

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235673**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422092**

(22) Data zgłoszenia: **03.07.2017**

(51) Int.Cl.

**A61K 36/185 (2006.01)**

**A61K 31/75 (2006.01)**

**A61K 31/76 (2006.01)**

**A61K 31/765 (2006.01)**

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

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**14.01.2019 BUP 02/19**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**05.10.2020 WUP 15/20**

(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**

**STANISŁAW BORYCZKA, Sosnowiec, PL**

**URSZULA MAZUREK, Sosnowiec, PL**

**KRZYSZTOF JASIK, Katowice, PL**

**TOMASZ FLAK, Wojkowice, PL**

**BEATA ROZWADOWSKA, Katowice, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Mariusz Grzesiczak**

**PL 235673 B1**

## Opis wynalazku

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

Tworzywa przeciwdrobnoustrojowe oraz o właściwościach przeciwzapalnych najczęściej wzbogacone są o antybakteryjny dodatek w postaci nanocząstek srebra (F.J. Osonga, V.M. Kariuki, I. Yazgan, A. Jimenez, D. Luther, J. Schulte, O.A. Sadik, *Sci. Total Environ.*, 2016, 563, 977–986; L. Li, C. Zhao, Y. Zhang, J. Yao, W. Yang, Q. Hu, C. Wang, C. Cao, *Food Chem.*, 2017, 215, 477–482). Nanocząstki srebra zapewniają zabezpieczenie w aplikacjach spożywczych, jednak nie jest to zabezpieczenie wystarczające w przypadku licznych zastosowań medycznych, jak i po wielokrotnym przetworzeniu, na przykład w druku przestrzennym oraz nie wykazują klasycznego działania przeciwzapalnego. Tworzywa tego typu zawdzięczają swoje właściwości antybakteryjne działaniu uwolnionych jonów srebra. Nie bez znaczenia jednak jest fakt, że jony srebra wykazują wiele cech cytotoksycznych w stosunku do komórek człowieka, a także szerokie spektrum działania wyjąłwia środowisko, co z punktu widzenia mikrobiologii klinicznej jest niekorzystne (P. Palaniappan, G. Sathishkumar, R. Sankar, *Spectrochim. Acta A*, 2015, 138, 885–890; A. Massarsky, R. Abraham, K.C. Nguyen, P. Rippstein, A.F. Tayabali, V.L. Trudeau, T.W. Moon, *Comp. Biochem. Physiol. C*, 2014, 159, 10–21). Istotnym czynnikiem limitującym dodatkowo stosowanie nanosrebra jest relatywnie wysoka cena tego modyfikatora. Istnieje zatem konieczność poszukiwania alternatywnych, bardziej bezpiecznych materiałów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Coraz więcej prac badawczych poświęconych jest zastosowaniu nanokrzemionki w materiałach antybakteryjnych, zwłaszcza w stosunku do bakterii cechujących się wysoką opornością na antybiotyki (K. Kon, M. Rai, *Antibiotic Resistance Mechanism and New Antimicrobial Approaches*, Elsevier, 2016; A. Méndez-Vilas, *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and education*, Formatex Research Center, 2013).

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 izopropenyłową 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, dotychczas nie udało się opracować i wprowadzić na rynek skutecznych polimerów, z tej grupy związków, o dobrych właściwościach użytkowych i wykazujących działanie przeciwbakteryjne i przeciwzapalne.

N. Auclair i współpracownicy opisali 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-pirolidone lub octanem winylu lub akrylonitrylem. Pomimo, że maleinian betuliny praktycznie nie ulega homopolimeryzacji, to łatwo wchodzi w reakcję kopolimeryzacji z *N*-winylo-2-pirolidone, 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 rozpusz-

czalnikach 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  $LD_{50} \gg 3$  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 diizocyjany 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.

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.

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie nowych materiałów polimerowych o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwzapalnym, których budowa oparta jest o strukturę polimerów termoplastycznych i które zawierają dodatek substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych pochodzenia naturalnego, jaką jest betulina.

