



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00427

(22) Data de depozit: 19/07/2022

(41) Data publicării cererii:  
30/01/2023 BOPI nr. 1/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CHEMI CERAMIC F S.R.L.,  
STR. CIUCULUI NR. 163, SFÂNTU  
GHEORGHE, CV, RO

(72) Inventatori:  
• OPRIȚA ELENA IULIA,  
STR.VALEA IALOMIȚEI NR.6, BL.C 10,  
ET.9, SC.C, AP.184, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CRĂCIUNESCU OANA,  
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,  
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• FAZAKAS-RADULY ORSOLYA-CSILLA,  
SAT BODOC NR.250, COMUNA BODOC,  
CV, RO;  
• FAZAKAS JOZSEF, STR. 1 DECEMBRIE  
1918, BL. 18, SC. C, ET. 4, AP. 12,  
SFÂNTUL GHEORGHE, CV, RO;  
• SECIU-GRAMA ANA-MARIA,  
BD. 1 DECEMBRIE 1918, NR.22, BL.3, SC.1,  
ET.6, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• BARABAS REKA, STR.BUCUREȘTI  
NR.51, SC.2, ET.2, AP.34, CLUJ-NAPOCA,  
CJ, RO;  
• MOLDOVAN LUCIA, BD.  
CONSTRUCTORILOR NR.24A, BL.19, SC.A,  
ET.2, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) COMPOZIȚIE DE HIDROGEL COMPOZIT PE BAZĂ  
DE COMPONENTE CERAMICE ȘI NATURALE  
PENTRU REGENERAREA DEFECTELOR OSTEOCONDRALE  
ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui hidrogel compozit pe bază de ceramice naturale pentru regenerarea defectelor osteocondrale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: obținerea componentelor bioceramice îmbogățite în siliciu de tip hidroxipatită-siliciu, fosfat tricalcic-siliciu și akermanit, prepararea unui amestec de macromolecule matriceale din soluție de gelatină de concentrație 10...20%, pulbere de condroitin sulfat și acid hialuronic în raport 2:0,8:0,2...2:0,9:0,1, la temperatura de 30...50 °C, timp de 2...5 h, adăugarea componentelor bioceramice peste

amestecul de macromolecule, în raport de combinare 1:1...1:2, la temperatura de 30...50 °C, adăugarea unui flavonoid pentru îmbunătățirea proprietăților biologice, reticularea cu etil dietilamino carbodiimidă de concentrație 5...15 mM, prin agitare timp de 3...5 h, la temperatura de 20...40 °C, rezultând un produs de tip hidrogel compozit care este sterilizat prin expunere la radiații UV, într-o incintă de sterilizare, timp de 5...10 h.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## DESCRIEREA INVENȚIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2022 m 427
Data depozit .....	19-07-2022

**Compoziție de hidrogel compozit pe bază de componente ceramice și naturale pentru regenerarea defectelor osteocondrale și procedeu de obținere**

Oprîța Elena Iulia, Crăciunescu Oana, Seciu-Grama Ana Maria, Barabás Réka, Fazakas-Ráduly Orsolya-Csilla, Fazakas József, Moldovan Lucia

Prezenta invenție se referă la un hidrogel compozit biomimetic și biodegradabil, pe bază de bioceramice îmbogățite cu siliciu (fosfat tricalcic, hidroxiapatită, akermanit), polipeptide naturale (gelatină), polizaharide (condroitin sulfat și acid hialuronic) și molecule bioactive mici (flavonoide), utilizat în tratarea și refacerea defectelor osteocondrale și la un procedeu de obținere a acestuia.

Se știe că defectele osteocondrale sunt leziuni rezultate în urma afecțiunilor cartilajului articular și a osului subcondral care apar, în mod frecvent, datorită traumatismelor acute, accidentelor și bolilor de tipul osteoartritelor. Cartilajul articular nefiind vascularizat prezintă o capacitate slabă de autoregenerare, iar aceste leziuni au tendința de a progresa în mărime și severitate afectând și partea nelezată și predispunând la suferințe încă de la debutul bolii.

