



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00874**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2023** BOPI nr. **2/2023**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CN 105561386 (A); RO 127170 B1;
US 8110222 B2**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA DE STRUCTURI
POROASE PE BAZĂ DE PIROFOSFAT DE CALCIU
UTILIZATE CA IMPLANTURI MINERALE DEDICATE
REPARĂRII ȘI REGENERĂRII OSOASE**



1 Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe
2 bază de pirofosfat de calciu utilizate ca implanturi minerale dedicate reparării și regenerării
3 osoase.

4 Domeniul ingineriei tisulare presupune, printre altele, dezvoltarea de noi materiale
5 pentru aplicații de tipul reparare sau regenerare osoasă, astfel încât performanțele clinice
6 ale implanturilor să determine o vindecare rapidă a pacientului și recuperarea integrală a
7 funcționalității specifice unui anumit organ (**J. R. Lieberman, G. E. Friedlaender, *Bone
Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications, Humana Press, 2005***).

8 Programele de cercetare din ultimele decenii sunt cele care au făcut posibilă evoluția
9 de la sistemele rudimentare, asociate cu efecte secundare deloc de neglijat, la structurile
10 complexe utilizate în prezent, bazate pe materiale compozite hibride (**L. Ambrosio,
11 *Biomedical Composites, Woodhead Publishing, 2010***) sau arhitecturi cu suprafață modi-
12 ficată (**M. Driver, *Coatings for Biomedical Applications, Woodhead Publishing, 2012***).

13 Domeniul vindecării osoase cuprinde o gamă largă de materiale ceramice (**M. Vallet-
14 Regi, *Bio-Ceramics with Clinical Applications, Wiley, 2014***), utilizate sub formă de
15 structuri tridimensionale poroase (**F. Baino, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, *Bioceramics
16 and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering, Frontiers in
17 Bioengineering and Biotechnology, 3, (2015), 202***), acoperiri protective sau fileri minerali.
18 Explicația se bazează pe similitudinile compoziționale dintre anumite materiale anorganice
19 artificiale și osul natural, dar și pe existența unei multitudini de variante de procesare pentru
20 obținerea caracteristicilor proiectate. Astfel, implanturile osoase poroase pe bază de fosfați
21 de calciu reprezintă una dintre cele mai studiate tematici în prezent, hidroxiapatita și fosfatul
22 tricalcic fiind reprezentanții cei mai de seamă (**G. Daculsi, T. Miramond, P. Borget, S.
23 Baroth, *Smart Calcium Phosphate Bioceramic Scaffold for Bone Tissue Engineering,
24 Key Engineering Materials, 529-530, (2012), 19-23***). Metoda clasică de generare a
25 porozității pleacă de la amestecarea materialului anorganic pulverulent cu un agent polimeric
26 porogen, urmată de fasonarea corpurilor tridimensionale, respectiv eliminarea polimerului
27 prin tratament termic și generarea unui grad mare de porozitate interconectată, care imită
28 aspectul osului trabecular (**J. M. Karp, P.D. Dalton, M.S. Shoichet, *Scaffolds for Tissue
29 Engineering, MRS Bulletin, 28, (2003), 301-306***); dimensiunea și distribuția porilor sunt
30 parametrii cheie în obținerea unor materiale personalizate, cu arhitectură și proprietăți
31 chimice potrivite pentru a favoriza infiltrarea și colonizarea celulară. Totuși, această abordare
32 presupune o serie de limitări în ceea ce privește posibilitățile de atingere a unor rezistențe
33 mecanice adecvate, dar și controlul proprietăților de material la scală nanometrică. O alterna-
34 tivă pentru fabricarea de structuri tridimensionale poroase destinate dezvoltării de implanturi
35 osoase cu biocompatibilitate îmbunătățită și integrare rapidă este bazată pe folosirea
36 șabloanelor polimerice (**A. Bodin, L. Gustafsson, P. Gatenholm, *Surface-Engineered
37 Bacterial Cellulose as Template for Crystallization of Calcium Phosphate, Journal of
38 Biomaterials Science, Polymer Edition, 17, (2006), 435-447***), care susțin nucleerea și
39 creșterea de cristale minerale pe suprafața lor, cu implicații considerabile asupra
40 mecanismelor desfășurate la nivel atomic și molecular.

