyronitrylu) (AIBN). Dodatkowo otrzymane kopolimery zmodyfikowano poprzez dodanie nanosrebra w ilości 7%. Otrzymane produkty są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, natomiast ich zaletą jest znaczna rozpuszczalność w wodzie. Test toksyczności *in vivo*, przy podaniu doustnym, wykazał wartość LD<sub>50</sub> >> 3 g/kg mc. Najwyższą aktywność cytotoksyczną *in vitro*, oznaczoną wobec linii komórek nowotworowych rhabdomyosarcoma (RD), płuc (A549) i czerniaka (MS), posiadają kopolimery zawierające nanosrebro.

Polimeryzacja alliloamidów kwasu betulonowego lub 2-hydroksyiminobetulonowego z akrylonitrylem lub *N*-winylopirolidionem w warunkach reakcji wolnorodnikowej (w obecności AIBN) prowadzi do powstania odpowiednich liniowych kopolimerów, wykazujących znaczną aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych czerniaka (MS) i płuc (A549) [M.N. Gorbunova, G.F. Krainova, I.A. Tolmacheva, V.V. Grishko, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2015, 41, 732–738].

Możliwe jest także uzyskiwanie z betuliny materiałów zbliżonych do poliuretanów stosując aromatyczne diizocyjaniany i difunkcyjne chlorki kwasowe jako środki sieciujące [V. Era, T. Jaaskelainen, P. Ukkonen, *Angew. Makromol. Chem.*, 1980, 88, 79–88]. Znane są publikacje zawierające informacje dotyczące otrzymywania poliakrylanów betuliny w warunkach wolnorodnikowej polimeryzacji. Istniejące

metody wykorzystują metakrylany lub akrylany betuliny jako jeden z monomerów [V. Era, T. Mustonen, T. Jaaskelainen, *Makromol. Chem. Rapid. Commun.*, 1981, 2, 283–286].

W efekcie poszukiwań nowych mikroporowatych materiałów mogących znaleźć zastosowanie w procesach rozdziału/magazynowania gazów, katalizie czy jako sorbenty opisano reakcje betuliny z tri- lub difunkcyjnymi komonomerami [J. Jeromenok, W. Bohlmann, M. Antonietti, J. Weber, *Macromol. Rapid Commun.*, 2011, 32, 1846–1851]. W pierwszym przypadku wykorzystano trifunkcyjny chlorek kwasowy, taki jak trichlorek 1,3,5-benzenotrikarbonylowy otrzymując rozpuszczalny polimer o budowie rozgałęzionej, w drugiej reakcji, kiedy zastosowano dichlorek tereftaloilowy lub izoftaloilowy, powstał rozpuszczalny, porowaty polimer o budowie liniowej.

Ostatnie doniesienia literaturowe dotyczą syntezy i właściwości polietero-poliuretano-betulin na drodze jedno- lub dwuetapowej reakcji polimeryzacji z udziałem betuliny, diizocyjanianów i tlenku etylenu [Y. Chen, Q. Song, J. Zhao, X. Gong, H. Schlaad, G. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, 10, 6593–6600].

Otrzymywanie polimerów termoplastycznych na bazie betuliny przedstawia opis patentowy RU2167892. Proces zachodzi na drodze polikondensacji betuliny z kwasami dikarboksylowymi, takimi jak: pimelinowy lub azelainowy lub sebacynowy, w stosunku molowym 1 : (1,01–1,04), w temperaturze 256–260°C.

Metodę aktywowania powierzchni materiałów polimerowych przy użyciu betuliny pod wpływem działania promieni UV opisuje patent RU2009139626. Otrzymane materiały wykazują znaczną aktywność przeciwbakteryjną i mogą być stosowane w procesie pakowania materiałów spożywczych.

Amerykański opis patentowy US2002/0119935A1 przedstawia triterpeny, w tym betulinę i jej pochodne mogące mieć zastosowanie w leczeniu infekcji bakteryjnych i hamowaniu wzrostu bakterii.

Z polskiego zgłoszenia patentowego P.422095 znany jest modyfikowany kopolimer termoplastyczny o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych, który zawiera w swej strukturze modyfikator w postaci betuliny o czystości  $\geq 75\%$ , przy czym stosunek wagowy kopolimeru bazowego do betuliny wynosi od 5 : 1 do 100 000 : 1. Z tego samego zgłoszenia znany jest również sposób otrzymywania tego kopolimeru, który polega na tym, że do reaktora wprowadza się termoplastyczny kopolimer bazowy w postaci granulatu lub kruszywa, lub przemiału oraz betulinę o czystości  $\geq 75\%$  w postaci oczyszczonego proszku lub zawiesiny w alkoholach, w stosunku wagowym od 5 : 1 do 100 000 : 1, całość miesza się w czasie od 10 do 90 minut, do uzyskania jednolitego pokrycia powierzchni kopolimeru, a następnie suszy się w czasie co najmniej 1 h, w temperaturze od 10 do 110°C zależnej od parametrów technologicznych, to jest od struktury i temperatur przetwórstwa użytego kopolimeru.

