



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00874

(22) Data de depozit: 26/10/2017

(41) Data publicării cererii:
28/02/2022 BOPI nr. 2/2022

(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;
• GHIȚULICĂ CRISTINA DANIELA,
STR.COMANDOR EUGEN BOTEZ NR.21,
SC.2, ET.1, AP.2, SECTOR 1, BUCUREȘTI,
B, RO;

• STOICA ANICUȚA, STR.BOBÂLNA NR.3,
PLOIEȘTI, PH, RO;
• STROESCU MARTA CĂTĂLINA, ȘOS.
IANCULUI NR.29, BL.105B, SC.B, AP.65,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• VOICU GEORGETA, STR.GAROAFEI
NR.81, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• JINGA SORIN-ION,
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 PIROFOSFAT DE CALCIU
PRIN UTILIZAREA MEMBRANELOR DE BIOCELULOZĂ
CA ȘABLON**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor structuri tridimensionale poroase utilizate ca implanturi minerale pentru repararea și regenerarea osoasă. Procedeu, conform invenției, constă în sinteza șablonului polimeric de tip membrane de bioceluloză în cultură statică, în prezența unei tulpini de bacterii acetice izolate din oțet de mere fermentat, purificarea șablonului prin fierbere în soluție apoasă de NaOH și spălare cu apă deionizată, încărcarea membranelor cu

fosfați de calciu prin imersie în soluție de azotat de calciu tetrahidrat, și ulterior în soluție de fosfat bazic de amoniu, procesul fiind desfășurat sub iradiere cu ultrasunete, rezultând materiale compozite care sunt transformate prin tratament termic în structuri cu porozitate și dimensiunea granulelor controlate.

Revendicări: 1

Figuri: 6



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2017 0874
Data depozit 26-10-2017.

DESCRIEREA INVENȚIEI

Titlu:

Procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de pirofosfat de calciu prin utilizarea membranelor de bioceluloză ca șablon

Elaborat de:

Cristina Busuioc, Cristina-Daniela Ghițulică, Anicuța Stoica,
Marta Stroescu, Georgeta Voicu, Sorin-Ion Jinga

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de pirofosfat de calciu prin utilizarea membranelor de bioceluloză ca șablon.

Domeniul ingineriei tisulare presupune, printre altele, dezvoltarea de noi materiale pentru aplicații de tipul reparare sau regenerare osoasă, astfel încât performanțele clinice ale implanturilor să determine o vindecare rapidă a pacientului și recuperarea integrală a funcționalității specifice unui anumit organ (*J.R. Lieberman, G.E. Friedlaender, Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications, Humana Press, 2005*). Programele de cercetare din ultimele decenii sunt cele care au făcut posibilă evoluția de la sistemele rudimentare, asociate cu efecte secundare deloc de neglijat, la structurile complexe utilizate în prezent, bazate pe materiale compozite hibride (*L. Ambrosio, Biomedical Composites, Woodhead Publishing, 2010*) sau arhitecturi cu suprafață modificată (*M. Driver, Coatings for Biomedical Applications, Woodhead Publishing, 2012*).

Domeniul vindecării osoase cuprinde o gamă largă de materiale ceramice (*M. Vallet-Regi, Bio-Ceramics with Clinical Applications, Wiley, 2014*), utilizate sub formă de structuri tridimensionale poroase (*F. Baino, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 3 (2015) 202*), acoperiri protective sau fileri minerali. Explicația se bazează pe similitudinile compoziționale dintre anumite materiale anorganice artificiale și osul natural, dar și pe existența unei multitudini de variante de procesare pentru obținerea caracteristicilor proiectate. Astfel, implanturile osoase poroase pe bază de fosfați de calciu