41 În acest context, bioceluloza este un polimer natural produs de diferite tipuri de
42 bacterii aerobe, fiind extrem de studiat în ultima perioadă datorită proprietăților unice pe care
43 le posedă în ceea ce privește structura, morfologia, rezistența mecanică și proprietățile
44 biologice (**F. Esa, S.M. Tasirin, N.A. Rahman, *Overview of Bacterial Cellulose
45 Production and Application, Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2, (2014),
46 113-119***). 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, <i>Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery, Cellulose</i> , 23 , (2016), 2291-2314), dar există preocupări și în direcția exploatarea sale pe post	1
de aditiv în cimenturile dentare (G. Voicu, S.I. Jinga, B.G. Drosu, C. Busuioc, <i>Improvement of Silicate Cement Properties with Bacterial Cellulose Powder Addition for Applications in Dentistry, Carbohydrate Polymers</i> , 174 , (2017), 160-170) sau ca	3
șablon în sinteza de structuri cu morfologie controlată (K. Zhao, Y.F. Tang, Y.S. Qin, D.F. Luo, <i>Polymer Template Fabrication of Porous Hydroxyapatite Scaffolds with Interconnected Spherical Pores, Journal of the European Ceramic Society</i> , 31 , (2011), 225-229).	5
În acest ultim caz, unul dintre cele mai importante aspecte pare să fie legat de	7
caracteristicile de suprafață ale șablonului, care de obicei sunt direcționate către formarea	9
de poziții active (H. Luo, G. Xiong, C. Zhang, D. Li, Y. Zhu, R. Guo, Y. Wan, <i>Surface Controlled Calcium Phosphate Formation on Three-Dimensional Bacterial Cellulose-Based Nanofibers, Materials Science and Engineering C</i> , 49 , (2015), 526-533).	11
Astfel, explorarea unor noi fosfați de calciu pentru aplicații medicale, precum și a unor	13
tehnici de fabricare inovatoare reprezintă direcții importante în Știința Materialelor. Unul	15
dintre membrii familiei de fosfați de calciu care a fost investigat mai puțin este pirofosfatul de	17
calciu. Totuși, puținele studii disponibile indică oportunitatea integrării sale în aplicații clinice	19
(A.M. El-Kady, K.R. Mohamed, G.T. El-Bassyouni, <i>Fabrication, Characterization and Bioactivity Evaluation of Calcium Pyrophosphate/Polymeric Biocomposites, Ceramics International</i> , 35 , (2009), 2933-2942; A.D. Anastasiou, S. Strafford, O. Posada-Estefan,	21
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, <i>β-Pyrophosphate: A Potential Biomaterial for Dental Applications, Materials Science and Engineering C</i> ,	23
75 , (2017), 885-894; Y. He, Y. Zhang, Z. Meng, Y. Jiang, R. Zhou, <i>Microstructure Evolution, Mechanical Properties and Enhanced Bioactivity of Ti-Nb-Zr Based Biocomposite by Bioactive Calcium Pyrophosphate, Journal of Alloys and Compounds</i> ,	25
720 , (2017), 567-581; T. Yan, F. Cheng, X. Wei, Y. Huang, J. He, <i>Biodegradable Collagen Sponge Reinforced with Chitosan/Calcium Pyrophosphate Nanoflowers for Rapid Hemostasis, Carbohydrate Polymers</i> , 170 , (2017), 271-280).	27
Microstructura potrivită pentru un înlocuitor de țesut dur trebuie să aibă o proporție	29
mare de macropori interconectați pentru a permite invazia rapidă a celulelor, menținându-se	31
în același timp ca structură rigidă. Ca urmare, prezenta invenție propune un nou procedeu	33
de obținere a unor structuri tridimensionale poroase pe bază de pirofosfat de calciu, aceasta	35
fiind prima tentativă de acest gen din domeniu. Prezentul procedeu se bazează pe utilizarea	37
unor membrane polimerice de sacrificiu, care sunt încărcate cu fază minerală prin sinteză	39
chimică în soluție și ulterior sunt eliminate din sistem prin tratament termic.	41
Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în adaptarea succesiunii fazelor	43
și a parametrilor fazici ai unui procedeu specific obținerii unor implanturi osoase poroase pe	45
bază de pirofosfați de calciu care să permită predictibilitatea și obținerea caracteristicilor de	47
porozitate și rezistență mecanică ale produsului final precum și aspectul spongios asemănător osului natural.	
Procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de pirofosfat de calciu,	43
utilizat ca implanturi minerale dedicate reparării și regenerării osoase, înlătură dezavantajele	45
de mai sus prin aceea că are următoarele etape: sinteza șablonului polimeric format din	47
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	

RO 135510 B1

1 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
3 ulterior în soluție de fosfat dibazic de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, întregul proces desfășurându-se
sub iradiere cu ultrasunete și apoi tratamentul termic al compozitelor hibride rezultate în
5 vederea obținerii de corpuri tridimensionale poroase.

