



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00102

(22) Data de depozit: 23/02/2017

(41) Data publicării cererii:  
30/08/2018 BOPI nr. 8/2018

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
METALE NEFEROASE ȘI RARE - IMNR,  
BD.BIRUIŢEI NR.102, PANTELIMON, IF,  
RO;  
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN  
BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SITEX 45 S.R.L., STR.GHICA TEI NR.114,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• POPESCU LAURA MĂDĂLINA,  
STR.DELINEȘTI NR.4, BL.T D 45, AP.14,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• PITICESCU ROXANA MIOARA,  
ȘOS.NICOLAE TITULESCU NR.155, BL.21,  
SC.C, ET.2, AP.90, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOTOC ADRIAN MIHAIL, STR. PAȘCANI  
NR.9, BL.TD35, SC.A, ET.10, AP.64,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• VOINEA LILIANA MARY,  
BD.IULIU MANIU, NR.57, BL.OD 16, SC.C,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• GRĂDINARU (ISTRATE) SÂNZIANA  
LUMINIȚA, STR.BUZOENI, NR.9, BL.M 43,  
AP.57, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ULIERU DUMITRU, BD.GHICA TEI  
NR.114, BL.40, AP.2, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• TOPOR ALEXANDRU, STR. UNIRII,  
BL.18C, AP.23, BUZĂU, BZ, RO

(54) STRUCTURI TRIDIMENSIONALE PE BAZĂ  
DE HIDROXIAPATITĂ ȘI POLIURETAN-DIOL, OBȚINUTE  
PRIN TEHNICA 3D PRINTING

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor structuri tridimensionale pe bază de hidroxiapatită și poliuretan-diol prin tehnica 3D printing, utilizate la fabricarea implanturilor oculare cu porozitate interconectată. Procedeu conform invenției constă în aceea că pulberile hibride nanostructurate pe bază de hidroxiapatită și poliuretan-diol se sintetizează *in situ* hidrotermal la presiunea de 1000...2000 bar și temperatura de 80...100°C, într-un raport în greutate hidroxiapatită:

poliuretan-diol de 4:1, cu dimensiunea particulelor de 0,5...8 μm, după care pulberea se amestecă mecanic cu lianți uzuali, pentru a rezulta o pastă utilizată pentru depunerea pe un suport cu un echipament 3D, sub formă de cub cu latura de 2...2,5 cm.

Revendicări: 1  
Figuri: 3



## STRUCTURI TRIDIMENSIONALE PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ ȘI POLIURETAN-DIOL OBȚINUTE PRIN TEHNICA 3D PRINTING

Invenția se referă la obținerea unor structuri tridimensionale pe bază de hidroxiapatită și poliuretan-diol prin tehnica 3D printing, care pot fi utilizate la fabricarea implanturilor oculare cu porozitate interconectată.

O cerere de brevet din Mexic se referă la un implant ocular intraorbital, care să permită umplerea spațiului lăsat liber prin îndepărtarea globului ocular al unei persoane, prevenind absorbția în țesuturile înconjurătoare și permițând stabilitatea acestei cavități pe termen lung. Implantul ocular inventat nu este poros, facilitând îndepărtarea ulterioară în situațiile în care se cere acest lucru. Implantul este realizat din ciment osos polimerizat, cu dioxid de zirconiu ca material de contrast și colorant E141 pentru o mai bună vizualizare în timpul operației chirurgicale și monitorizare post-chirurgicală timpurie dar și pe termen lung [MX 2016005397 A, 08.06.2016, Spherical intraorbital implant].

Ingenieria țesuturilor este un domeniu interdisciplinar, care își propune să combine cunoștințele cercetătorilor despre celule, biomateriale, și factori biochimici adecvați pentru crearea unei structuri sintetice care să permită creșterea și regenerarea de țesuturi noi [1].

Teoretic, aceasta structură artificială, cunoscută sub numele de *scaffold* ar trebui să fie obținută dintr-un biomaterial adecvat și fabricată astfel încât să imite structura fizică și chimică a țesutului gazdă [2, 3].

Osul spongios are o structură poroasă atât în volum cât și la suprafață, cu pori interconectați care permit migrarea celulelor, vascularizarea și creșterea țesutului nou [4-6]. În linii mari, metodele de fabricare a structurilor de tip *scaffold* pot fi grupate în tehnici convenționale (de ex. foaming, salt leaching și emulsification) [7] și tehnici de tip Additive Layer Manufacturing (ALM) sau Fabricație aditivă.

