



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00699**

(22) Data de depozit: **22/09/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2021** BOPI nr. **12/2021**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. **3/2019**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA, NR. 43, BL.012, SC. B, ET.1, AP. 62, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VASILE EUGENIA, STR. NADA FLORILOR, NR.2, BL.2, SC.2, ET.7, AP.74, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **STĂNESCU PAUL OCTAVIAN, STR. VATRA DORNEI NR.9, BL.E 4, SC.2, AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
C. ZAHARIA Ș.A., "DEVELOPMENT OF NOVEL SILK FIBROIN-MAGNETITE BIOCOMPOSITES FOR TISSUE ENGINEERING, 20th INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPOSITE MATERIALS COPENHAGEN, 2015;
ZI-HENG LI Ș.A., "SILK FIBROIN-BASED SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING", FRONT. MATER. SCI., VOL. 7(3), PP. 237-247, 2013

(54) **BIOCOMPOZITE PE BAZĂ DE FIBROINĂ DIN MĂTASE NATURALĂ ȘI NANOPARTICULE MAGNETICE CU APLICAȚII ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS, ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA**



1 Invenția se referă la biocompozite polimerice pentru aplicații în ingineria țesutului
osos pe bază de fibroină din mătase naturală și nanoparticule magnetice și la un procedeu
3 de laborator de obținere a acestora.

5 Se cunosc din literatura de specialitate compozite polimerice pentru aplicații în
ingineria țesutului osos [1-10]. Aceste sisteme combină sisteme polimerice naturale sau
sintetice cu materiale de tip hidroxiapatită, particule magnetice, grafene sau nanotuburi de
7 carbon pentru obținerea unor scaffold-uri cu proprietăți similare cu ale osului ce ar putea
deveni o alternativă viabilă la grefele existente pe piață.

9 Nevoia de a reconstrui osul chirurgical a crescut în ultimii ani odată cu îmbătrânirea
populației dar și cu creșterea accidentelor care duc la traume serioase ale oaselor [11]. Deși
11 modalitățile actuale de tratament pentru defectele osoase includ autogrefe, alogrefe sau os
artificial toate acestea ridică probleme legate de siguranță, performanță și disponibilitate. Se
13 pune astfel problema de a dezvolta materiale inovative pentru os cu bune proprietăți meca-
nice, structura și porozitate controlate, biocompatibilitate ridicată, biodegradabilitate și pro-
15 prietăți osteoconductoare și osteoinductoare [11]. Autogrefele sunt încă văzute ca materiale
optime pentru reconstrucție în lipsa unor materiale sintetice care să le depășească în perfor-
17 manțe. Totuși, în ortopedie, cererea de materiale sintetice poate fi completată prin folosirea
unor structuri compozite. În acest fel este posibilă simularea structurilor organismelor vii cum
19 ar fi osul, cartilajul sau dinții cu ajutorul compozitelor.

21 Se cunosc din brevetul **US 8614189 B2** scaffold-uri compozite pe bază de polimeri
biodegradabili (PLGA) de tip microsferă și nanotuburi de carbon cu bună biodegradabilitate
și proprietăți mecanice îmbunătățite. Acest brevet descrie metoda de obținere a acestor
23 sisteme compozite, dar și un procedeu de reparare a defectelor osoase cu aceste scaffold-
uri. Procedul constă în umplerea defectului sau a zonei cu defect osos cu un material com-
25 pozit biocompatibil care să conducă în final la regenerare osoasă în zona afectată.

27 Într-un alt document, **US 20110307073 A1** sunt prezentate scaffold-uri bioresorbabile
pentru repararea osului și a ingineria oaselor lungi. Scaffold-urile sunt poroase și conțin
canale multiple. Acestea sunt realizate din straturi de mese micro-filamentare pe bază de
29 policaprolactonă (PCL) sau un compozit de policaprolactonă. Acest material compozit are
un canal central ce poate fi umplut sau încărcat cu agenți bioactivi și posedă proprietăți
31 mecanice adecvate pentru ingineria osului. Viteza mică de degradare a scaffold-ului 3D este
suficientă pentru a își menține integritatea structurală și proprietățile mecanice în timpul
33 procesului de remodelare.

35 Se cunoaște și din documentul **EP 1426066 A4** un produs de tip scaffold pentru
ingineria țesutului osos uman. Acesta este constituit din microparticule bioactive care pot
duce la regenerarea osoasă dorită. Este propus un compozit pe bază de polimer organic și
37 siliciu, calciu și fosfor (ca substanțe bioactive) cu structură tridimensională ce mimează osul
uman. Compozitul poate fi folosit în siguranța și cu costuri reduse pentru repararea defecte-
39 lor osoase rezultate în urma traumelor sau accidentelor. Brevetul de față descrie și metodele
pentru prepararea acestor scaffold-uri.

41 Un alt document, **US 6103255 A** propune scaffold-uri polimerice poroase pentru
ingineria tisulară. În acest caz se obțin materiale poroase pe bază de polimeri biodegradabili
43 (polihidroxialcanoati, policaprolactone, policarbonați etc) ca fază continuă având o distribuție
bimodală interconectată a dimensiunii porilor deschiși (50-500 microni cei mari și sub
45 20 microni cei mici). Documentul evidențiază și metodele de obținere a acestor sisteme
poroase interconectate.

