



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00091**

(22) Data de depozit: **21/02/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2021 BOPI nr. **8/2021**

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

(72) Inventatori:
• **BUSUIOC CRISTINA, STR.PREVEDERII
NR.15, BL.A12, SC.C, ET.6, AP.114,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **OLĂREȚ ELENA, STR.CLOȘCA, NR.5,
BL.PS11B, SC.1, ET.2, AP.8, GALAȚI, GL,
RO;**
• **STANCU IZABELA CRISTINA,
CALEA GRIVIȚEI, NR.232, BL.2, SC.F, ET.1,
AP.167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JINGA SORIN - ION,
STR.INTRAREA HORBOTEI, NR.2A,
BL.M11, SC.A, ET.6, AP.33, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA DE STRUCTURI
POROASE PE BAZĂ DE FOSFAȚI DE CALCIU ȘI TITANAT
DE BARIU PRIN UTILIZAREA REȚELELOR DE FIBRE
ELECTROFILATE CA ȘABLON**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor structuri poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu, cu aplicabilitate clinică în domeniul ingineriei țesutului dur. Procedeu, conform invenție, constă în etapele de: sinteză a șablonului polimeric din rețele de fibre de gelatină prin electrofilare, încărcarea rețelelor de fibre electrofilate cu fosfați de calciu sub ultrasunare prin 1-3 cicluri de depunere, atașarea de nanoparticule de titanat de bariu, subultrasunare, cu liofilizare pentru

a rezulta materiale compozite spongioase, tratamentul termic al compozitelor, în aer, la temperaturi de 800, 1000, respectiv, 1200°C, cu palier la temperatură maximă de 2 h, rezultând corpuri tridimensionale poroase cu proprietăți structurale, morfologice și biologice adecvate implanturilor osoase.

Revendicări: 1



DESCRIEREA INVENȚIEI

Titlu:

Procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu prin utilizarea rețelelor de fibre electrofilate ca șablon

Elaborat de:

Cristina Busuioc, Elena Olăreț, Izabela-Cristina Stancu, Sorin-Ion Jinga

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu prin utilizarea rețelelor de fibre electrofilate ca șablon.

Domeniul ingineriei tisulare s-a dezvoltat considerabil în ultimii ani, în special datorită explorării biomaterialelor compozite, care asigură performanțe superioare în comparație cu constituenții unitari (*R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, Principles of Tissue Engineering, Academic Press, 2014*). Astfel, pentru a contrabalansa dezavantajele asociate anumitor materiale cu potențial în fabricarea de dispozitive medicale moderne, acestea au fost combinate cu una sau mai multe faze, împreună generând entități cu proprietăți îmbunătățite (*A. Tiwari, M.R. Alenezi, S.C. Jun, Advanced Composite Materials, Scrivener Publishing, 2016*) sau sisteme multifuncționale (*I. Kurzina, A. Godymchuk, Multifunctional Materials: Development and Application, Trans Tech Publications, 2016*).

În acest context, familiile ceramice și polimerice par a constitui surse inepuizabile de idei pentru proiectarea și dezvoltarea de implanturi dedicate substituției sau reconstrucției osoase (*I.V. Antoniac, Handbook of Bioceramics and Biocomposites, Springer, 2016*). Plecând de la compoziția osului natural, bazată pe faze minerale cu conținut preponderent de calciu și fosfor, precum și de la microstructura spongioasă specifică ce asigură atât greutate redusă, cât și rezistență mecanică adecvată (*R. Florencio-Silva, G. Rodrigues da Silva Sasso, E. Sasso-Cerri, M. Jesus Simoes, P.S. Cerri, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors that Influence Bone Cells, BioMed Research International 2015 (2015) 421746*), a fost propusă o multitudine de asocieri între diferite tipuri de fosfați de calciu și polimeri naturali (*J. Li, B.A. Baker, X. Mou, N. Ren, J. Qiu, R.I. Boughton, H. Liu,*

Biopolymer/CalciumPhosphateScaffolds for Bone Tissue Engineering, AdvancedHealthcareMaterials 3 (2014) 469-484) sau polimeri sintetici bioresorbabili (S.I. Jinga, A.I. Zamfirescu, G. Voicu, M. Enculescu, A. Evangelidis, C. Busuioc, *PCL-ZnO/TiO₂/HApElectrospunCompositeFibreswithApplications in Tissue Engineering, Polymers 11 (2019) 1793*).