Prima etapă a procedurii constă în sinteza și purificarea membranelor de bio-
7 celuloză. 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
9 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,
11 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
13 fibroasă (fig. 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
15 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
17 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
19 $10 \pm 0,2$, 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
21 iradiere a fost fixată la 50% din puterea nominală, iar temperatura a fost menținută la
 $60 \pm 2^\circ\text{C}$ cu ajutorul unei băi cu gheață. După 20 min, membranele au fost spălate cu apă
23 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
25 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
27 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
29 de depunere identice (fig. 2).

Avantajele prezentului procedeu constau în contactul la nivel ionic dintre reactanți,
31 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
33 modifica mecanismele de nucleere și creștere granulară.

În ultima etapă a procedurii, compozitele descrise anterior (membrane de bio-
35 celuloză - 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
37 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
39 ortorombică.

Corpurile tridimensionale poroase sunt alcătuite din fire și particule conectate la
41 extremități, asigurând formarea unei structuri de rezistență. Creșterea palierului sau a
temperaturii de tratament termic favorizează difuzia materialului, conducând la scăderea
43 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
45 din structura șablonului și generează un aspect spongios, asemănător osului natural,
asigurând o interfață extinsă cu celulele.

În tabelul 1 sunt date exemple de valori ale parametrilor de tratament termic pentru
47 obținerea de structuri poroase pe bază de pirofosfat de calciu prin procedeu ce face obiectul
49 prezentei invenții.

RO 135510 B1

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

Tabelul 1

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

În continuare, sunt redate patru exemple de realizare a invenției. Analizând imaginile de microscopie electronică, se poate evalua influența parametrilor de procesare termică asupra granulelor constituente (mărimea granulelor, granițele intergranulare), precum și asupra porozității (proporția porozității, dimensiunea și distribuția porilor).

Exemplul 1

În prima etapă se obține membrana de bioceluloză în cultură bacteriană statică, urmată de purificarea acesteia prin fierbere în soluție apoasă de NaOH 0,5 M, la 90°C, timp de 1 h (fig. 1). În cea de-a doua etapă, membrana de bioceluloză se încarcă cu fosfați de calciu prin imersare în 100 ml soluție de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M, ajustând pH-ul la $10 \pm 0,2$ cu o soluție de NH_4OH 0,5 M și menținând sub ultrasonare la o putere de iradiere de 50% și la temperatura de $60 \pm 2^\circ\text{C}$ cu ajutorul unei băi cu gheață; după 20 min, membrana de bioceluloză se spală cu apă deionizată și se imersează în 100 ml soluție de NH_4OH 0,5 M pentru încă 20 min, sub ultrasonare; după spălare cu apă deionizată, aceasta se liofilizează în condiții standard (fig. 2). În cea de-a treia etapă, membrana de bioceluloză încărcată cu fosfați de calciu se tratează termic în aer, la 1000°C, aplicând o viteză de încălzire de 60°C/h și un palier de 0,5 h.

Prin acest procedeu se obține un corp tridimensional poros pe bază de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ cu structură tetragonală, ale cărei caracteristici morfologice sunt redate în fig. 3. Acesta este alcătuit din fire groase de câțiva nanometri și lungi de câțiva micrometri și particule cu dimensiuni sub un micrometru, conectate la extremități și asigurând formarea unei structuri de rezistență care nu se prăbușește sub propria sa greutate. Rețeaua de pori interconectați este compusă din goluri de mici dimensiuni.

Exemplul 2

Se realizează primele două etape conform exemplului 1, după care, în cea de-a treia etapă, membrana de bioceluloză încărcată cu fosfați de calciu se tratează termic în aer, la 1000°C, aplicând o viteză de încălzire de 60°C/h și un palier de 6 h.

Prin acest procedeu se obține un corp tridimensional poros pe bază de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ cu structură tetragonală, ale cărei caracteristici morfologice sunt redate în fig. 4. Acesta este alcătuit din granule cu dimensiuni peste un micrometru, unite prin limite intergranulare mai puternice datorită difuziei materialului, cu efecte benefice asupra proprietăților mecanice. Rețeaua de pori interconectați este compusă din goluri de dimensiuni mari, care formează uneori adevărate canale transversale.