Cererea de brevet internațională WO 2014152113 A3 se referă la implanturi osoase pe bază de materiale compozite poroase ce conțin sticlă (material ceramic) și polimeri pentru o mai bună manipulare. Astfel de materiale implantabile pot fi folosite cu succes în tratarea defectelor osoase prin stimularea osteoinducției.	1
Ca o concluzie putem afirma că există cereri de brevet și brevete de invenție ce propun utilizarea materialelor compozite polimerice pentru managementul țesutului osos, dar se remarcă lipsa informațiilor brevetate în domeniul compozitelor cu conținut de nanaoparticule magnetice în această direcție.	3
De asemenea, există și articole în domeniu, ca de exemplu C. Zaharia s.a., <i>Development of novel silk fibroin-magnetite biocomposites for tissue engineering</i> , 20th International Conference on Composite Materials Copenhagen, 19-24th July 2015, articol în care se prezintă obținerea unui biocompozit din fibroină și nanoparticule magnetice pentru aplicații medicale, și Zi-Heng LI ș.a., <i>Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering</i> , Front. Mater. Sci. 2013, 7(3): 237–247, articol în care se prezintă obținerea unui material compozit pe bază de fibroină și diverși polimeri pentru utilizare medicală.	5
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unei compozite pe bază de fibroină din mătase naturală și nanoparticule magnetice de magnetită care prezintă caracteristici fizico-mecanice și biologice adecvate utilizării în ingineria tisulară osoasă și la un procedeu de obținere a acestora.	7
Biocompozitele polimerice pentru aplicații în ingineria țesutului osos pe bază de fibroină din mătase naturală și nanoparticule magnetice de magnetită, conform invenției, sunt constituite din amestecuri formate din 10...50% fibroină din mătase naturală, 90...50% poli(2-hidroxietyl metacrilat) și 1% magnetită față de amestecul inițial, procentele fiind volumetrice.	9
Procedeu de obținere a biocompozitelor polimerice conform invenției, constă din dispersarea nanoparticulelor de magnetită în fibroină, prin ultrasonare timp de 1 h, urmată de adăugarea unei soluții de monomer, inițiator și agent de reticulare, 2-hidroxietyl metacrilat, persulfat de potasiu și etilenglicol dimetacrilat, rezultând un amestec care se toarnă și se formează în matrițe la o temperatură de 60°C, la presiune atmosferică, timp de 4 zile, rezultând un material cu bună biocompatibilitate celulară și cu abilitate de formare de hidroxiapatită în soluții de Ca și P prin protocolul de cicluri alternante	11
Avantajele acestor tipuri de materiale se referă la biocompatibilitate ridicată evidențiată prin teste pe linii celulare de șoarece și la abilitatea ridicată de a stimula formarea de hidroxiapatită în soluții de Ca și P (protocol cicluri alternante).	13
Avantajele ce decurg din aplicarea invenției se referă la obținerea unor biocompozite pe bază de proteine, polimeri sintetici și particule de magnetită ce pot oferi un suport pentru țesutul osos afectat în urma unor traumatisme sau afecțiuni specifice. Aceste tipuri de materiale cu biocompatibilitate înaltă ar putea fi folosite pentru repararea defectelor osoase, acestea având capacitatea de a stimula formarea de hidroxiapatită, componenta de bază a țesutului osos (demonstrată momentan la nivel <i>in vitro</i>).	15
Biocompozitele obținute în cadrul invenției prezintă proprietăți fizico-chimice, mecanice și biologice adecvate, ceea ce le poate recomanda pentru obținere de scaffold-uri în domeniul tratării defectelor osoase. Invenția de față oferă o soluție simplă și economică pentru obținerea de compozite polimerice cu structura 3D interconectată, cu proprietăți fizico-mecanice și biologice îmbunătățite și capacitate de a stimula formarea de hidroxiapatită în medii simulate.	17
Dezvoltarea continuă a tehnologiei din ultimii ani a atras după sine o schimbare de direcție în domeniul cercetării științifice. Dacă în urmă cu două decenii activitatea de cercetare avea ca punct de interes materialele sintetice, de origine fosilă, în prezent grija pentru mediu și pentru sănătatea umană orientează cercetătorii spre materiale naturale, care	19

1 prezintă o toxicitate scăzută, sau chiar absentă, în funcție de domeniul de utilizare. În același
2 timp, nevoia de aplicații din ce în ce mai numeroase ale materialelor necesită proprietăți
3 complexe ale acestora și o performanță ridicată, iar în acest caz s-a demonstrat că originea
4 acestora are un rol important: materialele de origine naturală posedă proprietăți fizice și
5 chimice greu, sau imposibil de reprodus prin sinteză.

6 Mătasea naturală este una dintre cele mai vechi fibre cunoscute, folosite în domenii
7 diferite. Versatilitatea acesteia a transformat-o într-un candidat excelent în domeniul medical,
8 începând cu suturile chirurgicale. Fiind compusă din fibroină și sericină, două proteine cu
9 proprietăți pe cât de diferite, pe atât de complementare, mătasea prezintă un interes deosebit
10 pentru cercetători în prezent, într-o continuă ascensiune. Fibroina reprezintă un material ce
11 se pretează foarte bine domeniului biomedical datorită rezistenței mecanice superioare în
12 stare umedă, bicompatibilității acesteia, permeabilității pentru oxigen și vaporii de apă,
13 precum și rezistenței ridicate la degradarea enzimatică. Datorită acestor beneficii, aplicațiile
14 în domeniul medical au fost sugerate pentru suturi chirurgicale, cosmetică, imobilizarea enzi-
15 melor, acoperirea rănilor, substrat pentru cultura celulară medicamente cu eliberare contro-
16 lată și schelet pentru ingineria țesuturilor [12-14].

17 Fibroina poate fi utilizată la realizarea diferitelor tipuri de pansamente în chirurgie,
18 deoarece accelerează procesul de vindecare a rănilor și arsurilor și pot fi ușor îndepărtate
19 fără a deteriora țesutul nou format [15, 16]. Fibroina simplă sau modificată chimic cu funcțiuni
20 COOH sau OH servește la obținerea unor compozite hidroxiapatita-fibroina folosite ca os
21 artificial. Prin dizolvare în anumiți solvenți și reconstituire prin precipitare fibroină poate fi
22 prelucrată în filme: geluri, pudre, spume sau chiar tuburi, având pereții poroși pentru înlocui-
23 rea vaselor de sânge. Din soluție se pot obține microparticule pentru eliberarea controlată
24 de principii active sau suporturi de diferite forme pentru culturi de celule pentru studii ori în
25 vederea reconstrucției diferitelor țesuturi.

26 Fibrele de mătase naturală prezintă proprietăți care pot concura cu cei mai avansați
27 polimeri sintetici, dar spre deosebire de aceștia, se obțin în condiții mai puțin dure, din materii
28 prime regenerabile și sunt materiale biodegradabile. De foarte mulți ani aceste fibre au
29 aplicații în industria textilă de lux, urmate mai apoi de utilizări industriale și biomedicale. Pro-
30 prietățile mătăsii naturale se datorează legăturilor de hidrogen extinse, naturii hidrofobice a
31 proteinei și a cristalinității însemnate.

32 Mătasea este un material insolubil în majoritatea solvenților, inclusiv apa, soluții
33 diluate de acizi sau baze, însă este solubilă într-un număr limitat de solvenți precum soluțiile
34 apoase de săruri de litiu (LiBr, LiSCN), NaSCN sau sistemele $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ și
35 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{MeOH}$. Modulul de elasticitate al mătăsii produse de *Bombyx mori* este cuprins
36 între 15-17 GPa, iar rezistența la tracțiune variază între 610-690 MPa.

37 Fibrele de mătase prezintă o stabilitate termică bună până la temperatură de 200°C.
38 Sub 140°C nu se constată modificări chimice, iar la temperaturi de peste 200°C încep să se
39 formeze gaze (CO , CO_2 , NH_3) prin degradarea grupărilor laterale ale aminoacizilor.

40 Magnetita este un mineral din grupa oxizilor de fier cu formula chimică Fe_3O_4 , ce
41 prezintă proprietăți feromagnetice, fiind oxidul de fier cel mai rezistent față de acizi și baze.
42 Ionul de fier din mineral poate fi fier bivalent sau trivalent. Magnetita are duritatea pe scara
43 lui Mohs de 5,5-6,5, culoare neagră și un luciu mat, metalic. Magnetita este cunoscută cel
44 mai mult pentru proprietatea sa de a fi puternic atrasă de magneti. Unele forme de magnetită
45 din localități specifice sunt singurele minerale care acționează ca un magnet natural.

46 Nanoparticulele de magnetită au un rol foarte important într-o gama largă de aplicații
47 datorită proprietăților precum caracterul super paramagnetic, antimicrobian și non-citotoxic,
48 susceptibilitatea magnetică ridicată, biocompatibilitatea, favorizarea adeziunii celulare,
49 stimularea formării hidroxiapatitei în organism [17].