În continuare, pentru a copia cât mai fidel cu putință aspectul poros al țesutului dur natural, s-a apelat la o gamă largă de substanțe generatoare de gaz (S.I. Jinga, I. Constantinoiu, V.A. Surdu, F. Iordache, C. Busuioc, *Sol-Gel-Derived Mineral Scaffolds within SiO₂-P₂O₅-CaO-MgO-ZnO-CaF₂ System, Journal of Sol-Gel Science and Technology 90 (2019) 411-421*; E.P. Erasmus, R. Sule, O.T. Johnson, J. Massera, I. Sigalas, *In Vitro Evaluation of Porous Borosilicate, Borophosphate and Phosphate Bioactive Glasses Scaffolds Fabricated Using Foaming Agent for Bone Regeneration, Scientific Reports 8 (2018) 3699*), tehnici dedicate producerii de goluri (J. An, J.E.M. Teoh, R. Suntornnond, C.K. Chua, *Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues, Engineering 1 (2015) 261-268*; I. Jun, H.S. Han, J.R. Edwards, H. Jeon, *Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication, International Journal of Molecular Sciences 19 (2018) 745*) sau variate modele de șabloane (A.D. Draghici, C. Busuioc, A. Mocanu, A.I. Nicoara, F. Iordache, S.I. Jinga, *Composite Scaffolds Based on Calcium Phosphates and Barium Titanate Obtained through Bacterial Cellulose Templated Synthesis, Materials Science and Engineering C 110 (2020) 110704*; C. Busuioc, C.D. Ghitulica, A. Stoica, M. Stroescu, G. Voicu, V. Ionita, L. Averous, S.I. Jinga, *Calcium Phosphates Grown on Bacterial Cellulose Template, Ceramics International 44 (2018) 9433-9441*; C. Busuioc, M. Stroescu, A. Stoica-Guzun, G. Voicu, S.I. Jinga, *Fabrication of 3D Calcium Phosphates Based Scaffolds Using Bacterial Cellulose as Template, Ceramics International 42 (2016) 15449-15458*) care să permită obținerea unor materiale tridimensionale poroase; dimensiunea, forma, distribuția și interconectarea porilor trebuie să favorizeze procesele naturale de la interfața implant - țesut viu (Q.L. Loh, C. Choong, *Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size, Tissue Engineering B 19 (2013) 485-502*).

După rezolvarea aspectelor de bază în ceea ce privește optimizarea componenței și a aspectului, atenția s-a îndreptat către dezvoltarea de biomateriale inteligente, care fac posibilă stimularea externă a micromediului fiziologic, astfel încât acesta să ofere condiții benefice pentru metabolismul celular. În acest sens, diferite categorii de materiale cu proprietăți electrice sau magnetice au fost integrate în sistemele care și-au demonstrat deja eficiența în domeniul ingineriei țesutului dur (*Y. Tang, C. Wu, Z. Wu, L. Hu, W. Zhang, K. Zhao, Fabrication and in Vitro Biological Properties of Piezoelectric Bioceramics for Bone Regeneration, Scientific Reports 7 (2017) 43360; S.G. Bahoosh, S. Trimper, J.M. Wesselinowa, Origin of Ferromagnetism in BaTiO₃ Nanoparticles, Physica Status Solidi 5 (2011) 382-384*).

Printre marea varietate de tehnici dedicate producerii de structuri tridimensionale poroase, electrofilarea este cea mai abordată datorită simplității ei, dar și a faptului că generează materiale cu raport mare suprafață/volum și microstructură adecvată implanturilor osoase; pe scurt, materiale ce răspund cerinței de biomimetism (*R. Khajavi, M. Abbasipour, A. Bahador, Electrospun Biodegradable Nanofibers Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Journal of Applied Polymer Science 133 (2016) 42883*).