Sunt cunoscute variante de tratament convenționale pentru refacerea defectelor osteocondrale, care se bazează pe terapii curente ce folosesc medicamente anti-inflamatoare nesteroidiene, tehnici de fizioterapie și kinetoterapie sau intervenții chirurgicale pentru îndepărtarea suprafețelor lezate, transplant de țesut sau procedee de reconstrucție (*Zhang et al, BMC Complementary Medicine and Therapies, 2020:193*). Studiile clinice dezvoltate până în prezent au arătat că reconstrucția cartilajului, dar și a osului subcondral este dificilă din cauza structurii și funcțiilor lor diferite (*Deng et al., Journal of Orthopaedic Translation, 2019, 17:15e25*).

Tratamentele defectelor osteocondrale sunt limitate și insuficiente pentru a preveni și încetini progresul bolii. De aceea, se impune necesitatea unor noi strategii pentru prevenirea și tratamentul defectelor osteocondrale, precum tehnicile de inginerie tisulară ce folosesc materiale compozite bioactive, cu proprietăți îmbunătățite, care să faciliteze atât diferențierea condrogenică, cât și osteogenică, astfel încât să se realizeze regenerarea simultană a cartilajului și a osului subcondral.

Se cunosc o serie de materiale bioactive pe bază de biopolimeri matriceali cu/și fără polimeri sintetici, care prezintă efecte benefice în tratamentul defectelor osoase (Brevet RO

**0126014 B1/2013**) sau cartilaginoase (Brevet **RO 0127486B1/2013**) și înlocuiesc metodele convenționale și care au fost condiționate ca suporturi poroase sau hidrogeluri bistratificate (Brevet **RO 131951 A0/2017**). Brevetul **CA 02536094/2006** prezintă un implant condiționat ca suport poros biodegradabil, pe bază de matrice acelulară, util în tratamentul cartilajului articular, al osului și defectelor osteocondrale. Matricea acelulară tridimensională, care se implantează într-o cavitate a zonei lezate, conține biopolimeri matriceali, precum colagenii de tip I, II și IV, laminina, fibronectina și glicozaminoglicanii, asociați cu polimeri sintetici de tip policaprolactonă sau acid poliaminic. În brevetul **EP2143450B1/2015** este descris un hidrogel polimeric pentru regenerarea cartilajului lezat, utilizat pentru augmentare osoasă, care se introduce într-un canal realizat în osul subcondral în imediata apropiere a cartilajului deteriorat. Acest material are o structură de tip rețea polimerică interpenetrantă formată din polimeri sintetici reticulați, obținuți prin polimerizarea acidului acrilamid-metilpropansulfonic și N,N-dimetil acrilamidă. Brevetul **WO 2017/041068A1** descrie un suport cilindric utilizat ca implant, format din două sau mai multe zone de hidrogel, fiecare cu proprietăți fizice și chimice specifice. Hidrogelurile componente prezintă structuri poroase și non-poroase, care pot fi asociate cu celule, și au la bază polimeri sintetici constituiți din monomeri anorganici și organici, cum sunt polidimetil siloxan-metacrilat și polietilen glicol-acrilat, asociați în diferite concentrații și rapoarte de combinare.

Sunt cunoscute biomateriale compozite pe bază de polimeri naturali și ceramice biocompatibile cu proprietăți mecanice și biodegradabile îmbunătățite cu aplicații în regenerarea osoasă și osteocondrală. Aceste suporturi compozite conțin diferiți biopolimeri (chitosan, alginat, colageni, gelatină, glicozaminoglicani) combinați cu bioceramice, precum hidroxiapatită, fosfați de calciu, etc. Studii recente *in vitro* și *in vivo* au arătat că variantele de suport chitosan-alginat-hidroxiapatită (*Erickson et al, Biomed. Microdevices, 2019, 21:34*) și chitosan-fosfat tricalcic (*Yu et al, 2021, Adv. Wound Care, 10:401-414*) au stimulat viabilitatea și proliferarea celulelor normale și au prezentat potențial condrogenic și osteogenic.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este realizarea de materiale bioactive stabile în timp, cu proprietăți îmbunătățite pentru tratarea și refacerea defectelor osteocondrale și propune un nou hidrogel compozit biomimetic, în compoziția cărora sunt incluse bioceramici îmbunătățite cu siliciu combinate cu macromolecule componente sau derivate ale matricei extracelulare de tip condroitin sulfat, acid hialuronic și gelatină, în proporții bine definite, amestecurile fiind reticulate cu carbodiimidă și îmbunătățite din punct de vedere al proprietăților biologice prin asociere cu flavonoide (icariin, quercetin). Efectul sinergic al acestor componente conduce la obținerea unui preparat cu biocompatibilitate