Ponadto, z polskiego zgłoszenia patentowego P.422092 znany jest modyfikowany polimer termoplastyczny o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych, który zawiera w swej strukturze modyfikator w postaci betuliny o czystości  $\geq 75\%$ , przy czym stosunek wagowy polimeru bazowego do betuliny wynosi od 5 : 1 do 100 000 : 1. Z tego samego zgłoszenia znany jest również sposób otrzymywania tego polimeru, który polega na tym, że do reaktora wprowadza się termoplastyczny polimer bazowy w postaci granulatu lub kruszywa, lub przemiału oraz betulinę o czystości  $\geq 75\%$  w postaci oczyszczonego proszku lub zawiesiny w alkoholach, w stosunku wagowym od 5 : 1 do 100 000 : 1, całość miesza się w czasie od 10 do 90 minut, do uzyskania jednolitego pokrycia powierzchni polimeru, a następnie suszy się w czasie co najmniej 1 h, w temperaturze od 10 do 110°C zależnej od parametrów technologicznych, to jest od struktury i temperatur przetwórstwa użytego polimeru.

Rozwiązania P.422095 oraz P.422092 nie zapewniały możliwości uzyskania odpowiednio kopolimeru i polimeru o wysokich stężeniach domieszki betulinowej, ze względu na brak kompatybilności pomiędzy polimerem osnowy a domieszką betulinową, oraz tworzenie się niskoenergetycznych aglomeratów zdyspergowanych w kopolimerze/polimerze bazowym, które pogarszały jednorodność materiału, jak również powodowały znaczące obniżenie jego wytrzymałości poprzez tworzenie się ognisk naprężeń i anizotropii w całym materiale. Wyżej wymienione właściwości materiału przy wysokim stężeniu domieszki betulinowej powodowały, że nie nadawał się on jako materiał funkcjonalny (to jest o funkcjach/właściwościach innych niż konstrukcyjne), a uwalnianie betuliny z materiału było znacząco ograniczone, jak również zdywersyfikowane względem aglomeratu, bowiem w przypadku gdy betulina aglomeryzuje, to w tych miejscach uwalnia się w innym tempie niż w innych. Powodem powyższych niedogodności jest fakt, że przy zawartości betuliny powyżej 5% występują niejednorodności w mieszaninie.

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie takiego sposobu syntezy polimeru modyfikowanego betuliną, który umożliwia całkowite wyeliminowanie niejednorodności mieszaniny (brak

aglomeratów) i uzyskanie materiału jednorodnego w całej strukturze, w pełnym przewidzianym wynalazkiem zakresie stężeń.

Istotę wynalazku stanowi modyfikowany polimer termoplastyczny o właściwościach przeciwzapalnych, charakteryzujący się tym, że zawiera w swej strukturze modyfikator w postaci betuliny o czystości  $\geq 75\%$ , korzystnie 99,9%, stabilizowanej alkoholem, korzystnie cukrolem, albo polieterolem, korzystnie propoksylationem cyklicznego heksameru glicydolanu potasu jako czynnikiem chelatującym, przy czym stosunek wagowy stabilizatora do betuliny wynosi od 0,5 : 1 do 100 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 50 : 1, a stosunek wagowy polimeru bazowego do betuliny wynosi od 1 : 1 do 100 : 1.

Korzystnie, modyfikator stanowi betulina uzyskana z kory brzozy.

Korzystnie, polimer bazowy stanowi poliwęglan (PC) albo polilaktyd (PLA) albo polichlorek winylu (PVC) albo polietylen wysokociśnieniowy (PEw) albo polipropylen (PP).

Istotę wynalazku stanowi również sposób otrzymywania modyfikowanego polimeru termoplastycznego o właściwościach przeciwzapalnych polegający na tym, że do reaktora wprowadza się termoplastyczny polimer bazowy w postaci granulatu lub kruszywa, lub przemiału oraz betulinę o czystości  $\geq 75\%$ , korzystnie 99,9%, zawieszoną w stabilizatorze w postaci alkoholu, korzystnie cukru, albo w postaci polieterolu, korzystnie propoksylationem cyklicznego heksameru glicydolanu potasu jako czynnikiem chelatującym, przy czym stosunek wagowy stabilizatora do betuliny wynosi od 0,5 : 1 do 100 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 50 : 1, a stosunek wagowy polimeru bazowego do betuliny wynosi od 1 : 1 do 100 : 1, całość miesza się w czasie co najmniej 10 minut, do uzyskania jednolitego pokrycia powierzchni polimeru, a następnie suszy się w czasie co najmniej 1 h, w temperaturze od 10 do 180°C zależnej od parametrów technologicznych, to jest od struktury i temperatur przetwórstwa użytego polimeru (granulatu lub kruszywa, lub przemiału). Następnie ze stabilizowanej i wysuszonej mieszanki polimeru z betuliną wyłacza się na wyłaczarce strunę, którą poddaje się regranulacji, a z otrzymanego granulatu ponownie wyłacza się strunę, a proces powtarza się aż do uzyskania jednorodnej mieszaniny bez niskoenergetycznych aglomeratów betuliny, to jest – w zależności od użytego polimeru bazowego – dwa do pięciu razy, korzystnie dwa razy, przy czym moment ten określa się jedną ze znanych metod, korzystnie z wykorzystaniem spektrofotometru. Po ostatnim procesie wyłaczania strunę chłodzi się, korzystnie w temperaturze pokojowej, w czasie od 5 do 30 sekund, aż do uzyskania właściwej sztywności, to jest przejścia ze stanu plastycznego w stan szklisty, co nie pozwala na jej deformację, a następnie wygrzewa w temperaturze od 40 do 150°C, korzystnie 80°C, przez czas  $\geq 10$  minut, korzystnie 30 minut celem usunięcia powstałych naprężeń wewnętrznych.