Biopolimerii au intrat în lumina reflectoarelor în ultima perioadă datorită biodegradabilității, biocompatibilității și a costului scăzut, ei făcând posibilă obținerea de sisteme avansate pentru diferite sectoare ale ingineriei tisulare, de la eliberarea de molecule bioactive, până la proprietăți mecanice îmbunătățite (*M. Niaounakis, Biopolymers: Applications and Trends, Elsevier, 2015*). În acest context, gelatina reprezintă o proteină de origine naturală, derivată prin hidroliza collagenului, și poate fi ușor procesată în vederea dezvoltării de dispozitive cu aplicații medicale (*A. Selaru, D.M. Dragusin, E. Olaret, A. Serafim, D. Steinmuller-Nethl, E. Vasile, H. Iovu, I.C. Stancu, M. Costache, S. Dinescu, Fabrication and Biocompatibility Evaluation of Nanodiamonds-Gelatin Electrospun Materials Designed for Prospective Tissue Regeneration Applications, Materials 12 (2019) 2933; A. Serafim, S. Cecoltan, A. Lungu, E. Vasile, H. Iovu, I.C. Stancu, Electrospun Fish Gelatin Fibrous Scaffolds with Improved Bio-Interactions Due to Carboxylated Nanodiamond Loading, RSC Advances 5 (2015) 95467-95477; M.C. Echave, L. Saenz del Burgo, J.L. Pedraz, G. Orive, Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering, Current Pharmaceutical Design 23 (2017) 3567-3584*).

Pe de altă parte, fosfații de calciu prezintă mare interes datorită bioactivității și biocompatibilității lor, fiind principalii constituenți anorganici ai țesuturilor dure și, totodată, exploatați în toate formele posibile, de la particule și fibre, până la acoperiri și corpuri masive poroase sau dense (*F. Ridi, I. Meazzini, B. Castroflorio, M. Bonini, D. Berti, P. Baglioni, Functional Calcium Phosphate Composites in Nanomedicine, Advances in Colloid and Interface Science 244 (2017) 281-295*). În această mare familie, cei mai cunoscuți reprezentanți sunt: hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), fosfatul dicalcic dihidrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfatul octacalcic ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), fosfatul dicalcic (CaHPO_4), fosfatul tricalcic ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfatul tetracalcic ($\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$) și pirofosfatul de calciu ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (*A.R. Boccaccini, P.X. Ma, Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 2014*).

Trecând la posibilitatea stimulării locale în zona afectată, acest lucru poate fi realizat prin utilizarea unor materiale piezoelectrice, feroelectrice sau feromagnetice, care distribuite în mod controlat și activate prin aplicarea unor câmpuri electrice sau magnetice externe, vor îmbunătăți viteza și calitatea regenerării țesutului prin modificarea rutelor biologice parcurse de celule (*V. Buscaglia, C.A. Randall, Size and Scaling Effects in Barium Titanate. An Overview, Journal of the European Ceramic Society (2020) https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.01.021*). Un astfel de exemplu este titanatul de bariu, o ceramică cu o varietate de structuri cristaline și tranziții polimorfe, ceea ce îi conferă o serie de caracteristici unice, extrem de compatibile cu multiple domenii ale tehnologiei (*C. Busuioc, G. Voicu, S.I. Jinga, V. Mitran, A. Cimpean, The Influence of Barium Titanate on the Biological Properties of Collagen-Hydroxyapatite Composite Scaffolds, Materials Letters 253 (2019) 317-322; A.V. Zanfîr, G. Voicu, C. Busuioc, S.I. Jinga, M.G. Albu, F. Iordache, New Coll-HA/BT Composite Materials for Hard Tissue Engineering, Materials Science and Engineering C 62 (2016) 795-805; A.V. Zanfîr, G. Voicu, S.I. Jinga, E. Vasile, V. Ionita, Low-Temperature Synthesis of BaTiO_3 Nanopowders, Ceramics International 42 (2016) 1672-1678*).

Concluzionând, microstructura unui substitut de os trebuie să răspundă cerințelor legate de proporții și modul de asamblare a macroporilor pentru a permite penetrarea celulelor, precum și celor asociate proprietăților mecanice specifice unui ansamblu semirigid ce asigură integritatea locală a țesutului. Ca urmare, prezenta invenție propune un nou procedeu de

obținere a unor structuri tridimensionale poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu, aceasta fiind prima tentativă de acest gen din domeniu. Prezentul procedeu se bazează pe utilizarea unor rețele de fibre electrofilate ca șablon și agent porogen concomitent, care sunt încărcate/decorate cu faze minerale prin sinteză chimică în soluție sau atașare din suspensie și ulterior sunt eliminate din sistem prin tratament termic.