Principalul dezavantaj al metodelor convenționale este faptul că acestea nu permit producerea scaffoldurilor poroase cu un control complet al parametrilor geometrici, cum ar fi dimensiunea porilor, obținerea porilor interconectați, dimensiunea și porozitatea materialului [7].

În ultimii zece ani, metodele ALM au stârnit o atenție considerabilă din partea cercetătorilor, deoarece permit utilizatorilor construirea materialelor 3D cu diferite niveluri de complexitate, ceea ce este deosebit de avantajos atunci când se încearcă mimarea structurii fizice a osului.

Pentru a putea fi utilizat la fabricarea scaffoldurilor pentru aplicații medicale, materialul ales trebuie să îndeplinească următoarele condiții: 1) să fie biocompatibil; 2) să aibă o suprafață adecvată din punct de vedere chimic pentru atașarea, proliferarea și diferențierea celulelor; 3) să fie tridimensional și suficient de poros, cu o rețea de pori interconectați care să permită creșterea celulelor, un flux de transport al substanțelor nutritive și deșeurilor metabolice; 4) să aibă proprietăți mecanice care să corespundă cu cele ale țesutului în care va fi implantat [7]. Pe lângă aceste condiții, parametrii procesului de fabricare ai materialului pentru structuri 3D trebuie optimizați astfel încât să asigure biocompatibilitate maximă, osteoconductivitate și proprietăți mecanice suficient de bune.

În funcție de principiul de funcționare, sistemele ALM au fost clasificate în trei subgrupe:

(1) sisteme pe bază de laser, (2) sisteme pe bază de imprimare, și (3) sisteme pe bază de extruz/ duze [8, 9].

În prezent, conform standardului ISO/ASTM52900-15, există șapte categorii de procese tip ALM: Binder Jetting, Directed Energy Deposition, Material Extrusion, Material Jetting, Powder Bed Fusion, Sheet Lamination și Vat Photopolymerization.

**[ISO / ASTM52900-15, Standard Terminology for Additive Manufacturing – General Principles–Terminology, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2015, [www.astm.org](http://www.astm.org)]**

Diferite tehnici Rapid Prototyping (RP), cum ar fi selective laser sintering (SLS) [10,11], fused deposition modelling (FDM) [12] și precision extrusion deposition (PED) [13], au fost utilizate pentru fabricarea compozitelor prin combinarea polimerilor ca poli (hidroxibutirat-co-hidroxivalerat), poli(L-lactidă) (PLLA), și policaprolactonă (PCL) cu diferite faze de fosfat de calciu, cum ar fi hidroxiapatită carbonată, hidroxiapatită și  $\beta$ -fosfat tricalcic [14].

Denumită și “*Bioprinting prin extruziune*”, bioprintarea poate fi definită ca o metodă spațială de depunere stratificată a unui material biologic (sau suport pentru materialul biologic), pe baza unui model computerizat, strat-cu-strat, cu ajutorul unui sistem CAD-CAM.

Structura modelului computerizat poate fi modificată și rearanjată odată cu trecerea fiecărui strat, astfel încât să se obțină un model final complex ce imită structura tisulară. Versatilitatea tehnologiei permite adoptarea unui număr nelimitat de combinații de materiale în vederea extruziunii, în acest mod asigurându-se posibilitatea dezvoltării de modele tridimensionale unice, adaptate de la caz la caz. Tehnologia de *bioprinting prin extruziune* este o combinație între un sistem robotic automatizat, controlat de un software și un sistem de distribuție prin extruziune a materialului în structura 3D personalizată. Acest procedeu asigură rapiditate dar și integritate structurală datorată sistemului de depunere continuă computerizat. Modelele 3D

pot fi obținute, generate, importate și exportate de pe orice sistem CAD, inclusiv pe baza datelor obținute din sisteme de imagistică medicală de tip CT-computer tomograf și/sau RMN-Rezonanță Magnetică Nucleară. Spre deosebire de alte procedee de fabricație aditivă, bioprintingul prin extruziune nu necesită cantități mari de energie și este o metodă prietenoasă cu mediul.