Istotę wynalazku stanowi modyfikowany polimer termoplastyczny o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych charakteryzujący się tym, że zawiera w swej strukturze modyfikator w postaci betuliny o czystości  $\geq 75\%$ , przy czym bazę stanowi polimer wybrany spośród: poliwęglan (PC), polilaktyd (PLA), polichlorek winylu (PVC), polietylen wysokociśnieniowy (PEw), polipropylen (PP), poliamid (PA), a stosunek wagowy polimeru bazowego do betuliny wynosi od 5 : 1 do 100 000 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 100 : 1.

Korzystnie, modyfikator stanowi betulina uzyskana z kory brzozy.

Istotę według wynalazku stanowi również sposób otrzymywania modyfikowanego polimeru termoplastycznego o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych polegający na tym, że do reaktora wprowadza się termoplastyczny polimer bazowy, wybrany spośród: poliwęglan (PC), polilaktyd (PLA), polichlorek winylu (PVC), polietylen wysokociśnieniowy (PEw), polipropylen (PP), poliamid (PA), w postaci granulatu lub kruszywa lub przemiału oraz betulinę o czystości  $\geq 75\%$  w postaci oczyszczono-

nego proszku lub zawiesiny w alkoholach, korzystnie w glikolu propylenowym, w stosunku wagowym od 5 : 1 do 100 000 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 100 : 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 godziny, w temperaturze od 10 do 110°C zależnej od parametrów technologicznych, to jest od struktury i temperatur przetwórstwa użytego polimeru (granulatu lub kruszywa lub przemiału).

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, mieszaninę polimeru bazowego z betuliną suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem, najkorzystniej o wartości 66,7 kPa.

Do podstawowych zalet sposobu według wynalazku należą:

- wykorzystanie dostępnych w handlu materiałów polimerowych, takich jak: poliwęglan, polilaktyd, polipropylen, polichlorek winylu, polietylen wysokociśnieniowy oraz poliamid,
- prowadzenie procesu w łagodnych warunkach, co wynika z tego, że przedmieszkę przygotowuje się w temperaturze pokojowej, bez użycia rozpuszczalników, z wykorzystaniem oddziaływań elektrostatycznych,
- prowadzenie procesu z wysokimi wydajnościami (powyżej 90%),
- a przede wszystkim użycie jako modyfikatora bakteriostatycznej i przeciwzapalnej betuliny, substancji nietoksycznej, którą w prosty sposób można otrzymać, bez większych nakładów finansowych, na przykład z kory brzozy, 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.

#### **P r z y k ł a d 1.** Otrzymywanie poliwęglanu z betuliną.

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono w temperaturze 25°C poliwęglan w postaci granulatu (1500 g) oraz betulinę o czystości  $\geq 98\%$  w postaci proszku (7500 mg). Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 30 minut, z prędkością 50 obrotów na minutę (r/min), po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 100°C przez 24 godziny. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślیمakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d (to jest gdzie stosunek długości ślimaka do jego średnicy wynosi 32:1) przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 265°C, 230°C, 210°C i 160°C i prędkości wyłoku 60 obrotów na minutę (r/min). Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, nawinięta na bębny struna była następnie przeznaczona do wydruków modeli 3D.

#### **P r z y k ł a d 2.** Otrzymywanie polilaktydu z betuliną.

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono w temperaturze 25°C polilaktyd w postaci kruszywa (2000 g) oraz betulinę o czystości  $\geq 98\%$  w postaci proszku (500 mg). Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 30 minut, z prędkością 30 obrotów na minutę (r/min), po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 80°C przez 24 godziny. Suchą mieszaninę poddano wyłaczaniu za pomocą jednoślیمakowej, czterostrefowej wyłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d (to jest gdzie stosunek długości ślimaka do jego średnicy wynosi 32:1) 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 obrotów na minutę (r/min). Uzyskana w ten spo-

sób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, nawinięta na bębny struna była następnie przeznaczona do wydruków modeli 3D.