Exemplul 3

Se realizează primele două etape conform exemplului 1, după care, în cea de-a treia etapă, membrana de bioceluloză încărcată cu fosfați de calciu se tratează termic în aer, la 1200°C, aplicând o viteză de încălzire de 60°C/h și un palier de 6 h.

RO 135510 B1

1 Prin acest procedeu se obține un corp tridimensional poros pe bază de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ cu
structură ortorombică, ale cărui caracteristici morfologice sunt redată în fig. 5. Acesta este
3 alcătuit din granule cu dimensiuni peste $2\ \mu\text{m}$, aglomerate sau chiar unite sub formă de
pereți continui datorită difuziei intense a materialului, în cadrul cărora se pot observa
5 joncțiunile triple, cu efecte benefice asupra proprietăților mecanice. Rețeaua de pori inter-
conectați este compusă din goluri mici și mari, care formează o porozitate la scale diferite.

7 **Exemplul 4**

Se realizează primele două etape conform exemplului 1, după care, în cea de-a treia
9 etapă, membrana de bioceluloză încărcată cu fosfați de calciu se tratează termic în aer, la
 1200°C , aplicând o viteză de încălzire de 600°C/h și un palier de 6 h.

11 Prin acest procedeu se obține un corp tridimensional poros pe bază de $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ cu
structură ortorombică, ale cărui caracteristici morfologice sunt redată în fig. 6. Acesta este
13 alcătuit din granule unite prin limite intergranulare aproape imperceptibile într-un schelet
uniform cu aspect spongios, asemănător osului natural, asigurând o interfață extinsă cu
15 celulele. Rețeaua de pori interconectați este compusă din goluri mari, formate ca urmare a
conservării structurii șablonului.

RO 135510 B1

Revendicare

1

Procedeu pentru obținerea de structuri poroase pe bază de pirofosfat de calciu, utilizate ca implanturi minerale dedicate reparării și regenerării osoase, **caracterizat prin aceea că**, are următoarele etape: sinteza șablonului polimeric format din 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 vederea obținerii de corpuri tridimensionale poroase.

3

5

7

9

11

(51) Int.Cl.

A61L 27/12 (2006.01);

A61L 27/56 (2006.01)

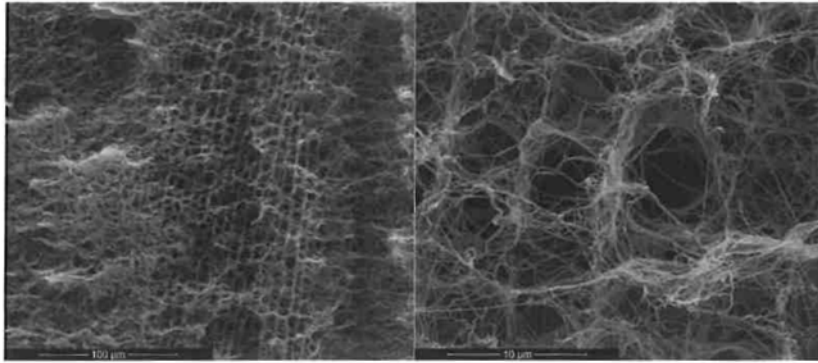


Fig. 1

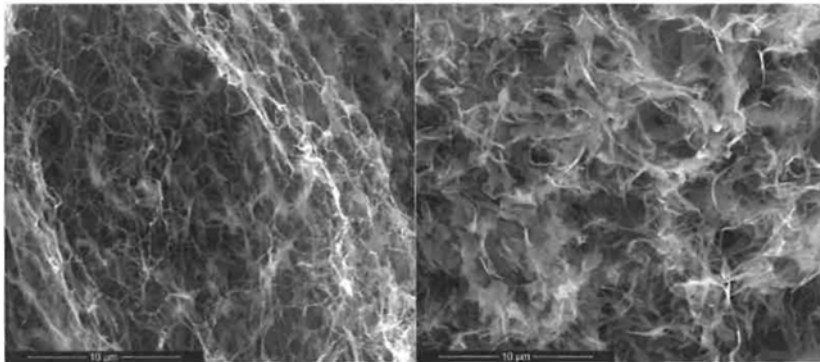


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61L 27/12 (2006.01);

A61L 27/56 (2006.01)