Prima etapă constă în sinteza rețelelor de fibre de gelatină. Acestea au fost obținute prin tehnica electrofilării dintr-o soluție apoasă de gelatină de pește 70 %, parametrii de procesare fiind următorii: debit de alimentare 7 $\mu\text{L}/\text{min}$, tensiune aplicată 21 kV, viteză de deplasare a acului 5 mm/s, respectiv viteză de rotație a colectorului 70 rpm. Pentru stabilizarea rețelelor de fibre față de mediile apoase, acestea au fost supuse unui proces de reticulare prin imersare în soluție etanolică de glutardehidă 0,5 % timp de 4 zile, după care au fost spălate în etanol timp de 3 zile și apoi în apă distilată timp de 2 zile.

În cea de-a doua etapă, șabloanele cu structură tridimensională fibroasă (Figura 1) au fost încărcate cu fosfați de calciu, rezultând un compozit hibrid alcătuit dintr-o rețea de fibre polimerice distribuite aleator și acoperite cu un strat de fosfați de calciu având diferite compoziții, cel mai probabil o combinație între brușită ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ca fază majoritară și hidroxiapatită ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ca fază minoritară. Un ciclu de depunere a presupus încărcarea fazelor minerale pe șablon printr-o reacție chimică în mediu lichid. Mai întâi, rețelele de fibre electrofilate au fost imersate în 100 mL soluție apoasă de clorură de calciu (CaCl_2) 0,5 M, cu pH-ul ajustat la 10-11 cu o soluție de hidroxid de amoniu (NH_4OH), și menținute sub ultrasunare timp de 15 min. Apoi, rețelele au fost imersate în 100 mL soluție apoasă de fosfat dibazic de sodiu (Na_2HPO_4) 0,5 M timp de încă 15 min, sub ultrasunare. Această sinteză în doi pași reprezintă un ciclu de depunere; pentru realizarea mai multor cicluri, au fost repetate în aceeași ordine procedurile de imersare în soluțiile cu conținut de Ca^{2+} , respectiv PO_4^{3-} . Analizele au indicat existența de fosfați de calciu cu morfologie fină, afânată, sub formă de ace sau folii subțiri, ambele tipuri de entități fiind dispuse radial în raport cu axa principală a fibrelor. În funcție de numărul de cicluri de depunere aplicate, gradul de încărcare cu materiale fosfatice poate fi controlat, astfel încât stratul de acoperire a fibrelor să atingă grosimea dorită (Figura 2).

Cea de-a treia etapă a presupus decorarea compozitelor hibride obținute în etapa anterioară cu nanoparticule de titanat de bariu sintetizate prin combinarea metodei sol-gel cu

un tratament hidrotermal. Astfel, gelul uscat, format în urma proceselor de hidroliză și policondensare, a fost autoclavizat la 120 °C timp de 24 h, rezultând o pulbere alcătuită din particule cvasisferice, cu diametrul sub 20 nm și structură cristalină tetragonală. Rețelele de fibre electrofilate au fost imersate în 100 mL suspensie apoasă conținând 1 g de nanoparticule de titanat de bariu și menținute sub ultrasonare timp de 15 min. Probele rezultate au fost liofilizate (proces de înghețare-uscarea în condiții standard) pentru a conserva structura tridimensională poroasă a șablonului și a obține materiale compozite spongioase. Analizele au confirmat atașarea fizică aleatoare a nanoparticulelor de titanat de bariu la rețeaua de fibre electrofilate încărcată cu fosfați de calciu, acestea prezentându-se ca agregate cu diferite mărimi și forme (Figura 3)

Avantajele prezentului procedeu constau în: omogenitatea ridicată a depunerii de fosfați de calciu datorită contactului la nivel ionic dintre reactanți în mediul lichid de sinteză; utilizarea unor nanoparticule de titanat de bariu cu simetrie cristalină tetragonală, care ar putea răspunde unor stimuli electrici sau/și magnetici externi, astfel încât micromediul fiziologic să devină mai atractiv pentru celule; aplicarea ultrasunetelor pentru a favoriza penetrarea soluțiilor, respectiv a suspensiei precursorare în volumul rețelelor de fibre electrofilate și a garanta obținerea unui material omogen.