Korzystnie, proces wyłaczania stabilizowanej i wysuszonej mieszanki polimer-betulina prowadzi się za pomocą wyłaczarki ślimakowej, korzystnie o ślimaku 32 l/d, przy zastosowaniu temperatur malejących kaskadowo w przedziale od 270–110°C, i prędkości wyłoku o wartości od 10 do 200, korzystnie 60 rpm, przy czym drugi i ewentualne kolejne procesy wyłaczania prowadzi się w temperaturach podwyższonych w stosunku do temperatur pierwszego wyłaczania, ale nie przekraczających temperatury granicznej. Temperatura w pierwszym cyklu wyłaczania jest obniżona w celu niedopuszczenia do degradacji materiału.

Najkorzystniej proces wyłaczania stabilizowanej i wysuszonej mieszanki polimer-betulina prowadzi się za pomocą wyłaczarki jednoślismakowej, czterostrefowej, przy zastosowaniu czterech stref grzejnych: w pierwszym procesie wyłaczania na głowicy 250°C i w kolejnych trzech strefach odpowiednio 210°C, 200°C i 130°C, a w drugim procesie wyłaczania na głowicy 265°C i w kolejnych trzech strefach odpowiednio 230°C, 210°C i 160°C.

Korzystnie, jako modyfikator stosuje się betulinę uzyskaną z kory brzozy.

Korzystnie, jako reaktor stosuje się mieszalnik ze stali nierdzewnej lub szkła, wyposażony w system odprowadzania ładunku elektrycznego.

Korzystnie, jako polimer bazowy stosuje się poliwęglan (PC) albo polilaktyd (PLA), albo polichlorek winylu (PVC), albo polietylen wysokociśnieniowy (PEw), albo polipropylen (PP).

Korzystnie, mieszaninę polimeru bazowego z betuliną suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem, najkorzystniej w 10 mmHg.

Sposób prowadzony według wynalazku wpływa znacząco na poprawę w stosunku do rozwiązań znanych wcześniej – jednorodności w całej objętości otrzymywanego materiału. Dzięki temu uzyskuje się anizotropię właściwości, to jest jednolite uwalnianie betuliny we wszystkich wektorach, co istotnie polepsza jego właściwości biologiczne.

W efekcie zastosowania sposobu według wynalazku uzyskuje się materiał o znacznie wyższej aktywności przeciwzapalnej w porównaniu do materiałów znanych ze zgłoszeń patentowych

nr P.422095 oraz P.422092, jak i w porównaniu do substancji wzorcowej, jaką jest deksametazon powszechnie stosowany jako środek o udowodnionym działaniu przeciwzapalnym.

Zastosowanie jako alkoholu cyklicznego heksameru glicydolanu potasu gwarantuje równomierne uwalnianie betuliny w czasie eksploatacji produktu, co pozwala na wykorzystanie go w sposób zaplanowany, to jest z przewidywalnym efektem.

Do dodatkowych zalet sposobu według wynalazku należą:

- wykorzystanie dostępnych w handlu materiałów polimerowych, takich jak: poliwęglan, polilaktyd, polipropylen, polichlorek winylu, polietylen wysokociśnieniowy,
- prowadzenie procesu w łagodnych warunkach, co wynika z tego, że przedmieszkę przygotowuje się w temperaturze pokojowej (nie trzeba stosować podgrzewania czy chłodzenia), bez konieczności użycia rozpuszczalników, z wykorzystaniem oddziaływań elektrostatycznych,
- prowadzenie procesu z wysokimi wydajnościami (powyżej 90%) przejawiającą się w braku odpadów i dużej sprawności procesu,
- użycie jako modyfikatora przeciwzapalnej betuliny, substancji nietoksycznej, którą w prosty sposób można otrzymać, bez większych nakładów finansowych, na przykład z kory brzozy lub stanowiącej odpad przy produkcji papieru.

Otrzymana sposobem według wynalazku mieszanina betuliny z odpowiednim materiałem polimerowym ma postać blendy, z której w następstwie dalszej przeróbki plastycznej prowadzonej znanym sposobem otrzymuje się granulaty lub filament, o zabarwieniu neutralnym. Tak przygotowany materiał, po poddaniu odpowiedniej obróbce termicznej jest chemicznie odporny na działanie warunków atmosferycznych, co zostało potwierdzone z wykorzystaniem komory xenotest zgodnie z normą PN-EN ISO 4892-1:2016-06.

Z tych względów modyfikowany polimer termoplastyczny według wynalazku stanowi doskonały zamiennik dla fluoropolimerów, co wiąże się ze znacznymi oszczędnościami kosztów materiałowych dla przetwórcy. W praktyce istnieje również możliwość dodatkowego wzmocnienia materiału nanowłóknami, na przykład celulozowymi lub dodania do niego organicznych modyfikatorów właściwości i przetwórstwa oraz stabilizatorów UV.

Budowa polimerów została potwierdzona w oparciu o spektroskopię  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR oraz IR.

Rozwiązanie według wynalazku, przedstawione jest dokładniej na poniższych przykładach wykonania nie ograniczających w żadnym stopniu jego zakresu.

#### **Przykład 1**

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono poliwęglan (800 g) oraz betulinę (czystość  $\geq 98\%$ ) (8 g) zawieszoną w stabilizatorze w postaci propoksylationu cyklicznego heksameru glicydolanu potasu, w proporcji wagowej betuliny do stabilizatora 1 : 1. Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 30 minut, z prędkością 50 rpm, po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 100°C przez 24 h. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślímakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 250°C, 210°C, 200°C i 130°C i prędkości wyłoku 60 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i granulowana.