reprezintă una dintre cele mai studiate tematici în prezent, hidroxiapatita și fosfatul tricalcic fiind reprezentanții cei mai de seamă (*G. Daculsi, T. Miramond, P. Borget, S. Baroth, Smart Calcium Phosphate Bioceramic Scaffold for Bone Tissue Engineering, Key Engineering Materials, 529-530 (2012) 19-23*). Metoda clasică de generare a porozității pleacă de la amestecarea materialului anorganic pulverulent cu un agent polimeric porogen, urmată de fasonarea corpurilor tridimensionale, respectiv eliminarea polimerului prin tratament termic și generarea unui grad mare de porozitate interconectată, care imită aspectul osului trabecular (*J.M. Karp, P.D. Dalton, M.S. Shoichet, Scaffolds for Tissue Engineering, MRS Bulletin 28 (2003) 301-306*); dimensiunea și distribuția porilor sunt parametrii cheie în obținerea unor materiale personalizate, cu arhitectură și proprietăți chimice potrivite pentru a favoriza infiltrarea și colonizarea celulară. Totuși, această abordare presupune o serie de limitări în ceea ce privește posibilitățile de atingere a unor rezistențe mecanice adecvate, dar și controlul proprietăților de material la scală nanometrică. O alternativă pentru fabricarea de structuri tridimensionale poroase destinate dezvoltării de implanturi osoase cu biocompatibilitate îmbunătățită și integrare rapidă este bazată pe folosirea șabloanelor polimerice (*A. Bodin, L. Gustafsson, P. Gatenholm, Surface-Engineered Bacterial Cellulose as Template for Crystallization of Calcium Phosphate, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 17 (2006) 435-447*), care susțin nucleerea și creșterea de cristale minerale pe suprafața lor, cu implicații considerabile asupra mecanismelor desfășurate la nivel atomic și molecular.

În acest context, bioceluloza este un polimer natural produs de diferite tipuri de bacterii aerobe, fiind extrem de studiat în ultima perioadă datorită proprietăților unice pe care le posedă în ceea ce privește structura, morfologia, rezistența mecanică și proprietățile biologice (*F. Esa, S.M. Tasirin, N.A. Rahman, Overview of Bacterial Cellulose Production and Application, Agriculture and Agricultural Science Procedia 2 (2014) 113-119*). De cele mai multe ori este integrată în compozite de tipul ambalaje pentru produse alimentare sau sisteme cu eliberare controlată de medicamente (*H. Ullah, H.A. Santos, T. Khan, Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery, Cellulose 23 (2016) 2291-2314*), dar există preocupări și în direcția exploatarea sa pe post de aditiv în cimenturile dentare (*G. Voicu, S.I. Jinga, B.G. Drosu, C. Busuioc, Improvement of Silicate Cement Properties with Bacterial Cellulose Powder Addition for Applications in Dentistry, Carbohydrate Polymers 174 (2017) 160-170*) sau ca șablon în sinteza de structuri cu morfologie controlată (*K. Zhao,*

Y.F. Tang, Y.S. Qin, D.F. Luo, Polymer Template Fabrication of Porous Hydroxyapatite Scaffolds with Interconnected Spherical Pores, Journal of the European Ceramic Society 31 (2011) 225-229). În acest ultim caz, unul dintre cele mai importante aspecte pare să fie legat de caracteristicile de suprafață ale șablonului, care de obicei sunt direcționate către formarea de poziții active (*H. Luo, G. Xiong, C. Zhang, D. Li, Y. Zhu, R. Guo, Y. Wan, Surface Controlled Calcium Phosphate Formation on Three-Dimensional Bacterial Cellulose-Based Nanofibers, Materials Science and Engineering C 49 (2015) 526-533*).

Astfel, explorarea unor noi fosfați de calciu pentru aplicații medicale, precum și a unor tehnici de fabricare inovatoare reprezintă direcții importante în Știința Materialelor. Unul dintre membrii familiei de fosfați de calciu care a fost investigat mai puțin este pirofosfatul de calciu. Totuși, puținele studii disponibile indică oportunitatea integrării sale în aplicații clinice (*A.M. El-Kady, K.R. Mohamed, G.T. El-Bassyouni, Fabrication, Characterization and Bioactivity Evaluation of Calcium Pyrophosphate/Polymeric Biocomposites, Ceramics International 35 (2009) 2933-2942; A.D. Anastasiou, S. Strafford, O. Posada-Estefan, C.L. Thomson, S.A. Hussain, T.J. Edwards, M. Malinowski, N. Hondow, N.K. Metzger, C.T.A. Brown, M.N. Routledge, A.P. Brown, M.S. Duggal, A. Jha, β -Pyrophosphate: A Potential Biomaterial for Dental Applications, Materials Science and Engineering C 75 (2017) 885-894; Y. He, Y. Zhang, Z. Meng, Y. Jiang, R. Zhou, Microstructure Evolution, Mechanical Properties and Enhanced Bioactivity of Ti-Nb-Zr Based Biocomposite by Bioactive Calcium Pyrophosphate, Journal of Alloys and Compounds 720 (2017) 567-581; T. Yan, F. Cheng, X. Wei, Y. Huang, J. He, Biodegradable Collagen Sponge Reinforced with Chitosan/Calcium Pyrophosphate Nanoflowers for Rapid Hemostasis, Carbohydrate Polymers 170 (2017) 271-280*).