În ultima etapă a procedurii, compozitele descrise anterior (rețele de fibre electrofilate-strat de fosfați de calciu - nanoparticule de titanat de bariu) au fost tratate termic în aer, în diferite condiții experimentale, cu scopul de a îndepărta prin ardere șablonul polimeric, a favoriza cristalizarea fosfaților de calciu și a genera structuri anorganice poroase cu variate morfologii. Totodată, a fost vizată atingerea unei rezistențe mecanice potrivite aplicațiilor de tip substitut de os. În Tabelul 1 sunt cuprinse câteva exemple de valori ale parametrilor de tratament termic pentru obținerea de structuri tridimensionale poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu prin procedeul ce face obiectul prezentei invenții.

În continuare, sunt redate câteva exemple de realizare a invenției, mai exact caracteristicile morfologice ale entităților poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu rezultate (Figurile 4, 5 și 6). Analizând imaginile de microscopie electronică, poate fi evaluată influența temperaturii de tratament termic asupra microstructurii, mai exact proporția porozității, dimensiunea, geometria și distribuția porilor, precum și mărimea, forma și interconectarea granulelor.

Corpurile investigate sunt alcătuite din granule rotunjite sau alungite, care se unesc pentru a forma un schelet tridimensional, suprapus peste o rețea de pori ramificați interconectați, și a asigura rezistența necesară în aplicații ce presupun sarcini mecanice frecvente. Creșterea temperaturii de tratament termic favorizează difuzia materialului, conducând la scăderea porozității, apariția de granule mai mari și punți de legătură între acestea mai extinse, ceea ce este echivalent cu un material mai densificat, cu legături mai puternice între componente și efecte benefice asupra proprietăților mecanice. Pe de altă parte, mărirea numărului de cicluri de depunere chimică determină, după cum era de așteptat, obținerea unui material cu un conținut mai redus de pori, însă cu rezistență mecanică semnificativ mai mare. Nu în ultimul rând, integrarea nanoparticulelor de titanat de bariu pare a modifica termodinamica procesului, în sensul evidențierii unei dispunerii speciale în spațiu a granulelor și a unui caracter spongios; acest aspect poate potența răspunsul biologic prin cel puțin două modalități: pe de o parte pune la dispoziția celulelor o interfață extinsă, iar pe de altă parte poate fi realizată o stimulare externă prin mijloace de natură electrică sau/și magnetică.

Tabelul 1. Parametrii de tratament termic pentru obținerea de structuri poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu prin procedeul ce utilizează șablon.

Viteză de încălzire	20 - 300 °C → 60 °C/h 300 - 600 °C → 120 °C/h 600 - 800/1000/1200 °C → 600 °C/h
Temperatură maximă	800 °C 1000 °C 1200 °C
Palier la temperatura maximă	2 h

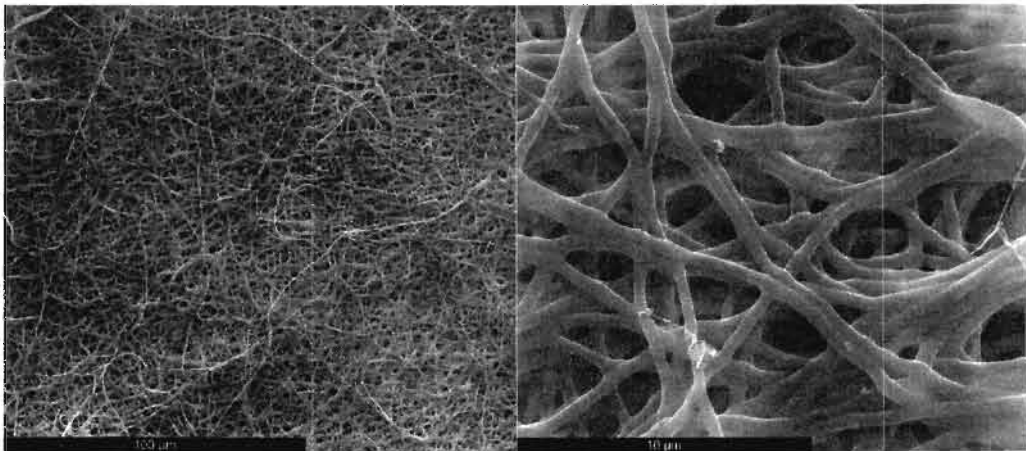


Figura 1. Imagini de microscopie electronică la diferite mărimi alerețelei de fibre electrofilate folosite ca șablon pentru obținerea de structuri minerale poroase.