Tehnica 3D printing a fost utilizată pentru fabricarea unor structuri 3D de tip scaffold pe bază de hidroxiapatită și diferiți polimeri organici, precum copolimerul poli(L-lactidă-co-glicolidă) (PLGA) [15], alcoolul polivinilic (APV) [3], colagen [16], polimerul comercial PEO/PBT [14]. Combinațiile care necesită utilizarea de solvenți organici ca liant, de exemplu PLGA și  $\beta$ -TCP legat cu cloroform [15], prezintă un dezavantaj intrinsec deoarece există întotdeauna riscul de a găsi reziduuri toxice de solvent în structura 3D [7].

Pentru a obține structuri de fosfat de calciu cât mai rigide și robuste prin 3D printing, s-au utilizat lianți de tipul acid citric, acid fosforic, acid tartaric, însă această metodă s-a dovedit a fi dezavantajoasă pentru ingineria țesuturilor. Zhou și colab [17] au utilizat un amestec de hidroxiapatită cu sulfat de calciu, raport HAp:CaSO<sub>4</sub>= 25:75 (procente de greutate) pentru fabricarea scaffoldurilor prin 3D printing. Într-un studiu recent, J. Inzana și colab [16], au obținut un scaffold din material compozit pe bază de fosfat de calciu și colagen, prin metoda 3D printing la temperaturi joase. În acest scop, s-a utilizat ca liant acid fosforic în proporție de 5-20%, iar Tween 80 a fost adăugat ca surfactant non-citotoxic în proporție de 0.25% în soluția de liant. S-a stabilit concentrația optimă a soluției de liant (8.75%) pentru care citocompatibilitatea și rezistența mecanică sunt maximizate și cantitatea necesară de surfactant (Tween 80) pentru îmbunătățirea printării. De asemenea, colagenul a fost dizolvat în prealabil în soluția de liant pentru a îmbunătăți și mai mult fabricarea compozitelor fosfat de calciu-colagen prin 3D printing. În 2013, A. Nandakumar și colab. [14] au raportat obținerea a două tipuri de scaffold pe bază de compozit polimer-hidroxiapatită prin depunere 3D cu ajutorul unui Bioplotter. S-a utilizat PolyActive™ (PA), un copolimer comercial de poli(etilen-oxid-tereftalat)/poli(butilen-tereftalat) (PEO/PBT).

În prima variantă, s-au extrudat filamente compozite polimer-ceramică cu raportul de masă dorit (maxim 15% HAp). Acestea au fost utilizate ca material pentru fabricarea scaffoldului cu ajutorul Bioplotterului. În cea de-a doua variantă, s-au obținut scaffolduri de polimer prin depunere 3D, în timp ce particulele ceramice au fost fabricate sub formă de coloane prin sinterizarea pastei ceramice cu ajutorul stereolitografiei. Cele două componente au fost apoi asamblate manual prin presarea HAp în porii scaffoldului polimer, creând astfel materialul compozit. Această metodă de depunere 3D cu ajutorul Bioplotterului permite

fabricarea scaffoldurilor cu controlul porozității, dimensiunii porilor, interconectivității și orientării fibrelor între straturile succesive (la 45 sau 90 de grade). Metoda a fost utilizată cu succes pentru fabricarea scaffoldurilor polimerice pentru ingineria țesuturilor (cartilaj și defecte osteocartilaginoase). [14, 18-19]. Deși este o tehnică foarte versatilă, fabricarea scaffoldurilor din compozite polimer-ceramice este dificilă, datorită vâscozității ridicate a pastei polimer-ceramice, care poate duce la înfundarea duzelor. Pe lângă afectarea procesului de fabricare și prelucrabilitate, aceste fenomene limitează cantitatea de ceramică ce poate fi încorporată în scaffold, deși aceasta determină osteoconductivitatea și osteoinductivitatea materialelor compozite.

Recent, a fost brevetat un material ceramic biologic pentru repararea osului fabricat prin metoda 3D printing din  $\beta$ -TCP, hidroxiapatită și acid polilactic (PLA) cu masa moleculară 100.000-120.000, vâscozitatea între 0.79 dL/g-0.84 dL/g, porozitatea structurii tridimensionale fiind 70%-90%, și latura unui pătrat care formează grila între 100 micrometri și 300 micrometri [CN105770988 (A) - **Bone repairing biological ceramic material based on 3D printing and preparation method thereof, 20.07.2016**]. O altă invenție se referă la formula de sinteză a unui material hibrid printabil pe bază de carboximetil chitosan (CMC) și polifosfat (polyP). Cei doi polimeri sunt legați prin intermediul ionilor de calciu. Materialul CMC-PolyP în combinație cu alginatul este biocompatibil, biodegradabil și util pentru 3D printing și 3D cell printing (bioprinting) [WO 2016/012583, **Printable morphogenetic phase-specific chitosan-calcium polyphosphate scaffold for bone repair**].