**Przykład 3.** Otrzymywanie polipropylenu z betuliną.

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono w temperaturze 21°C polipropylen w postaci granulatu (500 g) oraz betulinę o czystości ≥ 98% w postaci proszku (1200 mg). Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 90 minut, z prędkością 50 obrotów na minutę (r/min), po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 60°C przez 24 godziny pod zmniejszonym ciśnieniem o wartości 500 mmHg, przy czym zmniejszone ciśnienie zastosowano w celu przyspieszenia odparowywania frakcji lotnych. Suchą mieszaninę poddano wytlaczaniu za pomocą jednoślindakowej, czterostrefowej wytłaczarki ślimakowej ślimaku 32 l/d (to jest gdzie stosunek długości ślimaka do jego średnicy wynosi 32:1) przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 200°C, 175°C, 150°C i 110°C i prędkości wytloku 90 obrotów na minutę (r/min). Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, nawinięta na bębny struna była następnie przeznaczona do wydruków modeli 3D.

**Przykład 4.** Otrzymywanie polichloroku winylu z betuliną.

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono w temperaturze 25°C polichlorek winylu w postaci przemiału (700 g) oraz betulinę o czystości ≥ 98% w postaci proszku (500 mg). Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 45 minut, z prędkością 50 obrotów na minutę (r/min), po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 85°C przez 24 godziny. Suchą mieszaninę poddano wytlaczaniu za pomocą jednoślindakowej, czterostrefowej wytłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d (to jest gdzie stosunek długości ślimaka do jego średnicy wynosi 32:1) przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 220°C, 200°C, 170°C i 130°C i prędkości wytloku 90 obrotów na minutę (r/min). Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, nawinięta na bębny struna była następnie przeznaczona do wydruków modeli 3D.

**Przykład 5.** Otrzymywanie polietylenu wysokociśnieniowego z betuliną.

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono w temperaturze 25°C polietylen wysokociśnieniowy w postaci granulatu (2000 g) oraz betulinę o czystości ≥ 98% w postaci proszku (500 mg). Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 50 minut, z prędkością 50 obrotów na minutę (r/min), po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 80°C przez 30 godzin. Suchą mieszaninę poddano wytlaczaniu za pomocą jednoślindakowej, czterostrefowej wytłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d (to jest gdzie stosunek długości ślimaka do jego średnicy wynosi 32:1) przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 220°C, 200°C, 170°C i 130°C i prędkości wytloku 90 obrotów na minutę (r/min). Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, nawinięta na bębny struna była następnie przeznaczona do wydruków modeli 3D.

**Przykład 6.** Otrzymywanie poliamidu z betuliną.

Do reaktora w postaci mieszalnika ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonego w system odprowadzania ładunku elektrycznego wprowadzono w temperaturze 25°C poliamid w postaci kruszywa (650 g) oraz betulinę o czystości ≥ 98% w postaci proszku (600 mg). Całość mieszano z wykorzystaniem mieszadła teflonowego o łopatach zgarniających przez 20 minut, z prędkością 50 obrotów na minutę (r/min), po czym mieszaninę suszono aerostatycznie w 70°C przez 24 godziny. Suchą mieszaninę poddano wytlaczaniu za pomocą jednoślindakowej, czterostrefowej wytłaczarki ślimakowej o ślimaku 32 l/d (to jest gdzie stosunek długości ślimaka do jego średnicy wynosi 32:1) przy zastosowaniu temperatur stref grzejnych odpowiednio na głowicy i kolejnych trzech strefach 220°C, 200°C, 170°C i 130°C i prędkości wytloku 90 obrotów na minutę (r/min). Uzyskana w ten sposób struna była odbierana na podajnik taśmowy i chłodzona powietrzem na odcinku trzech metrów, nawinięta na bębny struna była następnie przeznaczona do wydruków modeli 3D.