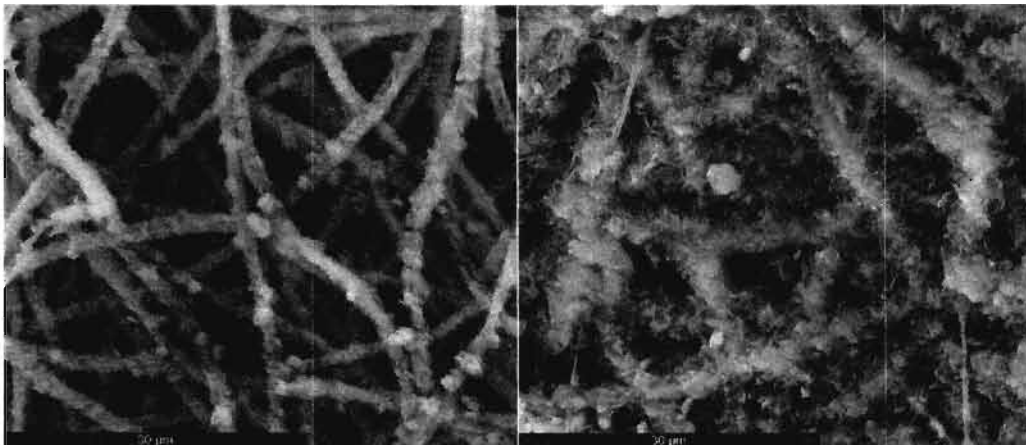


Figura 2. Imagini de microscopie electronică ale rețelelor de fibre electrofilate încărcate cu fosfați de calciu: un ciclu (stânga) și trei cicluri (dreapta).

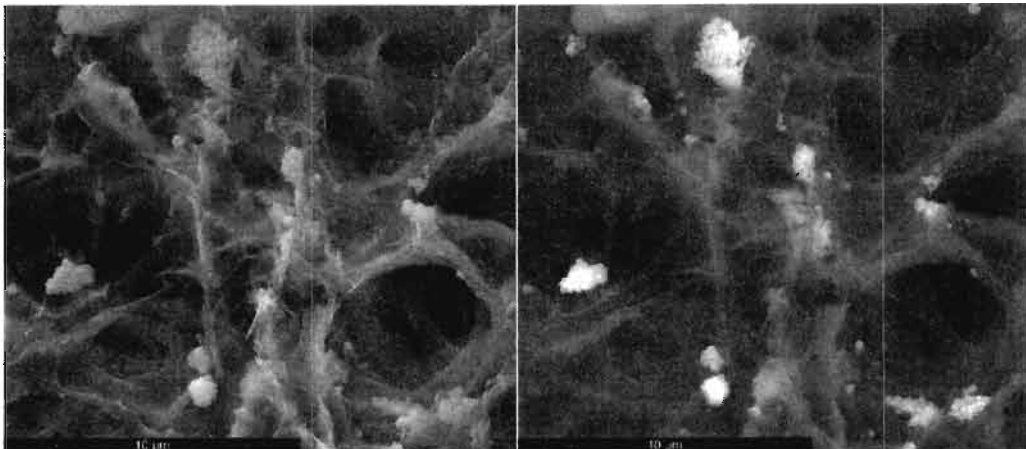


Figura 3. Imagini de microscopie electronică ale rețelelor de fibre electrofilate încărcate cu fosfați de calciu și titanat de bariu: imagine pe baza de electroni secundari (stânga) și imagine pe bază de electroni retroîmprăștiați (dreapta).