Suchy granulaty ponownie poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślímakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 265°C, 230°C, 210°C i 160°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem w temperaturze pokojowej przez 10 sekund, następnie nawinięta na bębny struna była wygrzewana w temperaturze 80°C w czasie 45 minut celem usunięcia powstałych naprężeń wewnętrznych. Otrzymany filament został przeznaczony do wydruków modeli 3D.

#### **Przykład 2**

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono polilaktyd (200 g) oraz betulinę (czystość  $\geq 98\%$ ) (10 g) zawieszoną w stabilizatorze w postaci cukrołu, w proporcji wagowej betuliny do cukrołu 1 : 10. Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 30 minut, z prędkością 30 rpm, po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 80°C przez 24 h. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślímakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio

na głowicy i kolejnych trzech strefach 210°C, 180°C, 140°C i 110°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, następnie granulowana.

Suchy granulát ponownie poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 220°C, 200°C, 170°C i 130°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem w temperaturze pokojowej przez 10 sekund, następnie nawinięta na bębny struna była wygrzewana w temperaturze 80°C w czasie 45 minut celem usunięcia powstałych naprężeń wewnętrznych. Otrzymany filament został przeznaczony do wydruków modeli 3D.

#### **Przykład 3**

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono polipropylen (200 g) oraz betulinę (czystość ≥98%) (20 g) zawieszoną w stabilizatorze w postaci propoksyłatu cyklicznego heksameru glicydolanu potasu w proporcji wagowej betuliny do stabilizatora 1 : 5. Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 90 minut, z prędkością 50 rpm, po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 60°C przez 24 h pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 195°C, 170°C, 130°C i 105°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, następnie granulowana.

Suchy granulát ponownie poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 220°C, 200°C, 170°C i 130°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem w temperaturze pokojowej przez 5 sekund, następnie nawinięta na bębny struna była wygrzewana w temperaturze 80°C w czasie 30 minut celem usunięcia powstałych naprężeń wewnętrznych. Otrzymany filament został przeznaczony do wydruków modeli 3D.

#### **Przykład 4**

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono polichlorek winylu (200 g) oraz betulinę (czystość ≥98%) (30 g) zawieszoną w stabilizatorze w postaci cukrolu, w proporcji wagowej betuliny do cukrolu 0,5 : 1. Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 45 minut, z prędkością 50 rpm, po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 85°C przez 24 h. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 200°C, 185°C, 150°C i 110°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, następnie granulowana. Suchy granulát ponownie poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 220°C, 200°C, 170°C i 130°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem w temperaturze pokojowej przez 25 sekund, następnie nawinięta na bębny struna była wygrzewana w temperaturze 80°C w czasie 30 minut celem usunięcia powstałych naprężeń wewnętrznych. Otrzymany filament został przeznaczony do wydruków modeli 3D.

#### **Przykład 5**

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono polietylen wysokociśnieniowy (200 g) oraz betulinę (40 g) (czystość ≥98%) zawieszoną w stabilizatorze w postaci cyklicznego heksameru glicydolanu potasu, w proporcji wagowej betuliny do stabilizatora 1 : 1. Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 50 minut, z prędkością 50 rpm, po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 80°C przez 30 h. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 205°C, 185°C, 150°C i 110°C i prędkości wyłoku 90 rpm. Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, następnie granulowana.

Suchy granulát ponownie poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 220°C, 200°C, 170°C i 130°C i prędkości wyłoku 90 rpm.

Uzyskana w ten sposób struna by odbierana na podajnik taśmowy i chłozona powietrzem w temperaturze pokojowej przez 20 sekund, następnie nawinięta na bębny struna by wygrzewana w temperaturze 80°C w czasie 30 minut celem usunięcia powstałych naprężeń wewnętrznych. Otrzymany filament zosta przeznaczony do wydruków modeli 3D.

#### **Przykład 6**

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono poliwęglan (200 g) oraz betulinę (czystoc  $\geq 98\%$ ) (20 g) zawieszoną w stabilizatorze w postaci cukrołu, w proporcji wagowej betuliny do cukrołu 1 : 100. Całc mieszan z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 30 minut, z prędkością 50 rpm, po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 100°C przez 24 h. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 245°C, 220°C, 200°C i 140°C i prędkości wyłoku 60 rpm. Uzyskana w ten sposób struna by odbierana na podajnik taśmowy i chłozona powietrzem na odcinku trzech metrów, następnie granulowana. Suchy granulát poddano ponownie wyłaczaniu za pomocą jednoślimakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d przy zastosowaniu temperatur poszczególnych stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 265°C, 230°C, 210°C i 160°C i prędkości wyłoku 60 rpm. Uzyskana w ten sposób struna by odbierana na podajnik taśmowy i chłozona powietrzem w temperaturze pokojowej przez 15 sekund, następnie nawinięta na bębny struna by wygrzewana w temperaturze 80°C w czasie 45 minut celem usunięcia powstałych naprężeń wewnętrznych. Otrzymany filament zosta przeznaczony do wydruków modeli 3D.