Cercetările recente în domeniul ingineriei osului cer dezvoltarea unor materiale care nu numai că ar trebui să înlocuiască osul, dar să și regenereze țesutul afectat pe baza unor stimuli externi/interni. Materialele magnetice în scaffold-uri osoase sunt considerate un factor de stimulare a vindecării osoase, în special când terapia este însoțită de o stimulare magnetică externă [18]. Multe studii au fost orientate pe materiale compozite și a treia componentă de tip gelatină [19], acid polilactic [20], collagen [21], nanoparticule de argint, nanotuburi de carbon și carboximetil celuloză. Magnetita este un element important în compozite biodegradabile cu aplicații ca biosenzori, imagistică medicală, hipertermia etc. Nanoparticule de ferită acoperită cu hidroxiapatită sunt unele din cele mai promițătoare materiale cu magnetizare rapidă în prezența câmpului magnetic [22, 23]. O lucrare recentă arată că prezența oxidului de fier în hidroxiapatită poate îmbunătăți radio-opacitatea și proliferarea osteoblastelor [24]. HA dopată cu Fe_3O_4 prezintă solubilitate crescută în soluții fiziologice în comparație cu hidroxiapatita simplă [25].

În concluzie, plecând de la datele de literatură existente la ora actuală, propunerea de față se referă la prepararea unor biomateriale compozite pe bază de polimeri naturali biocompatibili (fibroină din mătase naturală), polimeri sintetici (poli(2-hidroxietil metacrilat) și nanoparticule magnetice ca scaffold-uri biocompatibile pentru ingineria țesutului osos. Cerearea evidențiază metoda de preparare a acestor compozite cu compoziții variate, metode de caracterizare fizico-chimică și morfologică, teste de biomineralizare în soluții ce mimează plasma sangvină și teste biologice pe linii celulare specifice privind biocompatibilitatea acestora.

În continuare se vor da exemple de realizare a invenției și se vor descrie materialele folosite în studiu experimental cât și metodele alese pentru prepararea și caracterizarea materialelor compozite propuse în cadrul invenției. Exemplele și descrierile se fac în concordanță cu figurile care reprezintă:

- fig. 1, dispersarea MAG în amestecul inițial;
- fig. 2, dispozitiv de obținere a biocompozitelor SF/PHEMA/MAG;
- fig. 3, materiale compozite pe bază de fibroină/PHEMA cu și fără magnetită;
- fig. 4, spectre RAMAN comparative pentru magnetită, biomateriale SF10/ PHEMA90/ MAG și martor SF10/PHEMA90;
- fig. 5, microfotografii SEM pentru materiale (a) SF10/PHEMA70/MAG1%, (b) SF30/PHEMA70/MAG1% și (c) SF50/PHEMA50/MAG1%;
- fig. 6, spectre EDAX pentru materiale (a) SF10/PHEMA90/MAG1%, (b) SF30/PHEMA70/MAG1% și (c) SF50/PHEMA50/MAG1%;
- fig. 7, imagini TEM/HRTEM pentru compozite pe bază de SF50/PHEMA50/MAG1%;
- fig. 8, spectru EDAX pentru materiale SF10/PHEMA90/MAG1%;
- fig. 9, difractograme XRD pentru SF/PHEMA/MAG: peak-uri - $35,67^\circ$ deplasat la $35,72^\circ$ pentru SF/PHEMA, 10/90; la $35,85^\circ$ pentru SF/PHEMA, 30/70 și la $35,62^\circ$ pentru SF/PHEMA, 50/50;
- fig. 10, microfotografii SEM cu cristale de Hap pe suprafața materialelor SF/PHEMA/MAG: 10/90, 30/70 și 50/50;
- fig. 11, imagini de microscopie de fluorescență în care se pot observa celule vii (fluorescență verde) și moarte (fluorescență roșie) cultivate 2 zile în contact cu sistemele 3D pe bază de fibroină și PHEMA (50/50), cu și fără magnetită, cu și fără câmp magnetic.

Materiale și Metode

Materialele folosite în vederea întocmirii prezentei cereri de brevet au fost următoarele: coconi de mătase Bombyx mori, nanoparticule de magnetită (MAG, obținută în laborator), 2-hidroxietil metacrilat (HEMA, SIGMA), agenta de reticulare etilenglicol

RO 133130 B1

1 dimetacrilat (EGDMA, SIGMA-ALDRICH), sisteme de inițiere: persulfat de potasiu cu inițiere
termică la 60°C, alte substanțe folosite: apă distilată, bromura de litiu (Sigma-Aldrich),
3 membrane de dializă.

Fibrele de mătase sunt alcătuite din două proteine diferite: o proteină structurală
5 interioară denumită fibroină și stratul de ceară protector denumit sericină. Acestea au o
structură de tip miez-teacă, arătând că mătasea este formată din două filamente de fibroină
7 care sunt acoperite cu sericină. Fibroina este compusă dintr-o secvență repetitivă de amino-
acizi: glicina, alanina și serina, nefiind solubilă în apă.

9 Magnetita (Fe_3O_4) a fost preparată prin metoda coprecipitării pornind de la clorura
ferică (FeCl_3), sulfura de fier heptahidratat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) și hidroxid de amoniu (NH_4OH).
11 Clorura ferică a fost dizolvată în apă la temperatura camerei pentru a se obține o soluție
clară. La soluția astfel obținută se adaugă sulfura de fier la temperatura camerei, sub agitare
13 magnetică. Soluția amestec obținută este apoi introdusă într-o soluție apoasă de hidroxid de
amoniu. Precipitatul de Fe_3O_4 se separă din mediul de reactivi cu ajutorul unui magnet
15 puternic și se spală de mai multe ori cu alcool etilic și apă distilată până când se atinge un
pH neutru ($\text{pH} = 7$) în mediul de spălare. După spălare, precipitatul de Fe_3O_4 este uscat în
17 etuva, la 60°C, timp de 12 h. Poli(2-hidroxietil metacrilatul) (PHEMA) este de asemenea un
polimer biocompatibil, netoxic, format din unități repetitive de 2-hidroxietil metacrilat (HEMA),
19 un monomer cu masă moleculară $130,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, cu următoarele proprietăți fizice: lichid
incolor, densitate $1,07 \text{ g/cm}^3$, punct de topire -99°C, punct de fierbere 213°C, presiune de
21 vapori 0,08 hPa.

Monomerul poate fi polimerizat sau copolimerizat fără dificultate (ca majoritatea
23 polimerilor metacrilici), iar funcțiunile alcoolice primare permit formarea de derivați HEMA cu
legătură dublă neschimbată. Polimerul permite la rândul sau asemenea substituții, ceea ce
25 conduce la formarea unei game largi de derivați PHEMA pentru aplicații în majoritatea
ramurilor medicale (oftalmologie, chirurgie, lentile de contact, ortopedie etc).

27 Etilenglicol dimetacrilatul (EGDMA) este un monomer lichid incolor, cu masa molară
de $198,22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ folosit ca intermediar în producția polimerilor în industria chimică, inclusiv
29 pentru a crea compozite HAP/PMMA și ca agent de reticulare pentru 2-hidroxietil metacrilat.