Spre deosebire de compozițiile prezentate anterior pentru depunerea structurilor de tip *scaffold* prin 3D printing, în care hidroxiapatita și polimerul organic sunt sintetizate separat sau de proveniență comercială, și apoi amestecate cu un liant în vederea obținerii pastei pentru printare prin extruziune, prezenta invenție se referă la obținerea structurilor tridimensionale pornind de la pulberi hibride nanostructurate pe bază de hidroxiapatită și poliuretan-diol sintetizate *in situ* hidrotermal în condiții de presiuni înalte (1000 bari) și temperaturi joase (100°C), uscate cu ajutorul spray dryer-ului.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția se referă la furnizarea unor pulberi hibride nanostructurate pe bază de hidroxiapatită și poliuretan-diol, care prezintă *structură chimică omogenă* (hidroxiapatita aflată în structura hibridă respectă raportul molar Ca:P=1.67 specific HAp din structura minerală a osului) și *morfologie controlată* (particule sferice, care asigură prelucrabilitatea pastelor cu vâscozitate ridicată fără înfundarea duzelor sistemului 3D printing). Avantajele procedurii de sinteză hidrotermală la presiuni înalte și temperaturi joase constau în:

- i) consum scăzut de energie prin aplicarea presiunii foarte mari (energia consumată pentru a crește temperatura cu 5 unități este egală cu cea necesară pentru a crește presiunea cu 4000 de unități în sistem);
- ii) valoarea negativă a  $\Delta V$  ( $\Delta V = \Sigma(V/Z)(j) - \Sigma(V/Z)(i)$ , unde  $i$  = reactant și  $j$  = produs de reacție); deplasarea echilibrului chimic către compușii cu cel mai mic volum.
- iii) îmbunătățirea reactivității chimice;
- iv) sinteza într-o singură etapă a materialelor nanocristaline, fără necesitatea unui tratament termic ulterior;
- v) păstrarea structurii nealterate a polimerului datorită temperaturii joase de reacție (100°C);
- vi) tehnologie pietenoasă cu mediul, ecologică, în autoclavă închisă, fără degajarea unor compuși toxici.

Prezenta invenție se referă la obținerea unor structuri tridimensionale pe bază de hidroxiapatită și poliuretan-diol prin tehnica 3D printing la temperatura camerei, utilizând ca lianți polimeri comerciali solubili în apă. Structurile 3D astfel obținute pot fi utilizate la fabricarea implanturilor oculare cu porozitate interconectată, necesară vascularizării acestora.

Prin aplicarea invenției, se înlătură dezavantajele materialelor utilizate anterior pentru obținerea pastei, prin aceea că materialele propuse sunt constituite din hidroxiapatită și poliuretan-diol într-un raport de greutate de 4:1, iar particulele sunt sferice, având diametrul de 0,5-8  $\mu\text{m}$ . Datorită acestui raport de greutate și polimerilor comerciali utilizați ca lianți, cantitatea totală de hidroxiapatită încorporată în scaffold nu este atât de mare încât să determine înfundarea duzelor. Încorporarea poliuretanului încă din timpul sintezei și uscarea cu ajutorul spray-dryer-ului favorizează extruziunea pastei și formarea unei structuri 3D rigide cu duritatea necesară aplicației medicale (implant ocular fixat cu șuruburi de titan).

Figurile atașate prezintă micrografiile SEM ale unei pulberi hibride pe bază de hidroxiapatită și poliuretan-diol, având raportul de greutate 4:1.

Pentru realizarea structurilor 3D conform invenției, se poate utiliza poliuretan-diol comercial în sinteza hidrotermală a pulberilor hibride. Procesul de sinteză a pulberilor nanostructurate hibride are loc în condiții hidrotermale, la temperaturi cuprinse între 25 și 120°C (de preferință 80...100°C) și presiuni în intervalul 1000-3000 atm (de preferință, 1000-2000 atm). Materialul hibrid astfel obținut se usucă în spray-dryer la temperaturi cuprinse între 100 și 300°C (de preferință, 100-150°C). Pulberea rezultată se amestecă mecanic cu lianți comerciali (Mowiflex și Baymedix FD 103), în proporții bine definite pentru obținerea unei paste ce poate fi utilizată ulterior pentru depunere 3D printing prin extruziune cu ajutorul sistemului BioScaffolder.