#### **Ocena cytotoksyczności i aktywności przeciwzapalnej**

Ocenę cytotoksyczności i aktywności przeciwzapalnej pótek polimerowych domieszkowanych betulin przeprowadzono dla eluatów pótek. Elucję prowadzono w medium hodowlanym w objętości 25 ml, w 37°C, z 5% wysyceniem atmosfery CO<sub>2</sub>. Po upływie 24 h medium elucyjne zebrano i poddano filtracji z zastosowaniem jałowego filtra membranowego 0,2  $\mu\text{m}$  z membran z celulozy octanowej (CA) (Cronus Sartorius).

#### *Ocena cytotoksyczności*

Ocenę cytotoksyczności *in vitro* wykonano w oparciu o normę ISO 10993-5 względem mysich fibroblastów linii L-929 (NCTC klon 929: nr kat. CCL 1, Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych [ATCC]), z zastosowaniem testów oceny żywności komórek na podstawie aktywności enzymów mitochondrialnych – testy MTT (Cell Proliferation Kit II (XTT); Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), XTT (In vitro Toxicology Assay Kit, MTT based; Sigma-Aldrich) oraz z zastosowaniem testu oceny żywności komórek na podstawie całkowitej masy białka -test SRB (In vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B based; Sigma-Aldrich). Wszystkie testy wykonano zgodnie z protokołem producenta. Pomiar absorbancji wykonano przy użyciu czytnika mikroplątek Wallac Victor 2 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Żywnoc komórek przedstawiono jako procent żywych komórek w poszczególnych grupach badanych w odniesieniu do komórek kontrolnych (K). Żywnoc powyżej 70% świadczy o braku działania cytotoksycznego.

Badania wykazały, że betulina domieszkowana w stężeniach 1%, 5% i 10% nie wykazuje działania cytotoksycznego względem mysich fibroblastów linii L-929 (fig. 1, tab. 1). Płytka polimerowa i płytka polimerowa z chelatorem wykazują aktywnoc biologiczną. Betulina domieszkowana w stężeniach 1%, 5% i 10% neutralizuje aktywnoc biologiczną pozostałych składowych uwalnianych z płytki polimerowej oraz płytki z dodatkiem chelatora. Im wyższe stężenie betuliny tym silniejsze obniżenie aktywności biologicznej płytki z chelatorem – najsilniejszy efekt neutralizujący wykazuje betulina domieszkowana w stężeniu 10%.

#### *Ocena aktywności przeciwzapalnej*

Ocenę działania przeciwzapalnego wykonano dla linii ludzkich fibroblastów skóry (NHDF – Normal Human Dermal Fibroblasts, Lonza nr kat. CC-2511, nr lot: 0000268030), stymulowanych lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS; Sigma-Aldrich), na podstawie liczby kopii mRNA genu kodującego IL-6 wyznaczonej technik RT-qPCR w czasie rzeczywistym. Liczbę kopii mRNA genu kodującego IL-6 wyznaczono z wykorzystaniem detektora sekwencji Opticon™ DNA Engine Continuous Fluorescence de-

tector (MJ Research, Watertown, MA) oraz zestawu odczynników SYBR Green I (SYBR Green Quantitect RT-PCR Kit, Qiagen, Valencia, Ca, USA) i pary specyficznych starterów (Kimsa M. i wsp., 2013). Kontrolę pozytywną w ocenie aktywności przeciwzapalnej stanowiły komórki traktowane deksametazonem (Sigma-Aldrich). Stężenie deksametazonu wybrano na podstawie Shoda T. i wsp. 2014. Stężenie LPS wybrano na podstawie Kimsa M. i wsp., 2013. Liczba kopii mRNA genu kodującego IL-6 została przeliczona na  $\mu\text{g}$  całkowitego komórkowego RNA. Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą programu Statistica v.13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Normalność rozkładu zbadano testem Shapiro-Wilka. Na podstawie wyniku analizy normalności rozkładu porównanie liczby kopii między grupami przeprowadzono za pomocą testu t.

Stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby kopii mRNA genu kodującego IL-6 w następujących grupach badanych w odniesieniu do kontroli: komórki traktowane LPS ( $p < 0,0001$ ), komórki traktowane deksametazonem ( $p = 0,0102$ ), komórki traktowane eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 10% ( $p = 0,0011$ ), komórki traktowane eluatem z płytki bez betuliny ( $p = 0,0032$ ), komórki traktowane eluatem z płytki z chelatorem bez betuliny ( $p = 0,0447$ ) (fig. 2, tab. 2). W odniesieniu do komórek traktowanych LPS stwierdzono statystycznie istotny spadek liczby kopii mRNA genu kodującego IL-6 w następujących grupach badanych: komórki traktowane LPS i deksametazonem ( $p = 0,0157$ ), komórki traktowane LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 1% ( $p = 0,0192$ ), komórki traktowane LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 5% ( $p = 0,0006$ ) (fig. 3, tab. 2). Ponadto, stwierdzono statystycznie istotny spadek liczby kopii mRNA genu kodującego IL-6 w komórkach traktowanych LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 5% w porównaniu do komórek traktowanych LPS i deksametazonem ( $p = 0,0274$ ) oraz w porównaniu do komórek traktowanych LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 1% ( $p = 0,0180$ ).

Wyniki wskazują na potencjalną aktywność przeciwzapalną betuliny domieszkowanej w stężeniu 1% i 5%, przy czym najsilniejsze działanie wykazuje betulina domieszkowana w stężeniu 5%.