Persulfatul de potasiu (KP) este un compus anorganic solid și alb, foarte solubil în
31 apă, cu formula chimică $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ și masa moleculară $270,322 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Totodată, această
sare este un puternic antioxidant folosit în mod uzual în inițierea polimerizărilor radicalice.

33 Metoda obținerii fibroinei din coconi de mătase Bombyx mori

Coconii de mătase din viermi Bombyx mori sunt supuși unui proces de degomare
35 pentru a îndepărta sericina din suprafața fibrelor de mătase. Acest proces constă în
mărunțirea coconilor și fierberea acestora pentru 30 min într-o soluție de carbonat acid de
37 sodiu (NaHCO_3 , 0,05%) în care s-a adăugat un agent tensioactiv (dodecilsulfat de sodiu).
Acest ciclu se reia de 3 ori în vederea purificării avansate a fibroinei. Fibrele de fibroină
39 degomate sunt uscate în etuvă la o temperatură de 40-45°C timp de 24 h.

Obținerea soluției de fibroină:

41 Datorită gradului mare de cristalinitate și a legăturilor de hidrogen, fibroina este
insolubilă în majoritatea solvenților cunoscuți. Totuși, fibroina se dizolvă în soluții de bromura
43 de litiu concentrate sau în amestecuri precum cel de $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}/\text{H}_2\text{O}$.

Obținerea soluției de fibroină rezultă prin dizolvarea fibroinei în soluție apoasă de LiBr 10 M,
45 la temperatura de 55-60°C, timp de 8 h, evitându-se degradarea acesteia (fibroina se
degradează la aproximativ 190°C). Soluția rezultată este apoi filtrată pe hârtie de filtru cutat
47 pentru îndepărtarea impurităților și dializată timp de 5 zile pentru înlăturarea ionilor rezultați.

Dializa și păstrarea soluției rezultate se operează la frigider pentru a putea fi utilizată ulterior deoarece această soluție este metastabilă și poate precipita. Concentrația finală a soluției de fibroină a fost 3%.	1
Obținerea biocompozitelor pe bază de fibroină din mătase naturală și nanoparticule magnetice (protocol de lucru):	3
Procedeu de lucru constă în dispersarea nanoparticulelor de magnetită în soluție de fibroină prin ultrasonicare timp de 1 h, urmată de adăugarea unei soluții de monomer, inițiator și agent de reticulare (2-hidroxietil metacrilat, persulfat de potasiu și etilenglicol dimetacrilat) (fig. 1).	5
Aceste amestecuri cu compoziții diferite sunt turnate/injectate în matrițe de cauciuc (forma pătrată) la o temperatură de 60°C, presiune atmosferică, timp de patru zile pentru întărire. Au fost obținute biocompozite cu rapoarte variate între soluția de fibroină și cea de monomer: SF/PHEMA, 10/90, 30/70, 50/50 (pentru exemplificare). Concentrația magnetitei (MAG) în soluția inițială a fost menținută constantă pentru toate cazurile (1% față de amestec). Au fost obținute și loturi martor fără nanoparticule de magnetită prin același protocol.	7
Dizpozitivul de obținere a biocompozitelor este alcătuit din două plăci de sticlă și o matriță de cauciuc dispuse în format sandwich, prinse cu cleme pentru ermetizare (fig. 2).	9
Caracterizarea fizico-chimică și morfologică a biocompozitelor SF/PHEMA/MAG:	11
Analiza spectroscopică Raman a fost realizată pe un dispozitiv LabRAM HR Evolution de la Horiba (Jobin Yvon).	13
Analiza prin difracție de raze X (XRD) a fost realizată cu ajutorul unui difractometru Panalytical X'PERT MPD, în domeniul $2\theta = 10-80$. Un fascicul de raze X caracteristic radiației Cu K α a fost utilizat ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$).	15
Analiza prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) a fost efectuată cu un echipament SEM QUANTA INSPECT F cu tun de emisie (FEG) cu rezoluția de 1,2 nm și cu EDS. Probele au fost acoperite în prealabil cu nanoparticule de aur în vederea asigurării conductivității. Analiza TEM a fost realizată cu un microscop electronic de transmisie de ultra rezoluție (HR-TEM) TECNAI F30 G2 S-TWIN operat la 300 kV echipat cu EDAX.	17
Evaluarea comportamentului la biomineralizare a compozitelor cu magnetita prin imersare în soluții alternante de calciu și fosfor:	19
Tetsushi Taguchi și colaboratorii săi [26, 27] au arătat că se pot forma <i>in vitro</i> în/pe o matrice polimerică de tip hidrogel structuri de tipul os-apatita la temperaturi și presiuni normale folosindu-se metoda ciclurilor alternante.	21
Metoda ciclurilor alternante este un proces care implică imersarea alternantă a probelor în două soluții: o soluție apoasă de CaCl ₂ /tris(hidroximetil)aminometan (Tris) și HCl concentrat (pH = 7,4), soluție Ca 200 mM; o soluție apoasă de Na ₂ HPO ₄ 120 mM. Probele cu și fără nanoparticule magnetice au fost imersate pe rând în cele două soluții timp de 4 zile. La final, probele au fost spălate cu apă distilată, uscate și supuse investigațiilor morfologice prin analiza SEM.	23
Evaluarea biocompatibilității biomaterialelor pe linii celulare specifice:	25
În acest studiu au fost utilizate pre-osteoblaste de șoarece, aparținând liniei celulare MC3T3-E1, tulpina C57BL/6. Celulele MC3T3-E1 au fost cultivate în mediu de cultură Dulbecco's modified Eagle's Medium low glucose (DMEM lg) (Sigma-Aldrich, cod D2902), suplimentat cu 3,5 g glucoză, 1,5 g NaHCO ₃ , 1% antibiotic-antimicotic (ABAM) (Sigma-Aldrich, cod A5955) și 10% ser fetal bovin (SFB) (Gibco, cod 10106-151). Incubarea s-a realizat la 37°C, într-o atmosferă umedă de 5% CO ₂ , iar mediul de cultură a fost schimbat la fiecare trei zile.	27

Pentru multiplicare, celulele MC3T3-E1 ajunse la confluența au fost desprinse de pe substrat cu o soluție de 2,5% tripsina - 0,53 mM EDTA și recultivate la o densitate celulară inferioară.

Realizarea bioconstructului de tip celule/suport:

Celulele MC3T3-E1 au fost desprinse de pe suprafața de cultură, numărate într-o cameră de numărare Burkert-turk și centrifugate, timp de 10 min, la 420 g. În paralel, hidrogelurile au fost sterilizate prin expunere la UV câte 12 h pe fiecare față și apoi gonflante în tampon tampon PBS, suplimentat cu 1% ABAM, la 4°C, timp de 24 h.

Sedimentul celular obținut după centrifugare a fost reluat în mediu de cultură astfel încât, pe suprafața fiecărui suport steril a fost distribuit un volum de 150 μ L suspensie celulară care conține 10^6 celule. După însămânțare, suporturile nu au fost mișcate timp de 30 min pentru aderarea celulelor la material. În final a fost adăugat mediul de cultură și sistemele celule-suport au fost incubate în condiții standard de cultivare în vederea realizării experimentelor propuse.