Microstructura potrivită pentru un înlocuitor de țesut dur trebuie să aibă o proporție mare de macropori interconectați pentru a permite invazia rapidă a celulelor, menținându-se în același timp ca structură rigidă. Ca urmare, prezenta invenție propune un nou procedeu de obținere a unor structuri tridimensionale poroase pe bază de pirofosfat de calciu, aceasta fiind prima tentativă de acest gen din domeniu. Prezentul procedeu se bazează pe utilizarea unor membrane polimerice de sacrificiu, care sunt încărcate cu fază minerală prin sinteză chimică în soluție și ulterior sunt eliminate din sistem prin tratament termic.

Prima etapă constă în sinteza și purificarea membranelor de bioceluloză. Acestea au fost obținute în cultură statică, în prezența unei tulpini de bacterii acetice izolate din oțetul de mere fermentat; s-a folosit un mediu de cultură Hestrin-Schramm modificat, conținând 2 % fructoză. Pentru eliminarea celulelor bacteriene, membranele de tip gel au fost purificate prin fierbere într-o soluție apoasă de hidroxid de sodiu (NaOH) 0,5 M, la 90 °C, timp de 1 h, și spălate cu apă deionizată până la pH neutru.

În cea de-a doua etapă, membranele de bioceluloză cu structura tridimensională fibroasă (Figura 1) au fost încărcate cu fosfați de calciu, rezultând un compozit hibrid alcătuit dintr-o matrice de fibre polimerice distribuite aleator și acoperite cu un strat de fosfați de calciu cu diferite rapoarte între calciu și fosfor, dar și diferite grade de hidratare. Un ciclu de depunere a presupus încărcarea fazelor minerale pe șablon printr-o reacție chimică în mai mulți pași. Mai întâi, membranele de bioceluloză au fost imersate într-un pahar Berzelius cu 100 mL soluție de azotat de calciu tetrahidratat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,5 M, având pH -ul de 10 ± 0.2 , ajustat cu o soluție de hidroxid de amoniu (NH_4OH) 0,5 M, și menținute sub ultrasonare cu un echipament Ultrasonic Processor VCX 500 (500 W, 20 kHz); puterea de iradiere a fost fixată la 50 % din puterea nominală, iar temperatura a fost menținută la 60 ± 2 °C cu ajutorul unei băi cu gheață. După 20 min, membranele au fost spălate cu apă deionizată și imersate în 100 mL soluție de fosfat dibazic de amoniu ($\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 0,5 M pentru încă 20 min, sub ultrasonare. După spălare cu apă deionizată, acestea au fost liofilizate (înghețare la - 55 °C și uscare în condiții de temperatură și presiune scăzute) pentru a conserva structura tridimensională a biocelulozei și a obține materiale compozite spongioase. Analizele au indicat existența de fosfați de calciu depuși sub formă de fulgi. În funcție de gradul de încărcare cu fază minerală dorit, pot fi aplicate unul sau mai multe cicluri de depunere identice (Figura 2).

Avantajele prezentului procedeu constau în contactul la nivel ionic dintre reactanți, asigurat de mediul lichid de sinteză, precum și în aplicarea ultrasonării pentru a favoriza penetrarea soluțiilor precursorare în volumul membranelor de bioceluloză, dar și pentru a modifica mecanismele de nucleere și creștere granulară.

În ultima etapă a procedurii, compozitele descrise anterior (membrane de bioceluloză - fosfați de calciu) au fost tratate termic în aer, în diferite condiții experimentale, cu scopul de a îndepărta prin ardere șablonul polimeric și a genera structuri minerale cu grad ridicat de cristalinitate, respectiv diferite morfologii. Investigațiile compoziționale și structurale au

demonstrat formarea de pirofosfat de calciu ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) cu structură tetragonală sau ortorombică. În Tabelul 1 sunt date exemple de valori ale parametrilor de tratament termic pentru obținerea de structuri poroase pe bază de pirofosfat de calciu prin procedeul ce face obiectul prezentei invenții.