**Ocena aktywności przeciwbakteryjnej**

Oceny aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanych materiałów polimerowych dokonano zgodnie z normą ISO 22196: 2007 (E) „Plastics – Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces”. Jako materiał odniesienia zastosowano szczep referencyjny *Escherichia coli* ATCC 25922. W bada-

niach zastosowano inokulum bakteryjne o objętości 0,4 ml i stężeniu  $6 \times 10^5$  bakterii/ml. Warunki inkubacji próbek z inokulum były prowadzone w temperaturze 35°C, przy wilgotności nie mniejszej niż 90%, przez 24 godziny. Neutralizacja każdej z prób została przeprowadzona zgodnie z (PN ISO 18593: 2005; PN ISO 14562: 2006). Po dokonaniu serii 10-krotnych rozcieńczeń inkubowano próbki na płytkach Petriego w warunkach opisanych w normie. Zarówno dla prób badanych jak i kontrolnych obliczono współczynnik N – liczba żywych bakterii odzyskanych na  $\text{cm}^2$  próbki. W oparciu o otrzymane wyniki stwierdzono aktywność przeciwbakteryjną R z przedziału ( $R = 1,45 - 2,0$ ) otrzymanych płytek wykonanych z polimerów zawierających betulinę w porównaniu do materiału wyjściowego bez dodatku betuliny.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki badań aktywności mikrobiologicznej dla poliwęglanu zawierającego betulinę w przedziale 0,025%–0,5%.

Tabela 1

1.	Norma badawcza	ISO 22196:2007(E) "Plastics – Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces"
2.	Rodzaj plastiku zastosowanego dla próbek kontrolnych (rozmiar, kształt, grubość)	50 mm x 50 mm,
3.	Rodzaj plastiku zastosowanego dla próbek badanych (rozmiar, kształt, grubość)	50 mm x 50 mm,
4.	Rodzaj polimeru zastosowanego jako "cover film" (rozmiar, kształt, grubość)	PP film, 40 mm x 40 mm, 0,05 mm
5.	Gatunek bakterii i rodzaj zastosowanego szczepu	<i>Escherichia coli</i> – ATCC 25922
6.	Objętość inokulum	0,4 ml
7.	Stężenie bakterii w inokulum	<i>Escherichia coli</i> : $6 \times 10^5$ cells/ml
8.	Wartość $U_0$ , $U_t$ i $A_t$	<i>Escherichia coli</i> : $U_0 - 4,21$ $U_t - 4,91$ $A_t - 3,46$
9.	Aktywność antybakteryjna - R	$R = 1,45 - 2,0$
10.	Objętość, rodzaj neutralizatora	10 ml, SCDLP broth
11.	Data eksperymentu	14.12.2016 – 17.12.2016
12.	Data raportu	18.12.2016

Średnia wyznaczona aktywność antybakteryjna (R) dla badanego materiału w tym przypadku wyniosła 1,85,

zgodnie z:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

gdzie:

$U_0$  – średnia logarytmu dziesiętnego liczby żywych bakterii, liczba komórek/cm<sup>2</sup>, odzyskanych z próbek nietraktowanych po posiewie,

$U_t$  – średnia logarytmu dziesiętnego liczby żywych bakterii, liczba komórek/cm<sup>2</sup>, odzyskanych z próbek nietraktowanych po 24 h,

$A_t$  – średnia logarytmu dziesiętnego liczby żywych bakterii, liczba komórek/cm<sup>2</sup>, odzyskanych z próbek traktowanych po 24 h.

W tabeli 2 przedstawiono ocenę działania antybakteryjnego R według ISO 22196:2007.

Tabela 2

Działanie antybakteryjne R według ISO 22196:2007	% zabitych bakterii	Ocena
< 1,5	<96,8	Słabo
1,5 – 2,0	96,8-99,0	Dopuszczalnie
2,0 – 3,0	>99,0-99,9	Dobrze
> 3,0	>99,9	Doskonale