Câmpul magnetic la care au fost expuse probele a fost generat magneți de Neodymium N35 plasați sub bioconstrucțiile 3D și a avut o intensitate de 120 mT.

Evaluarea viabilității celulelor în contact cu scaffold-urile - Testul Live/Dead:

Viabilitatea celulelor MC3T3-E1 a fost evaluată calitativ prin microscopie de fluorescență după 2 zile de la însămânțare. Acest test a fost realizat prin marcarea fluorescență a celulelor vii și moarte cu ajutorul kitului LIVE&DEAD (Invitrogen, cod L3224). Kitul conține două componente cu ajutorul cărora se pot evidenția celulele în fluorescență:

- *Calceina AM* - o substanță nefluorescentă, permeabilă pentru membrana celulară, care odată ajunsă în citoplasmă, este convertită de esteraze într-un compus cu o fluorescență intensă (calceina). Acest compus, cu o fluorescență verde (ex/em: ~ 495 nm/ ~ 515 nm), este foarte bine reținut în celulele vii;

- *Bromura de etidiu* - un compus care pătrunde în celule doar în cazul în care membrana este deteriorată și se leagă de acizii nucleici, producând o fluorescență puternică, roșie (ex/em: ~ 495 nm/ ~ 635 nm).

Protocolul de lucru pentru aceste studii a constat în aspirarea mediului de cultură și spălarea sistemelor 3-D celule-suport cu tampon PBS pentru îndepărtarea urmelor de SFB. Probele au fost apoi incubate, la temperatura camerei, la întuneric, 15-20 min cu soluția de colorare preparată în prealabil conform indicațiilor din kit (2 μ M Calceina AM și 4 μ M Bromura de etidiu în mediu fără SFB). După expirarea timpului, structurile au fost așezate pe o lamă de microscop și inspectate în fluorescență, la microscopul Olympus IX 73.

Rezultate obținute în cadrul acestor experimente:

1. Obținerea biocompozitelor pe bază de fibroină și nanoparticule magnetice

În cadrul cererii de brevet au fost obținute materiale compozite pe bază de fibroină, poli(2-hidroxietilmetacrilat) și nanoparticule magnetice (1% față de amestecul inițial) cu diferite compoziții pentru exemplificare: SF/PHEMA 10:90, 30:70, 50:50 (rapoarte volumetrice între soluțiile de fibroină și HEMA), dar și probele martor prezentate în fig. 3 de mai jos.

2. Caracterizarea biocompozitelor prin spectrometrie RAMAN

Materialele pe bază de fibroină/PHEMA și nanoparticule magnetice au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic prin tehnica spectroscopiei Raman. Rezultatele sunt evidențiate în fig. 4 unde se poate observa prezența peak-ului caracteristic magnetitei în sistemul compozit SF/PHEMA/MAG de la 673 cm^{-1} deplasat către $668/703\text{ cm}^{-1}$.

3. Caracterizarea morfologică a biocompozitelor (analize SEM/TEM)	1
Imaginile SEM și spectrele EDAX pe toate compozițiile studiate evidențiază faptul că magnetita s-a dispersat relativ uniform în masă materialelor obținute, în unele părți concentrația sa fiind mai mare. Zonele luminoase reprezintă zone cu concentrație mare de magnetită (fig. 5.(a)-stanga), iar celelalte zone reprezintă suportul cu magnetită în concentrații mai mici.	3
De asemenea, s-a constatat că indiferent de raportul fibroină din mătase și PHEMA, modul de dispersie al magnetitei este același.	5
Imaginile TEM de ansamblu (fig. 7 sus) evidențiază mult mai bine prezenta și dispersarea magnetitei în material. În imaginile TEM de detaliu (fig. 7 jos) de 20 nm se observă nanoparticulele de magnetită individual, cu diametrul cuprins între 7 și 15 nm, iar în cele de înaltă rezoluție, de 2 nm, sunt evidențiate planele de difracție ale magnetitei. Analizele EDAX (fig. 8) făcute în TEM și prezentate mai jos confirmă de asemenea prezența fierului în sistemele compozite rezultate.	7
4. Caracterizarea biomaterialelor compozite prin difracție de raze X	9
Măsurătorile de difracție de raze X au fost realizate atât pentru magnetită, cât și pentru sistemele compozite pe bază de fibroină, PHEMA și magnetita și este prezentată în continuare (fig. 9). În difractograma de raze X pentru magnetita se identifică peak-urile sale specifice, dintre care cele mai importante sunt la $2\theta = 30,28^\circ$, $35,67^\circ$, $43,36^\circ$ și la $57,36^\circ$. Pentru toate difractogramele XRD ale materialelor, se observă prezența peak-ului de la $35,67^\circ$ cel mai pronunțat, deplasat în funcție de compoziție. Totodată, majoritatea peak-urilor magnetitei se regăsesc în structura biocompozitelor.	11
5. Evaluarea capacității de biomineralizare a compozitelor obținute	13
Protocolul ales pentru biomineralizarea materialelor a fost metoda ciclurilor alternante. Aceasta presupune prepararea unei soluții de clorură de calciu, imersarea probelor în soluție timp de 24 h, spălarea lor cu apă și imersarea în soluție Na_2HPO_4 pentru încă 24 h, în două cicluri alternante (durată test patru zile). Testul a fost realizat la 37°C și presiune atmosferică. În vederea evidențierii cristalelor de hidroxiapatită, au fost efectuate caracterizări morfologice SEM pentru materialele supuse metodei ciclurilor alternante, iar rezultatele acestora sunt prezentate în microfotografiile SEM de mai jos (fig. 10). Rezultatele SEM evidențiază prezența uniformă a cristalelor de hidroxiapatită pe toată suprafața compozitelor cu magnetită testate. Prin teste comparative pe materiale fără magnetită, se remarcă rolul benefic al magnetitei în procesul de biomineralizare.	15
6. Teste de biocompatibilitate pentru materialele compozite pe bază de fibroină/PHEMA și magnetită	17
Imaginile de microscopie arată că celulele au aderat la biomaterialele studiate, indiferent de compoziție. Totuși, distribuția celulelor pare a fi organizată diferit în funcție de prezența sau absența magnetitei în compoziția biomaterialului. Astfel, în cazul compozițiilor fără magnetită, celulele s-au distribuit într-un monostrat uniform, iar în prezența magnetitei celulele au prezentat o distribuție mai grupată. Această observație poate fi de folos în cazul în care se dorește controlarea distribuției celulelor în biomaterial. În ceea ce privește, viabilitatea, majoritatea celulelor au fost marcate cu calceină, ceea ce indică faptul că ele au supraviețuit pe respectivele suporturi.	19
Pe baza rezultatelor obținute în urma realizării acestor studii se pot formula următoarele concluzii:	21
- au fost obținute compozite pe bază de fibroină din mătase naturală și nanoparticule magnetice cu compoziții variate (3 compoziții propuse);	23

1 - compozitele obținute au fost caracterizate prin spectrometrie RAMAN și difracție de
raze X iar caracterizarea morfologică prin analize SEM și TEM;

3 - au fost realizate teste de biomineralizare pentru materialele obținute prin metoda
ciclurilor alternante (protocol T. Taguchi) ce au condus la rezultate pozitive, în sensul
5 stimulării formării de hidroxiapatită pe suprafața materialelor;

7 - a fost evaluată biocompatibilitatea biomaterialelor pe linii celulare specifice prin teste
de viabilitate Live/Dead și microscopie confocală ce demonstrează că toate celulele au
aderat la biomaterialele studiate;

9 - materialele compozite rezultate prezintă potențiale aplicații biologice și medicale de
tip scaffold-uri pentru ingineria țesutului osos.