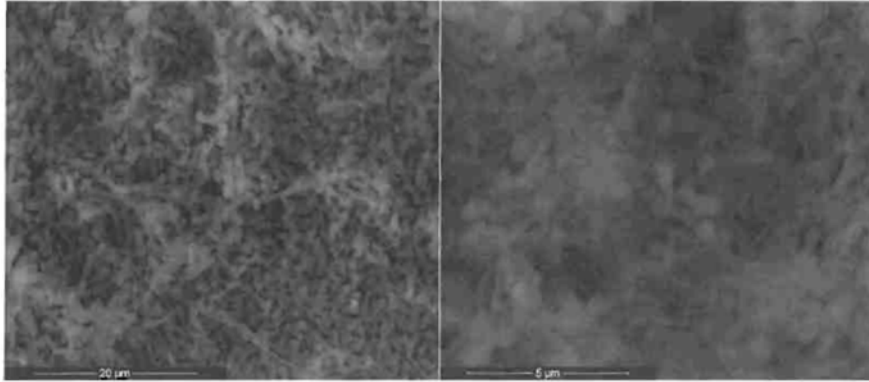


Fig. 3

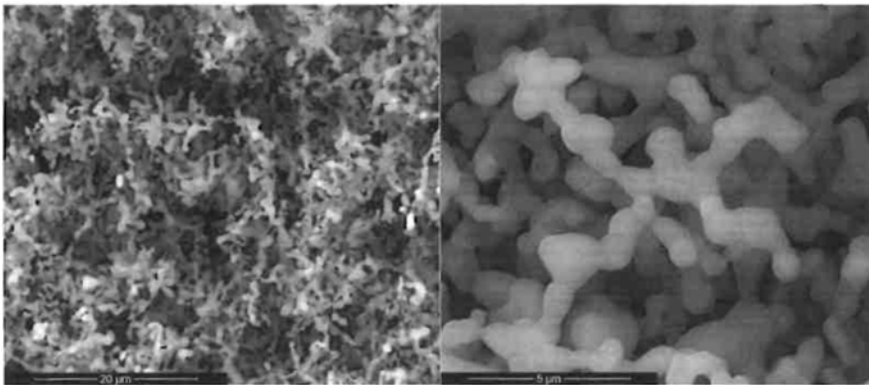


Fig. 4

(51) Int.Cl.

A61L 27/12 (2006.01);

A61L 27/56 (2006.01)

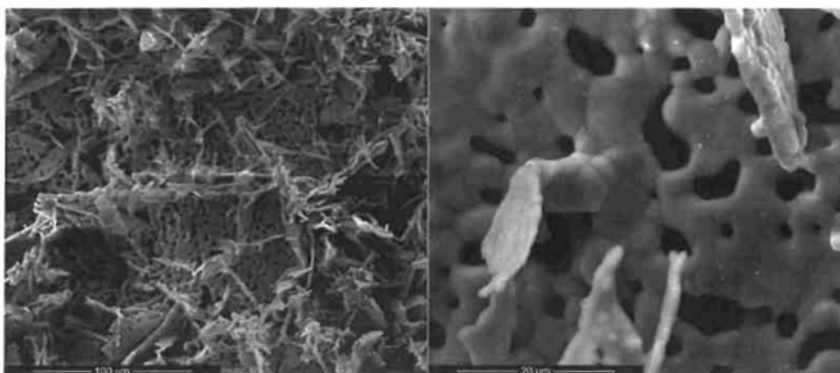


Fig. 5

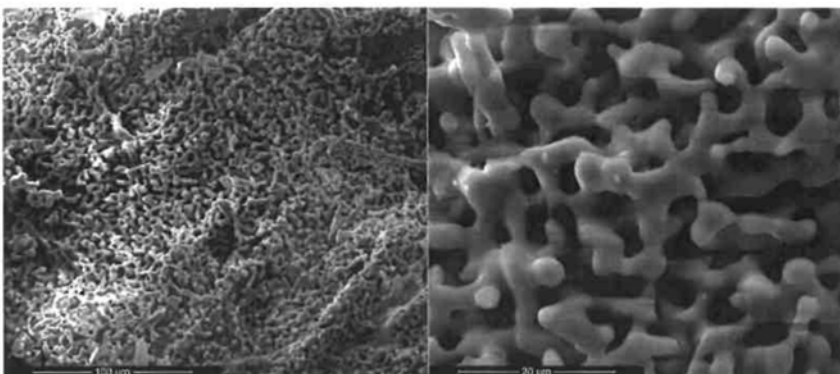


Fig. 6