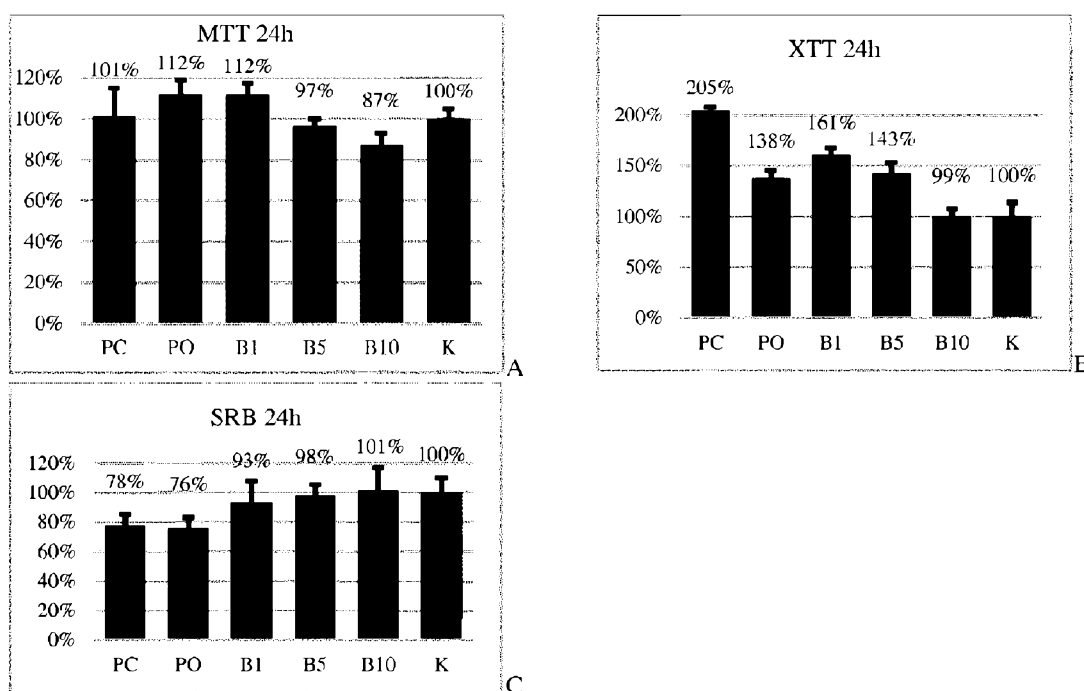


Fig. 1. Wykres przedstawiający żywotność komórek jako procent żywych komórek w odniesieniu do kontroli (K) w poszczególnych grupach badanych. Żywotność komórek powyżej 70% świadczy o braku działania cytotoksycznego. B1 – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem domieszkowanej betuliną w stężeniu 1%, B5 – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem domieszkowanej betuliną w stężeniu 5%, B10 – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem domieszkowanej betuliną w stężeniu 10%, PC – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny, PO – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny z chelatorem; A – wynik testu MTT, B – wynik testu XTT, C – wynik testu SRB

Tabela 1

Wyniki oceny cytotoksyczności eluatów płytek polimerowych domieszkowanych betuliną przeprowadzonej z zastosowaniem testów oceny żywotności komórek na podstawie aktywności enzymów mitochondrialnych – testy MTT i XTT oraz z zastosowaniem testu oceny żywotności komórek na podstawie całkowitej masy białka – test SRB. Wyniki zostały przedstawione jako procent żywych komórek w odniesieniu do kontroli (K) w poszczególnych grupach badanych. Żywotność komórek powyżej 70% świadczy o braku działania cytotoksycznego. B1 – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem domieszkowanej betuliną w stężeniu 1%, B5 – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem domieszkowanej betuliną w stężeniu 5%, B10 – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem domieszkowanej betuliną w stężeniu 10%, PC – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny, PO – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny z chelatorem

	PC	PO	B1	B5	B10	K
<b>Test MTT</b>	101%	112%	112%	97%	87%	100%
<b>Test XTT</b>	205%	138%	161%	143%	99%	100%
<b>Test SRB</b>	78%	76%	93%	98%	101%	100%