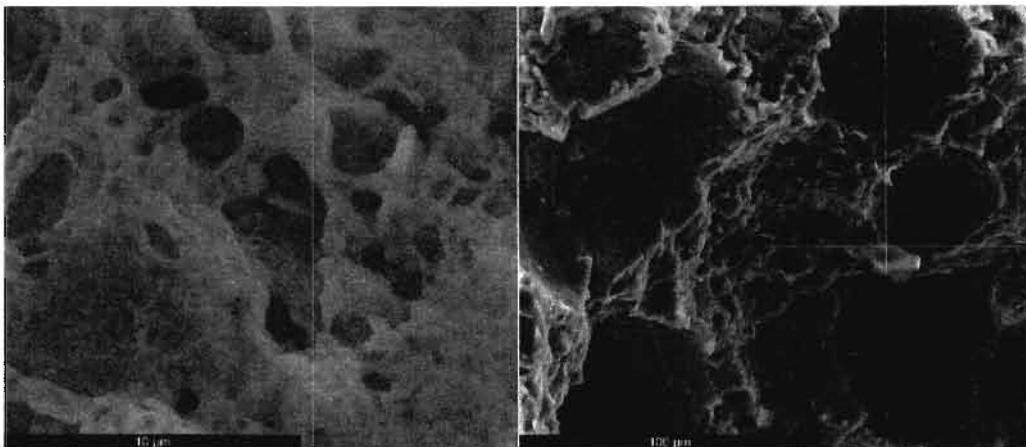


Figura 4. Imagini de microscopie electronică ale structurilor poroase pe bază de fosfați de calciu obținute prin aplicarea a unui ciclu și a unui tratament termic la: 800 °C (stânga) și 1000 °C (dreapta).

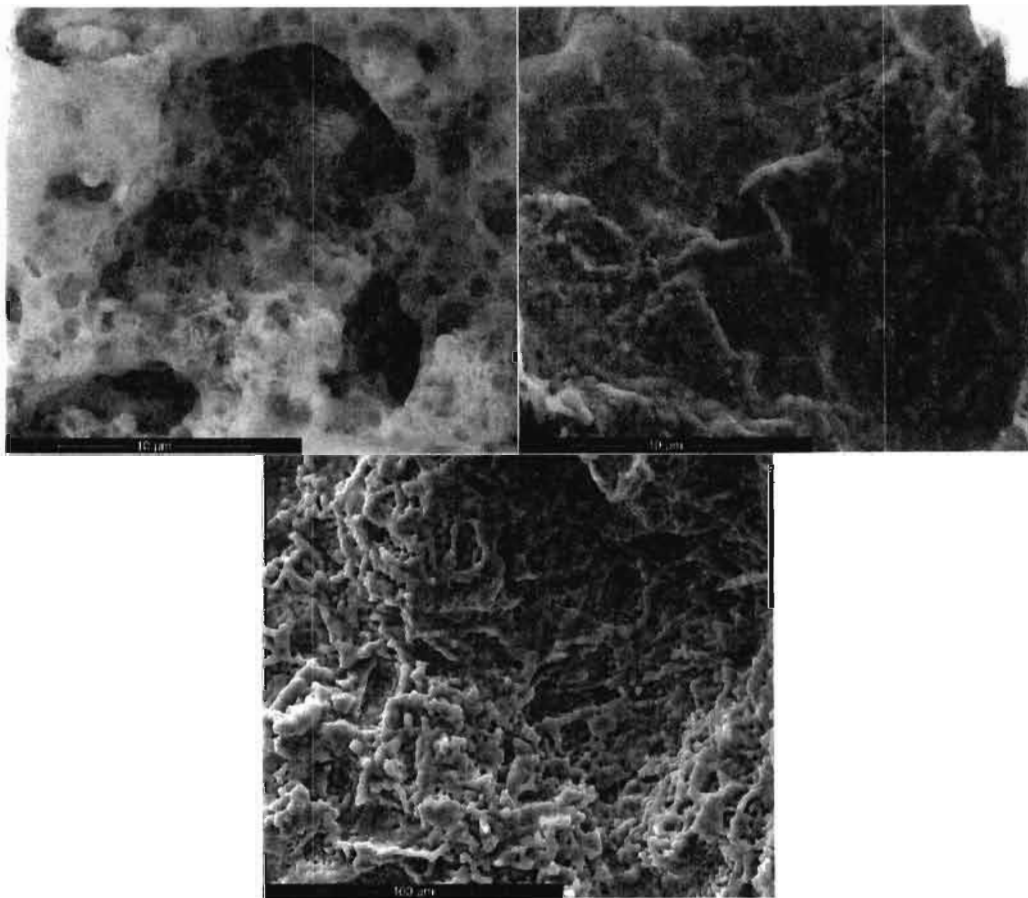


Figura 5. Imagini de microscopie electronică ale structurilor poroase pe bază de fosfați de calciu obținute prin aplicarea a trei cicluri și a unui tratament termic la: 800 °C (stânga sus), 1000 °C (dreapta sus) și 1200 °C (mijloc jos).