Se prezintă, în continuare, două exemple nelimitative de realizare a invenției, fără ca acestea să limiteze utilizarea acestui procedeu în domeniul tehnic propus:

**Exemplul 1.** Se amestecă 5 g pulbere hibridă nanostructurată pe bază de hidroxiapatită, HAp și poliuretan diol, PU (având raportul de greutate HAp:PU=4:1) cu 8.8 ml Mowiflex, soluție 20% și 0.5 ml Baymedix FD 103, soluție 57%. Se depune pe un suport de plexiglass, cu ajutorul sistemului 3D BioScaffolder, un cub cu latura de 2 cm, utilizând o duză cu diametrul 0.4 mm, lungimea duzei 31 mm și grosime strat 80% din diametrul duzei. Unghiul de rotație între două straturi succesive este de 90°C și distanța între firele extrudate este de 1.3 mm. Viteza de deplasare a capului de depunere este de 400 mm/min.

**Exemplul 2.** Se amestecă 5 g pulbere hibridă nanostructurată pe bază de hidroxiapatită, HAp și poliuretan diol, PU (având raportul de greutate HAp:PU=4:1) cu 8.8 ml Mowiflex, soluție 20%. Se depune pe un suport de plexiglass, cu ajutorul sistemului 3D BioScaffolder, un cub cu latura de 2.5 cm, utilizând o duză cu diametrul 0.8 mm, lungimea duzei 31 mm și grosime strat 80% din diametrul duzei. Unghiul de rotație între două straturi succesive este de 90°C și distanța între firele extrudate este de 1.3 mm. Viteza de deplasare a capului de depunere este de 400 mm/min.



**Bibliografie**

1. J.D. Sipe, *Reparative medicine: growing tissues and organs*, 961 (2002) 1–9.
2. Q. Chen, A. Boccaccini, H. Zhang, D. Wang, M. Edirisinghe, *J. Am. Ceram. Soc.* 89 (2006) 1534–1539.
3. S. C. Cox, J. A. Thornby, G. J. Gibbons, M. A. Williams, K. K. Mallick, *Materials Science and Engineering C* 47 (2015) 237–247.
4. R.Z. Legeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, J.P. Legeros, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2003) 201–209.
5. A.G. Mikos, G. Sarakinos, M.D. Lyman, D.E. Ingber, J.P. Vacanti, R. Langer, *Biotechnol. Bioeng.* 42 (1993) 716–723.
6. D.J. Mooney, D.F. Baldwin, N.P. Suh, J.P. Vacanti, R. Langer, *Biomaterials* 17 (1996) 1417–1422.
7. A. Butscher, M. Bohner, S. Hofmann, L. Gauckler, R. Müller, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 907–920.
8. S.J. Hollister, *Nat. Mater.* 4 (2005) 518–524.
9. S.M. Giannitelli, P. Mozetic, M. Trombetta, A. Rainer, *Acta Biomaterialia* 24 (2015) 1–11.
10. [Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW. *Acta Biomater* 2010;6:4495–505.
11. Tan KH, Chua CK, Leong KF, Cheah CM, Cheang P, Abu Bakar MS, et al. *Biomaterials* 2003;24:3115–23.
12. Yefang Z, Hutmacher DW, Varawan SL, Meng LT. *Int J Oral Max Surg* 2007;36:137–45.
13. Shor L, Gucer S, Wen XJ, Gandhi M, Sun W. *Biomaterials* 2007;28:5291–7.
14. A. Nandakumar, C. Cruz, A. Mentink, Z. T. Birgani, L. Moroni, C. van Blitterswijk, P. Habibovic, *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 5708–5717.
15. T.D. Roy, J.L. Simon, J.L. Ricci, E.D. Rekow, V.P. Thompson, J.R. Parsons, *J. Biomed. Mater. Res. A* 66A (2003) 283–291.
16. J.A. Inzana, D. Olvera, S. M. Fuller, J. P. Kelly, O. A. Graeve, E.M. Schwarz, S. L. Kates, H. A. Awad, *Biomaterials* 35 (2014) 4026–4034.
17. Z. Zhou, F. Buchanan, C. Mitchell, N. Dunne, *Materials Science and Engineering C* 38 (2014) 1–10.
18. Woodfield TBF, Malda J, de Wijn J, Peters F, Riesle J, van Blitterswijk CA. *Biomaterials* 2004;25:4149–61.
19. Moroni L, Hamann D, Paoluzzi L, Pieper J, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. *PLoS One* 2008;3:e3032.