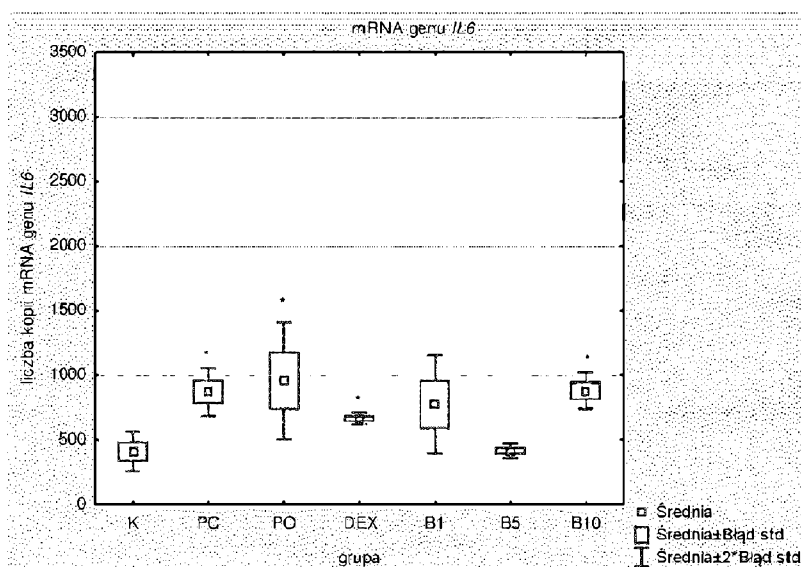


Fig. 2. Wykresy przedstawiające liczbę kopii mRNA genu kodującego IL-6 przeliczoną na  $\mu\text{g}$  całkowitego komórkowego RNA w poszczególnych grupach badanych w odniesieniu do kontroli (K); DEX – komórki traktowane deksametazonem; B1 – komórki traktowane eluatem z płytki polimerowej z betuliną w stężeniu 1%; B5 – komórki traktowane eluatem z płytki polimerowej z betuliną w stężeniu 5%; B10 – komórki traktowane eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 10%; PC – komórki traktowane eluatem z płytki bez betuliny; PO – komórki traktowane eluatem z płytki z chelatorem bez betuliny; \*  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli

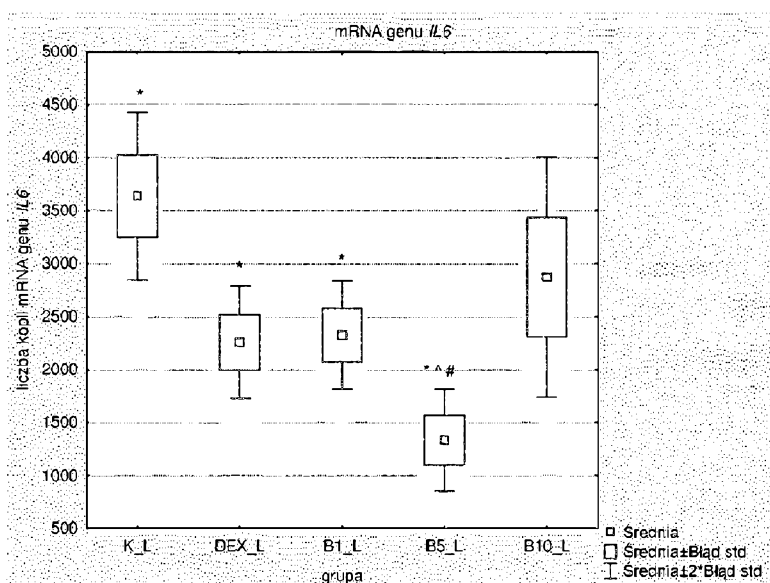


Fig. 3. Wykresy przedstawiające liczbę kopii mRNA genu kodującego IL-6 przeliczoną na  $\mu\text{g}$  całkowitego komórkowego RNA w poszczególnych grupach badanych w odniesieniu do komórek traktowanych LPS (K\_L); DEX\_L – komórki traktowane LPS i deksametazonem; B1\_L – komórki traktowane LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 1%; B5\_L – komórki traktowane LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 5%; B10\_L – komórki traktowane LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 10% \*  $p < 0,05$  w porównaniu do kontroli; ^  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych LPS i deksametazonem; #  $p < 0,05$  w porównaniu do komórek traktowanych LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 1%

Tabela 2

Wyniki oceny działania przeciwwzapalnego eluatów płytek polimerowych domieszkowanych betuliną względem komórek NHDF, na podstawie liczby kopii mRNA genu kodującego IL-6, wyznaczonej techniką RT-qPCR w czasie rzeczywistym. Liczba kopii mRNA genu kodującego IL-6 została przeliczona na  $\mu\text{g}$  całkowitego komórkowego RNA; K – komórki kontrolne; K\_L – komórki traktowane LPS; DEX – komórki traktowane deksametazonem; B10 – komórki traktowane eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 10%; PC – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem bez betuliny; PO – komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z chelatorem bez betuliny; DEX\_L – komórki traktowane LPS i deksametazonem; B1\_L – komórki traktowane LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 1%; B5\_L – komórki traktowane LPS i eluatem z płytki z betuliną w stężeniu 5%

Porównywane grupy (1 vs 2)	Średnia wartość liczby kopii mRNA (grupa 1)	Średnia wartość liczby kopii mRNA (grupa 2)	P
K_L vs K	36 386,67	4 097,50	<0,0001
DEX vs K	6 647,71	4 097,50	0,0102
B10 vs K	8 818,00	4 097,50	0,0011
PC vs K	8 727,33	4 097,50	0,0032
PO vs K	9 587,17	4 097,50	0,0447
DEX_L vs K_L	22 559,11	36 386,67	0,0157
B1_L vs K_L	23 253,33	36 386,67	0,0192
B5_L vs K_L	13 345,33	36 386,67	0,0006
B5_L vs DEX_L	13 345,33	22 559,11	0,0274
B5_L vs B1_L	13 345,33	23 253,33	0,0180

Przygotowane sposobem według wynalazku modyfikowane polimery, w szczególności poliwęglan, można obrabiać na konwencjonalnych maszynach do najmniejszych tolerancji, stosować bezpośrednio jako filament w druku przestrzennym. Tworzywo szczególnie polecane jest w takich dziedzinach jak technika lotnicza, elektronika, technika medyczna, budowa maszyn i przemysł samochodowy, szeroko pojęte prototypowanie.

Polimery według wynalazku wykazują znaczną aktywność przeciwwzapalną. Ze względu na osiąganą aktywność polimery te mogą być korzystnie stosowane w medycynie i biotechnologii.