#### Ocena aktywności przeciwzapalnej

Ocenę aktywności przeciwzapalnej otrzymanych materiałów polimerowych, dokonano zgodnie z normą ISO10993-5:2009(E). Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem prawidłowych ludzkich fibroblastów skóry (linia komórkowa NHDF, ang. *normalhumandermalfibroblasts*, CC-2511; Clonetics, San Diego, CA, USA), hodowanych przez 24 godziny w pożywce FBM (ang. *Fibroblast Basal Medium*; Lonza, Basel, Szwajcaria), wzbogaconej hFGF-B (ludzki czynnik wzrostu fibroblastów, ang. *Human Fibroblast Growth Factor-basic*), insuliną I gentamycyną (FGM™SingleQuotes™; Lonza, Basel, Szwajcaria). Aktywność przeciwzapalną oceniano na podstawie analizy zmian transkryptomu komórek wyznaczanego metodą mikromacierzy ekspresyjnych z zastosowaniem płytek HG-U133A. Walidację eksperymentu macierzowego prowadzono metodą qRT-PCR. Zmiany w profilu ekspresji genów uczestniczących w procesach zapalnych wskazują na przeciwzapalny wpływ otrzymanych materiałów polimerowych w porównaniu do materiału wyjściowego bez dodatku betuliny.

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 10 samochodowy, szeroko pojęte prototypowanie.

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

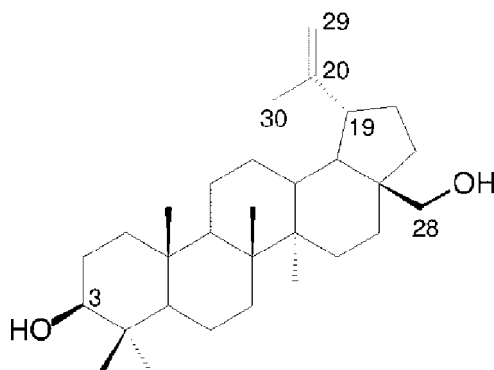
Materiał otrzymany sposobem według wynalazku wykazuje właściwości, dzięki którym może znaleźć szczególne zastosowanie również jako przeciwbakteryjny i przeciwzapalny filament do druku przestrzennego 3D. Takie wnioski wyciągnięto w oparciu o analizę parametrów przetwórczych oraz empirycznie w procesie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

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Modyfikowany polimer termoplastyczny o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych **znamienny tym**, że zawiera w swej strukturze modyfikator w postaci betuliny o czystości  $\geq 75\%$ , przy czym bazę stanowi polimer wybrany spośród: poliwęglan (PC), polilaktyd (PLA), polichlorek winylu (PVC), polietylen wysokociśnieniowy (PEw), polipropylen (PP), poliamid (PA), a stosunek wagowy polimeru bazowego do betuliny wynosi od 5 : 1 do 100 000 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 100 : 1.
2. Modyfikowany polimer według zastrz. 1, **znamienny tym**, że modyfikator stanowi betulina uzyskana z kory brzozy.

3. Sposób otrzymywania modyfikowanego polimeru termoplastycznego o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych **znamienny tym**, że do reaktora wprowadza się termoplastyczny polimer bazowy wybrany spośród: poliwęglan (PC), polilaktyd (PLA), polichlorek winylu (PVC), polietylen wysokociśnieniowy (PEw), polipropylen (PP), poliamid (PA), w postaci granulatu lub kruszywa lub przemiału oraz betulinę o czystości  $\geq 75\%$  w postaci oczyszczonego proszku lub zawiesiny w alkoholach, korzystnie w glikolu propylenowym, w stosunku wagowym od 5 : 1 do 100 000 : 1, korzystnie od 20 : 1 do 100 : 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 godziny, w temperaturze od 10 do 110°C zależnej od parametrów technologicznych, to jest od struktury i temperatur przetwórstwa użytego polimeru.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako modyfikator stosuje się betulinę uzyskaną z kory brzozy.
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako reaktor stosuje się mieszalnik ze stali nierdzewnej lub szkła, wyposażony w system odprowadzania ładunku elektrycznego.
6. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że mieszaninę polimeru bazowego z betuliną suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem, najkorzystniej o wartości 66,7 kPa.

### Rysunek



Wzór 1