**Revendicări**

1. Structuri 3D realizate prin metoda 3D printing, **caracterizate prin aceea că** sunt obținute din: pulbere hibridă pe bază de hidroxiapatită și poliuretan diol, sintetizată prin procedeul hidrotermal la presiunea  $p = 1000$  bari și temperatura  $t = 100$  °C, într-un raport de greutate de 4:1, sub formă de particule sferice, având diametrul de 0,5-8  $\mu\text{m}$ ; Mowiflex soluție 20% și Baymedix FD 103 soluție 57%, cu echipamentul 3D BioScaffolder, la temperatura camerei, având forma unui cub cu latura de 2 cm.

## Figuri

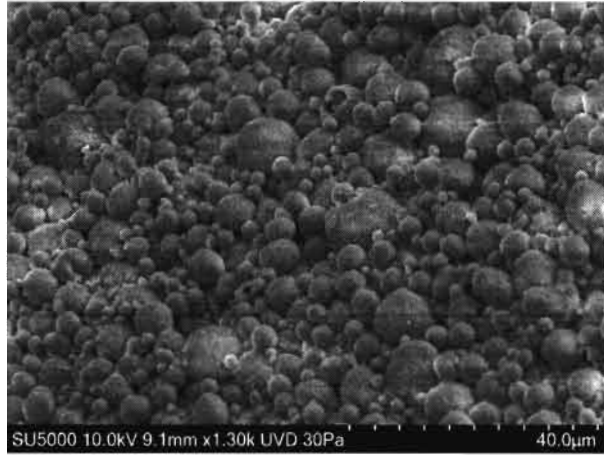


Figura 1. Micrografie SEM-UVD: imagine de electroni, la presiune variabilă, mărire 1,30k

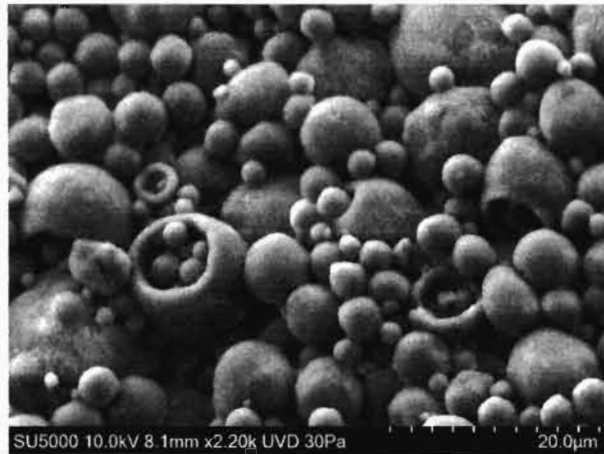


Figura 2. Micrografie SEM-UVD: imagine de electroni, la presiune variabilă, mărire 2,20k

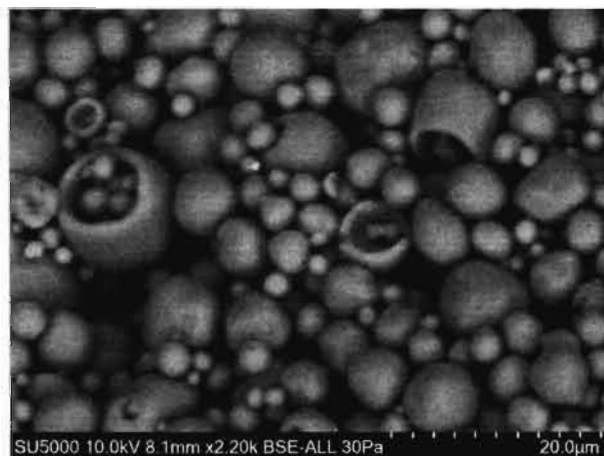


Figura 3. Micrografie SEM-BSE: imagine de electroni retroîmprăştiați, la presiune variabilă, mărire 2,20k