11 În concluzie, scopul și obiectivele cererii de brevet au fost îndeplinite, acesta
contribuind la dezvoltarea cunoștiințelor în domeniul obținerii și utilizării biomaterialelor cu
13 proprietăți îmbunătățite pentru ingineria țesuturilor prin sinteza scaffold-urilor pe bază de
mătase naturală, polimeri sintetici și nanoparticule de magnetită pentru ingineria țesutului
15 osos.

Bibliografie

- 19 [1] B. Ates, S. Koytepe, S. Balcioglu, A. Ulu, C. Gurses, 12 - *Biomedical applications*
21 *of hybrid polymer composite materials*, Hybrid Polymer Composite Materials, Woodhead
Publishing, 2017, pp. 343-408.
- 23 [2] D. Iannazzo, A. Pistone. M. Salamd, S. Galvagno, 6 - *Hybrid ceramic/polymer*
25 *composites for bone tissue regeneration*, Hybrid Polymer Composite Materials, Woodhead
Publishing, 2017, pp. 125-155.
- 27 [3] L.R. Jaidev, S. Kumar, K. Chatterjee, *Multi-biofunctional polymer graphene*
29 *composite for bone tissue regeneration that elutes copper ions to impart angiogenic,*
osteogenic and bactericidal properties, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 159,
(Supplement C), (2017), 293-302.
- 31 [4] Z. Kang, X. Zhang, Y. Chen, M.Y. Akram, J. Nie, X. Zhu, *Preparation of*
polymer/calcium phosphate porous composite as bone tissue scaffolds, Materials Science
and Engineering: C 70(Part 2), (2017), 1125-1131.
- 33 [5] X. Liu, P.X. Ma, *Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering*, *Annals of*
Biomedical Engineering, 32(3), (2004), 477-486.
- 35 [6] M. Miola, F. Laviano, R. Gerbaldo, M. Bruno, A. Lombardi, A. Cochis, L.
Rimondini, E. Verne, *Composite bone cements for hyperthermia: modeling and*
37 *characterization of magnetic, calorimetric and in vitro heating properties*, *Ceramics*
International 43(6), (2017), 4831-4840.
- 39 [7] S.H. Rao, B. Harini, R.P.K. Shadamarshan, K. Balagangadharan, N.
Selvamurugan, *Natural and Synthetic Polymers/Bioceramics/Bioactive Compounds-mediated*
41 *Cell Signaling in Bone Tissue Engineering*, *International Journal of Biological*
Macromolecules.
- 43 [8] K. Sahithi, M. Swetha, K. Ramasamy, N. Srinivasan, N. Selvamurugan, *Polymeric*
composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering, *International Journal*
45 *of Biological Macromolecules*, 46(3), (2010), 281-283.
- 47 [9] P. Sol, A. Martins, R.L. Reis, N.M. Neves, 5 - *Advanced polymer composites and*
structures for bone and cartilage tissue engineering A2 - Liu, Huinan, *Nanocomposites for*
Musculoskeletal Tissue Regeneration, Woodhead Publishing, Oxford, 2016, pp. 123-142.

- [10] W. Wang, S. Liao, M. Liu, Q. Zhao, Y. Zhu, *Polymer Composites Reinforced by Nanotubes as Scaffolds for Tissue Engineering*, International Journal of Polymer Science, 2014,(2014), 14. 1 3
- [11] U.-i. Chung, K. Itaka, N. Nishiyama, T. Takato, H. Kawaguchi, K. Nakamura, K. Kataoka, *Scaffolds for Skeletal Regeneration*, NanoBiotechnology, 3(2), (2007), 104-106. 5
- [12] B. Kundu,N.E. Kurland, S. Bano, C. Patra, F.B. Engel, V.K. Yadavalli, S.C. Kundu, *Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives*, Progress in Polymer Science, 39(2), (2014), 251-267. 7
- [13] D.U. Shah, F. Vollrath, 6 - *Silk for sustainable composites*, *Natural Fiber-Reinforced Biodegradable and Bioresorbable Polymer Composites*, Woodhead Publishing, 2017, pp. 91-109. 9 11
- [14] W.L. Stoppel, N. Raia, E. Kimmerling, S. Wang, CE. Ghezzi, D.L. Kaplan, 2.12 *Silk Biomaterials-A" A2 - Ducheyne, Paul, Comprehensive Biomaterials II*, Elsevier, Oxford, 2017, pp. 253-278. 13
- [15] C. Yang, R. Xue, Q. Zhang, S. Yang, P. Liu, L. Chen, K. Wang, X. Zhang, Y. Wei, *Nanoclay cross-linked semi-IPN silk sericin/poly(NIPAm/LMSH) nanocomposite hydrogel: An outstanding antibacterial wound dressing*, Materials Science and Engineering: C 81(Supplement C), (2017), 303-313. 15 17
- [16] X. Li, Y. Liu, J. Zhang, R. You, J. Qu, M. Li, *Functionalized silk fibroin dressing with topical bioactive insulin release for accelerated chronic wound healing*, Materials Science and Engineering: C 72(Supplement C), (2017), 394-404. 19 21
- [17] R.C.S. Azevedo, R.G. Sousa, W.A.A. Macedo, E.M.B. Sousa, *Combining mesoporous silica-magnetite and thermally-sensitive polymers for applications in hyperthermia*, Journal of Sol-Gel Science and Technology, 72(2), (2014), 208-218. 23
- [18] F. Heidari, M.E. Bahrololoom, D. Vashaei, L. Tayebi, *in situ preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application*, Ceramics International, 41(2, Part B), (2015), 3094-3100. 25 27
- [19] W. Xiao, J. He, J.W. Nichol, L. Wang, CB. Hutson, B. Wang, Y. Du, H. Fan, A. Khademhosseini, *Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels*, Acta biomaterialia, 7(6), (2011), 2384-2393. 29
- [20] O. Etienne, A. Schneider, J.A. Kluge, C. Bellemin-Laponnaz, C. Polidori, G.G. Leisk, D.L. Kaplan, J.A. Garlick, C. Egles, *Soft Tissue Augmentation Using Silk Gels: An in Vitro and in Vivo Study*, Journal of periodontology 80(11) (2009) 1852-1858. 31 33
- [21] M.L. Lovett, C. Cannizzaro, L. Daheron, B. Messmer, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, *Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering*, Biomaterials, 28(35) (2007), 5271-5279. 35
- [22] A. Inukai, N. Sakamoto, H. Aono, O. Sakurai, K. Shinozaki, H. Suzuki, N. Wakiya, *Synthesis and hyperthermia property of hydroxyapatite-ferrite hybrid particles by ultrasonic spray pyrolysis*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 323(7) (2011), 965-969. 37 39
- [23] M. Ghaemy, M. Naseri, *Synthesis of chitosan networks: Swelling, drug release, and magnetically assisted BSA separation using Fe₃O₄ nanoparticles*, Carbohydrate Polymers, 90(3), (2012), 1265-1272. 41
- [24] M. Ajeesh, B.F. Francis, J. Annie, P.R. Harikrishna Varma, *Nano iron oxide-hydroxyapatite composite ceramics with enhanced radiopacity*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21(5), (2010), 1427-1434. 43 45
- [25] O. Kuda, N. Pinchuk, L. Ivanchenko, O. Parkhomey, O. Sych, M. Leonowicz, R. Wroblewski, E. Sowka, *Effect of Fe₃O₄, Fe and Cu doping on magnetic properties and behaviour in physiological solution of biological hydroxyapatite/glass composites*, Journal of Materials Processing Technology, 209(4), (2009), 1960-1964. 47 49