În continuare, sunt redate patru exemple de realizare a invenției, mai exact caracteristicile morfologice ale structurilor poroase pe bază de pirofosfat de calciu rezultate (Figurile 3, 4, 5 și 6). Analizând imaginile de microscopie electronică, se poate evalua influența parametrilor de procesare termică asupra porozității (proporția porozității, dimensiunea și distribuția porilor), precum și asupra granulelor constituente (mărimea granulelor, granițele intergranulare).

Corpurile tridimensionale poroase sunt alcătuite din fire și particule conectate la extremități, asigurând formarea unei structuri de rezistență. Creșterea palierului sau a temperaturii de tratament termic favorizează difuzia materialului, conducând la scăderea porozității, granule mai mari și limite intergranulare mai puternice, cu efecte benefice asupra proprietăților mecanice. Pe de altă parte, creșterea vitezei de încălzire conservă golurile mari din structura șablonului și generează un aspect spongios, asemănător osului natural, asigurând o interfață extinsă cu celulele.

Tabelul 1. Parametrii de tratament termic pentru obținerea de structuri minerale poroase pe bază de pirofosfat de calciu prin procedeul cu șablon.

Viteză de încălzire	60 °C/h 600 °C/h
Temperatură maximă	1000 °C 1200 °C
Palier	0,5 h 6 h

REVENDICĂRILE

Procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de pirofosfat de calciu, utilizate ca implanturi minerale dedicate reparării și regenerării osoase, care constă în: sinteza șablonului polimeric (membrane de bioceluloză) în cultură statică, în prezența unei tulpini de bacterii acetice izolate din oțetul de mere fermentat; purificarea șablonului prin fierbere în soluție apoasă de hidroxid de sodiu (NaOH) și spălare cu apă deionizată; încărcarea membranelor de bioceluloză cu fosfați de calciu prin imersare în soluție de azotat de calciu tetrahidratat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) și ulterior în soluție de fosfat dibazic de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, întregul proces desfășurându-se sub iradiere cu ultrasunete; tratamentul termic al compozitelor hibride rezultate în diferite condiții experimentale în vederea obținerii de corpuri tridimensionale poroase. Procedeu este caracterizat prin aceea că utilizează materiale puțin costisitoare și tehnici simple și accesibile, pe când proprietățile structurale și morfologice ale arhitecturilor minerale finale pot fi ajustate în funcție de particularitățile clinice, cu repercusiuni considerabile asupra timpului de vindecare a pacientului.

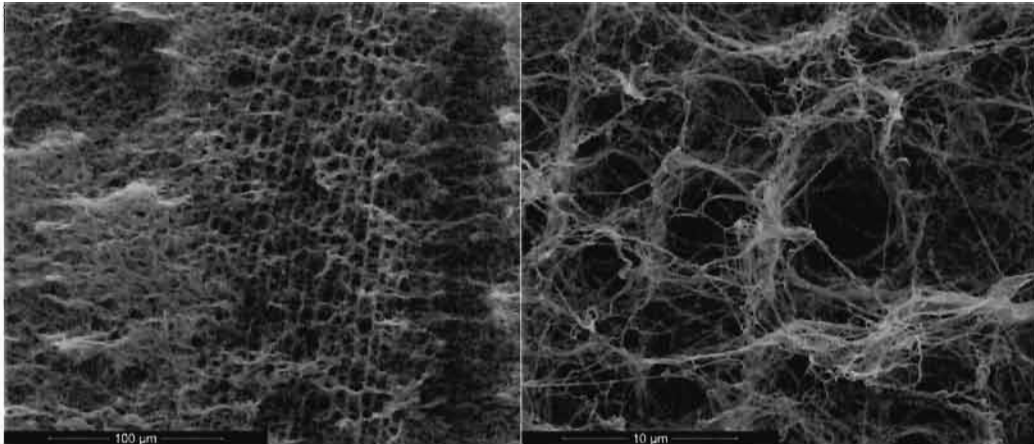


Figura 1. Imagini de microscopie electronică la diferite mărituri ale membranei de bioceluloză folosite ca șablon pentru obținerea de structuri minerale poroase.