Materiał otrzymany sposobem według wynalazku wykazuje właściwości, dzięki którym może znaleźć szczególne zastosowanie również jako przeciwzapalny filament do druku przestrzennego 3D. Takie wnioski wyciągnięto w oparciu o analizę parametrów przetwórczych oraz empirycznie w procesie modelowania z wykorzystaniem technologii przyrostowych.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Modyfikowany polimer termoplastyczny o właściwościach przeciwzapalnych, **znamienny tym**, że zawiera w swej strukturze modyfikator w postaci betuliny o czystości  $\geq 75\%$ , korzystnie 99,9%, stabilizowanej alkoholem, korzystnie cukrolem, albo polieterolem, korzystnie propoksylationem cyklicznego heksameru glicydolanu potasu jako czynnikiem chelatującym, przy czym stosunek wagowy stabilizatora do betuliny wynosi od 0,5 : 1 do 100 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 50 : 1, a stosunek wagowy polimeru bazowego do betuliny wynosi od 1 : 1 do 100 : 1.
2. Modyfikowany polimer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że modyfikator stanowi betulina uzyskana z kory brzozy.
3. Modyfikowany polimer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że polimer bazowy stanowi poliwęglan (PC).
4. Modyfikowany polimer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że polimer bazowy stanowi polilaktyd (PLA).
5. Modyfikowany polimer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że polimer bazowy stanowi polichlorek winylu (PVC).
6. Modyfikowany polimer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że polimer bazowy stanowi polietylen wysokociśnieniowy (PEw).
7. Modyfikowany polimer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że polimer bazowy stanowi polipropylen (PP).
8. Sposób otrzymywania modyfikowanego polimeru termoplastycznego o właściwościach przeciwzapalnych, **znamienny tym**, że do reaktora wprowadza się termoplastyczny polimer bazowy w postaci granulatu lub kruszywa lub przemiału oraz betulinę o czystości  $\geq 75\%$ , korzystnie 99,9%, zawieszoną w stabilizatorze w postaci alkoholu, korzystnie cukru, albo w postaci polieterolu, korzystnie propoksylationem cyklicznego heksameru glicydolanu potasu jako czynnikiem chelatującym, przy czym stosunek wagowy stabilizatora do betuliny wynosi od 0,5 : 1 do 100 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 50 : 1, a stosunek wagowy polimeru bazowego do betuliny wynosi od 1 : 1 do 100 : 1, całość miesza się w czasie co najmniej 10 minut, do uzyskania jednolitego pokrycia powierzchni polimeru, a następnie suszy się w czasie co najmniej 1 h, w temperaturze od 10 do 180°C zależnej od parametrów technologicznych, to jest od struktury i temperatur przetwórstwa użytego polimeru (granulatu lub kruszywa, lub przemiału), następnie ze stabilizowanej i wysuszonej mieszanki polimeru z betulina wytlacza się na wytlaczarce strunę, którą poddaje się regranulacji, a z otrzymanego granulatu ponownie wytlacza się strunę, a proces powtarza się aż do uzyskania jednorodnej mieszaniny bez niskoenergetycznych aglomeratów betuliny, to jest – w zależności od użytego polimeru bazowego – dwa do pięciu razy, korzystnie dwa razy, przy czym moment ten określa się jedną ze znanych metod, korzystnie z wykorzystaniem spektrofotometry, a po ostatnim procesie wytlaczania strunę chłodzi się, korzystnie w temperaturze pokojowej, w czasie od 5 do 30 sekund, aż do uzyskania właściwej sztywności, to jest przejścia ze stanu plastycznego w stan szklisty, a następnie wygrzewa w temperaturze od 40 do 150°C, korzystnie 80°C, przez czas  $\geq 10$  minut, korzystnie 30 minut.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że proces wytlaczania stabilizowanej i wysuszonej mieszanki polimer-betulina prowadzi się za pomocą wytlaczarki ślimakowej, korzystnie o ślimaku 32 l/d, przy zastosowaniu temperatur malejących kaskadowo w przedziale od 270–110°C, i prędkości wytloku o wartości od 10 do 200, korzystnie 60 rpm, przy czym drugi i ewentualne kolejne procesy wytlaczania prowadzi się w temperaturach podwyższonych w stosunku do temperatur pierwszego wytlaczania, ale nie przekraczających temperatury granicznej.
10. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że proces wytlaczania stabilizowanej i wysuszonej mieszanki polimer-betulina prowadzi się za pomocą wytlaczarki jednoślismakowej, czterostrefowej, przy zastosowaniu czterech stref grzejnych: w pierwszym procesie wytlaczania na głowicy

250°C i w kolejnych trzech strefach odpowiednio 210°C, 200°C i 130°C, a w drugim procesie wyłaczania na głowicy 265°C i w kolejnych trzech strefach odpowiednio 230°C, 210°C i 160°C.

11. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako modyfikator stosuje się betulinę uzyskaną z kory brzozy.
12. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako reaktor stosuje się mieszalnik ze stali nierdzewnej lub szkła, wyposażony w system odprowadzania ładunku elektrycznego.
13. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako polimer bazowy stosuje się poliwęglan (PC).
14. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako polimer bazowy stosuje się polilaktyd (PLA).
15. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako polimer bazowy stosuje się polichlorek winylu (PVC).
16. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako polimer bazowy stosuje się polietylen wysokociśnieniowy (PEw).
17. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jako polimer bazowy stosuje się polipropylen (PP).
18. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że mieszaninę polimeru bazowego z betuliną suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem, najkorzystniej w 10 mm Hg.