- 1 [26] T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi, *Apatite formation on/in hydrogel matrices*
3 *using an alternate soaking process: II. Effect of swelling ratios of poly(vinyl alcohol) hydrogel*
 matrices on apatite formation, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 10(3),
 (1999), 331-339.
- 5 [27] T. Furuzono, T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi, Y. Tamada, *Preparation and*
7 *characterization of apatite deposited on silk fabric using an alternate soaking process*,
 Journal of Biomedical Materials Research, 50(3), (2000), 344-352.

- | | |
|--|---------------|
| | 1 |
| 1. Biocompozite polimerice pentru aplicații în ingineria țesutului osos pe bază de fibroină din mătase naturală și nanoparticule magnetice de magnetită, caracterizate prin aceea că , sunt constituite din amestecuri formate din 10...50% fibroină din mătase naturală, 90...50% poli(2-hidroxietil metacrilat) și 1% magnetită față de amestecul inițial, procentele fiind volumetrice. | 3
5
7 |
| 2. Procedeu de obținere a biocompozitelor polimerice definite în revendicarea 1, caracterizat prin aceea că , se dispersează nanoparticulele de magnetită în fibroină, prin ultrasonare timp de 1 h, urmată de adăugarea unei soluții de monomer, inițiator și agent de reticulare, 2-hidroxietil metacrilat, persulfat de potasiu și etilenglicol dimetacrilat, rezultând un amestec care se toarnă și se formează în matrițe la o temperatură de 60°C, la presiune atmosferică, timp de 4 zile, rezultând un material cu bună biocompatibilitate celulară și cu abilitate de formare de hidroxiapatită în soluții de Ca și P prin protocolul de cicluri alternante. | 9
11
13 |