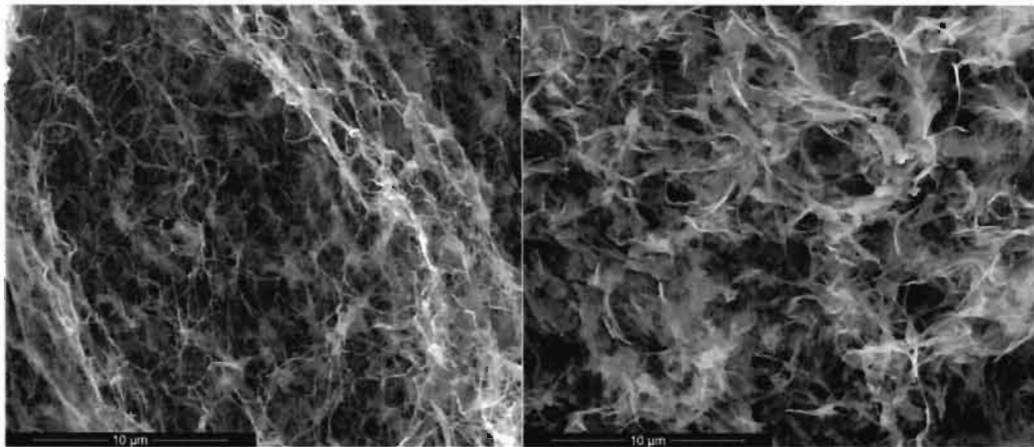


Figura 2. Imagini de microscopie electronică ale membranelor de bioceluloză încărcate cu fosfați de calciu: un ciclu (stânga) și două cicluri (dreapta).

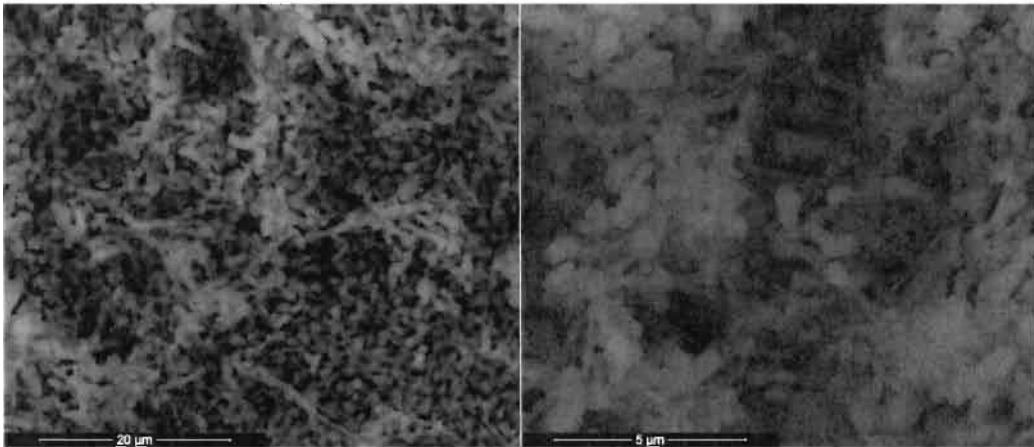


Figura 3. Imagini de microscopie electronică la diferite mărimi ale structurii poroase pe bază de pirofosfat de calciu obținute prin tratament termic în următoarele condiții: viteză de încălzire - 60 °C/h, temperatură maximă - 1000 °C, palier - 0,5 h.