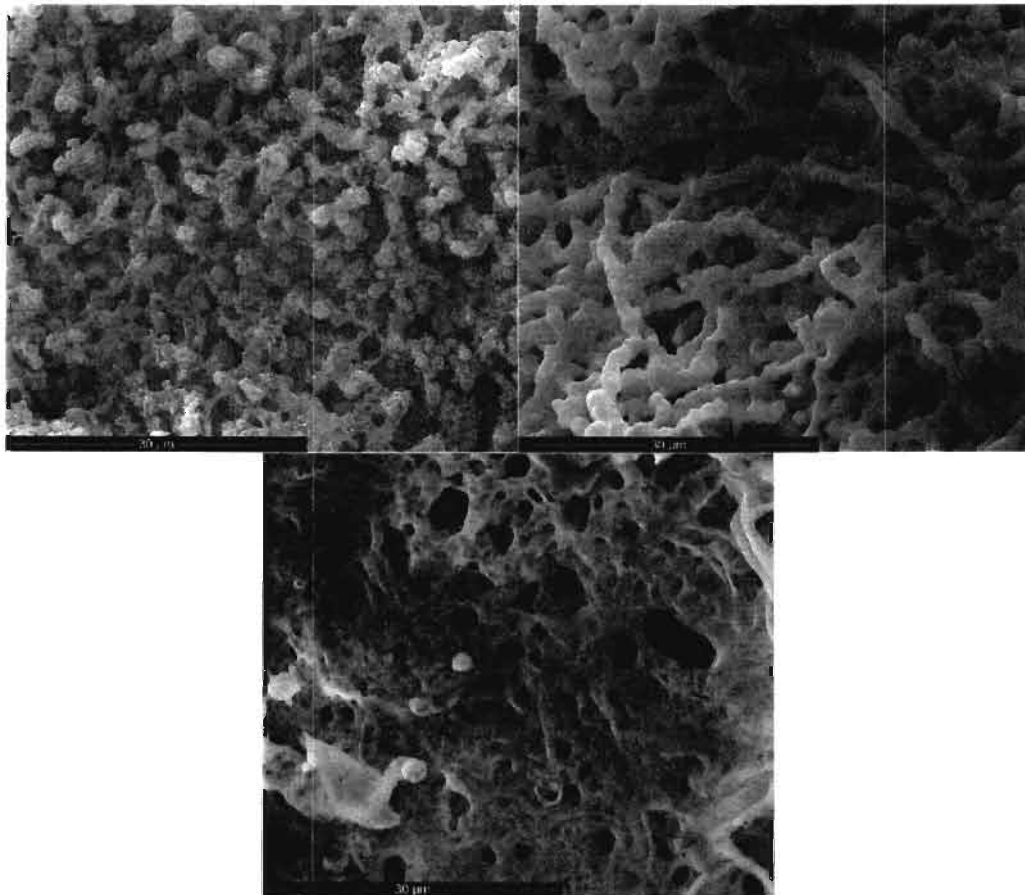


Figura 6. Imagini de microscopie electronică ale structurilor poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu obținute prin aplicarea a trei cicluri și a unui tratament termic la: 800 °C (stânga sus), 1000 °C (dreapta sus) și 1200 °C (mijloc jos).

REVENDICĂRILE

Procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de fosfați de calciu și titanat de bariu, utilizate ca implanturi compozite anorganice în scopul reparării sau regenerării țesutului osos, care constă în: sinteza șablonului polimeric (rețele de fibre de gelatină) prin electrofilare; încărcarea rețelilor de fibre electrofilate cu fosfați de calciu prin imersare în soluție de clorură de calciu (CaCl_2) și ulterior în soluție de fosfat dibazic de sodiu (Na_2HPO_4), întregul proces desfășurându-se subultrasonare; atașarea de nanoparticule de titanat de bariu la rețelele de fibre electrofilate încărcate cu fosfați de calciu prin imersare în suspensia corespunzătoare, sub ultrasonare; tratamentul termic al compozitelor hibride rezultate în diferite condiții experimentale în vederea obținerii de corpuri tridimensionale poroase. Procedul este caracterizat prin aceea că utilizează materiale ieftine și larg disponibile, apelează la tehnici simple și accesibile, pe când proprietățile structurale, morfologice și biologice ale structurilor finale pot fi adaptate particularităților clinice ale fiecărui pacient, cu reducerea semnificativă a perioadei de vindecare și îmbunătățirea calității vieții în timpul recuperării.