Fig. 1

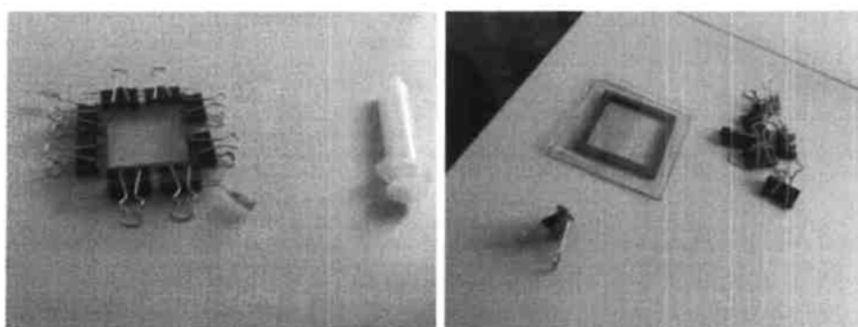


Fig. 2

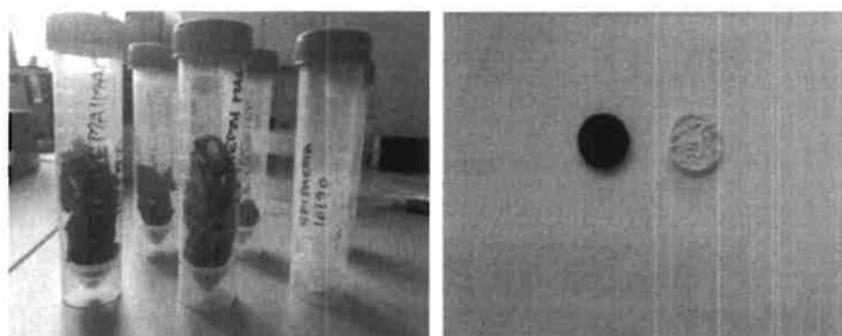


Fig. 3

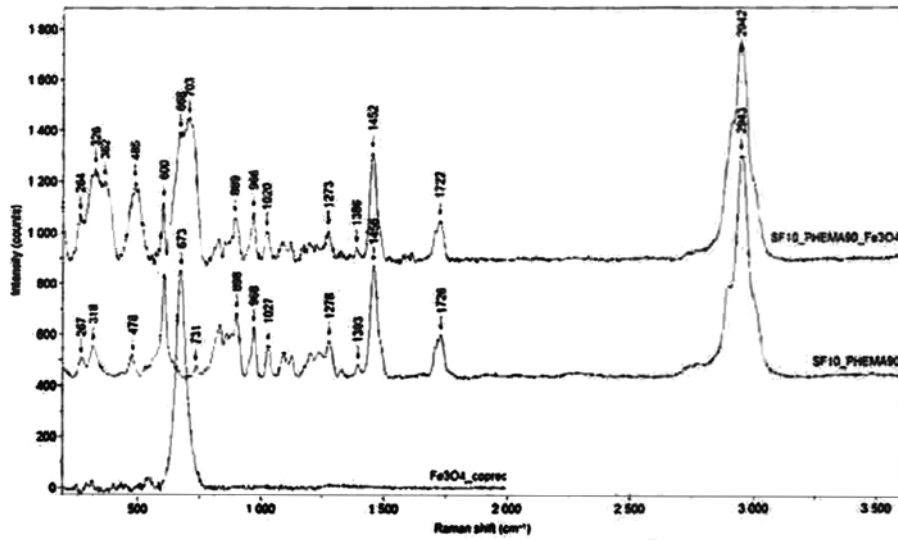


Fig. 4

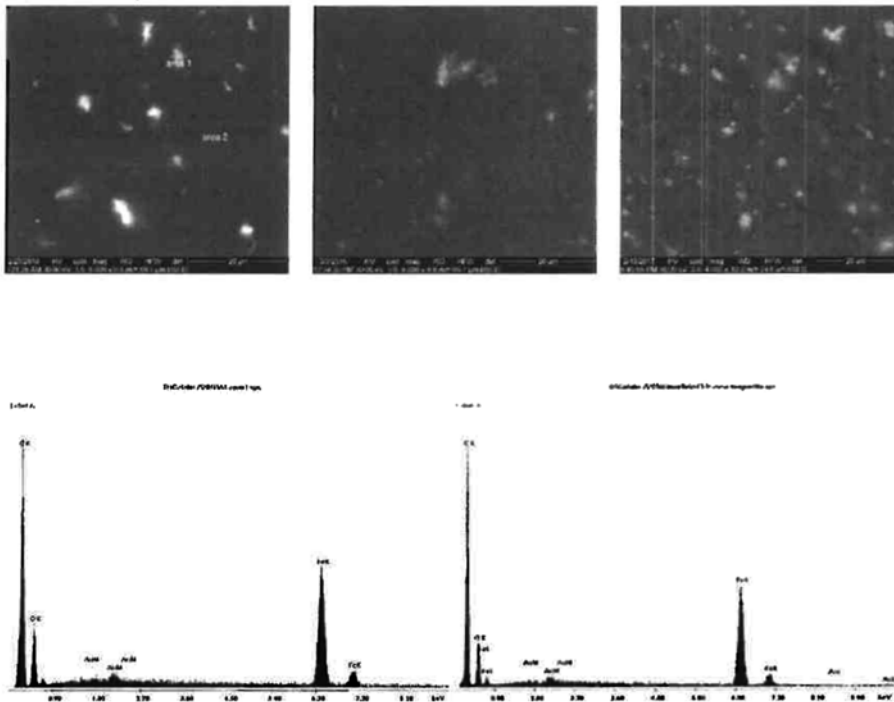


Fig. 5

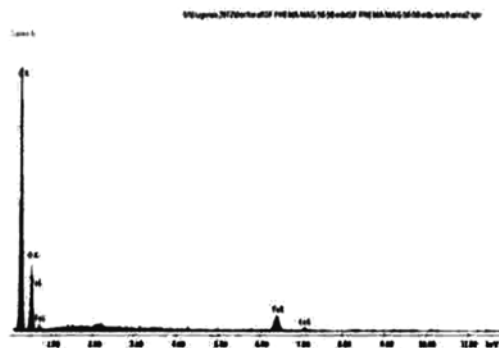


Fig. 6

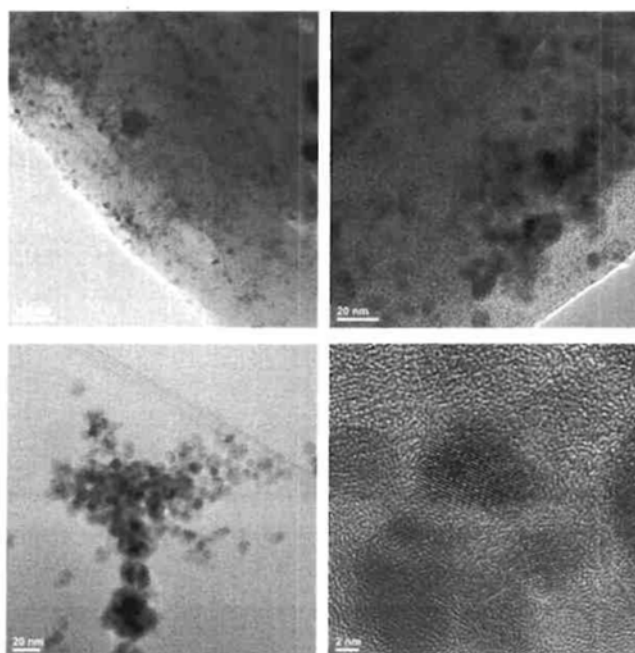


Fig. 7

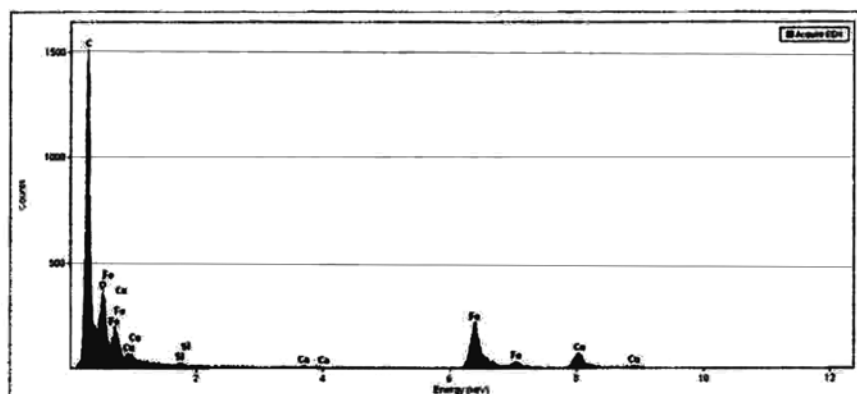


Fig. 8

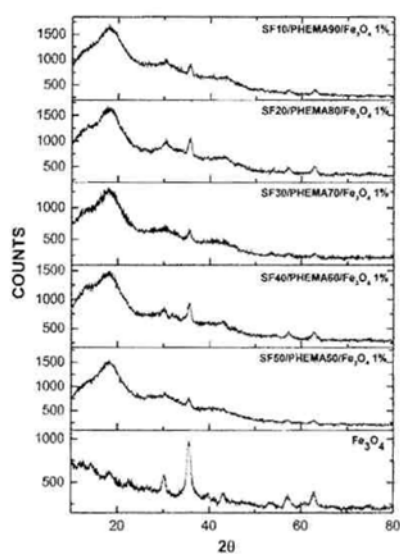


Fig. 9

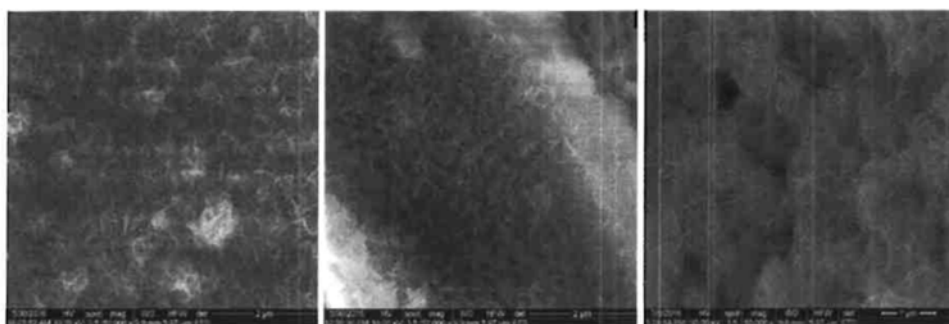


Fig. 10

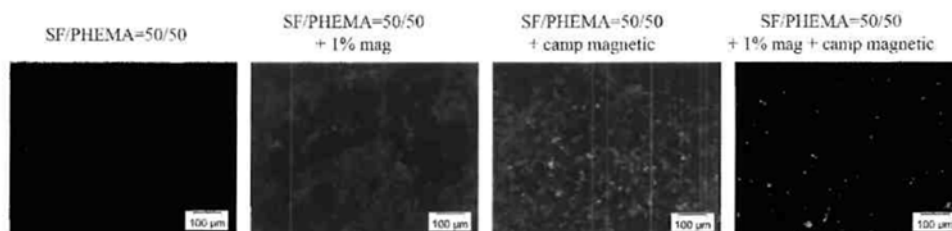


Fig. 11