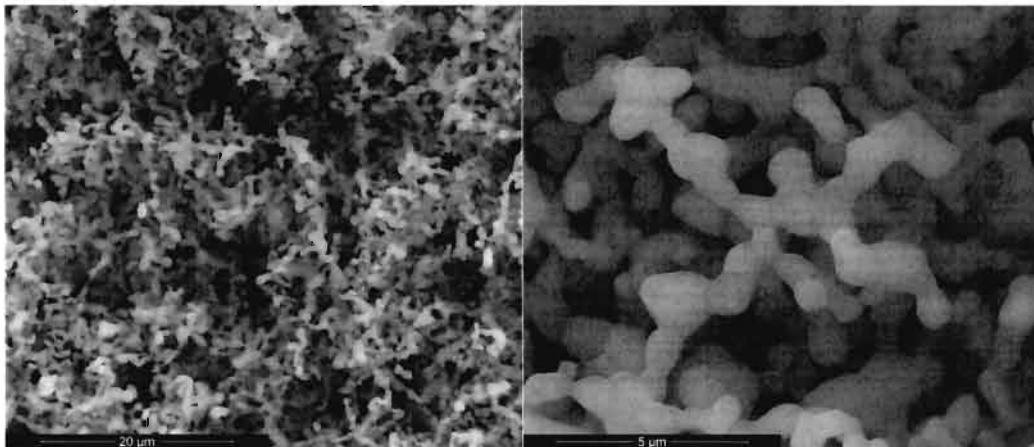


Figura 4. Imagini de microscopie electronică la diferite mărimi ale structurii poroase pe bază de pirofosfat de calciu obținute prin tratament termic în următoarele condiții: viteză de încălzire - 60 °C/h, temperatură maximă - 1000 °C, palier - 6 h.

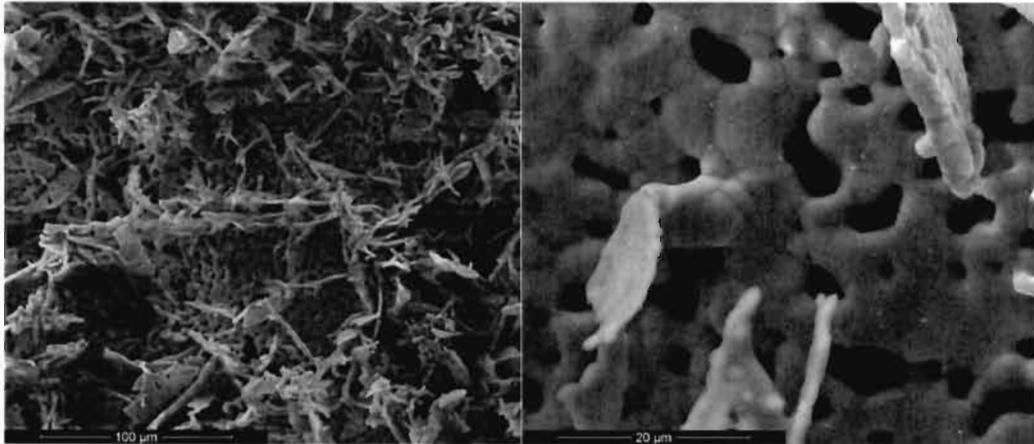


Figura 5. Imagini de microscopie electronică la diferite mărimi ale structurii poroase pe bază de pirofosfat de calciu obținute prin tratament termic în următoarele condiții: viteză de încălzire - 60 °C/h, temperatură maximă - 1200 °C, palier - 6 h.

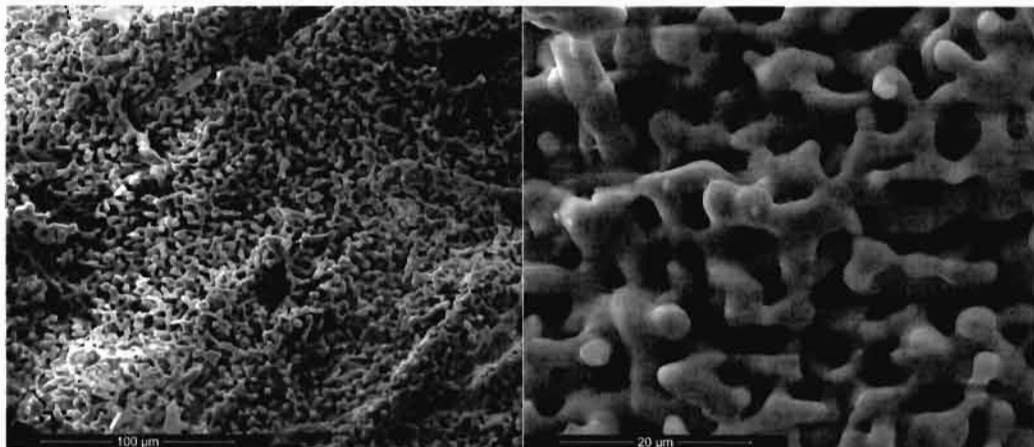


Figura 6. Imagini de microscopie electronică la diferite mărimi ale structurii poroase pe bază de pirofosfat de calciu obținute prin tratament termic în următoarele condiții: viteză de încălzire - 600 °C/h, temperatură maximă - 1200 °C, palier - 6 h.