ridicată, biodegradabilitate controlată, precum și proprietăți fizico-chimice și biologice optime pentru îmbunătățirea vindecării defectelor osteocondrale. În plus, compoziția realizată prin asocierea macromoleculor cu compuși bioactivi, precum icariin sau quercetin, flavonoide cu proprietăți similare cu cele ale factorilor de creștere celulari, prezintă efect crescut asupra proliferării celulare și a diferențierii osteogenice și condrogenice, astfel că propunerea de invenție reprezintă o nouă strategie pentru repararea defectelor osteocondrale.

**Compoziția de hidrogel compozit** pe bază de componente ceramice și naturale pentru regenerarea defectelor osteocondrale, conform invenției, este constituită din 20...40% bioceramici îmbogățite cu siliciu, alese între hidroxiapatită-siliciu, fosfat tricalcic-siliciu și akermanit, 20...50% gelatină de concentrație 10...20% din piele de porc cu greutatea moleculară medie de 100...220 kDa, 10...30% polizaharide de tip condroitin 6-sulfat cu greutatea moleculară medie de 25...50 kDa și acid hialuronic cu greutatea moleculară medie 750...2000 kDa, sau amestec al acestora în raport de greutate de 4:1...9:1 și 0,001...0,01% flavonoid ales între icariin și quercetin.

**Procedeul de obținere al produsului**, conform invenției, constă în aceea că se realizează un hidrogel compozit din bioceramici, gelatină și polizaharide și are la bază următoarele etape:

(a) obținerea bioceramicelor îmbogățite cu siliciu prin adăugarea acestui mineral în compoziția ceramicelor hidroxiapatită și fosfat tricalcic, folosind metoda co-precipitării a 10% oxid de siliciu folosind ca sursă silicatul de sodiu, soluția de siliciu coloidal Ludox As 40 sau tetra etil orto silicatul, la temperaturi și timpi adecvați (pentru hidroxiapatită-siliciu la temperatura camerei, pH 11, cu agitare continuă, iar pentru fosfat tricalcic-siliciu la pH 8, timp de 22 de ore). Akermanitul se prepară prin metoda de reacție în fază solidă prin amestecarea oxidului de calciu, oxidului de magneziu și dioxidului de siliciu, în raport stoechiometric, omogenizare la 300 rpm, uscare la 100 °C și tratament termic la 1200 °C, timp de 3...5 ore.

(b) prepararea amestecului de macromolecule matriceale prin amestecarea soluției de gelatină de concentrație 10...20% cu pulbere de condroitin sulfat și apoi cu acid hialuronic, în raport de combinare de 2:0,8:0,2...2:0,9:0,1 (g/g/g) cu agitare continuă, la temperatura de 30...50 °C, timp de 2...5 ore;

(c) obținerea compoziției de hidrogel prin adăugarea componentelor bioceramice peste amestecul de macromolecule matriceale preparat mai sus, în raport de combinare 1:1...1:2 (g/g), amestecarea se realizează la temperatura de 30...50 °C, cu agitare continuă;

(d) îmbunătățirea proprietăților biologice ale hidrogelului compozit prin adăugarea în

compoziția obținută a unui flavonoid, de preferință icariin sau quercetin, de concentrație 10 mg/ml, la temperatura de 20...40 °C;

(e) verificarea pH-ului amestecului compozit și ajustarea valorii acestuia în intervalul 6,5...7,4 cu o soluție de hidroxid de sodiu 0,5 M, după care se reticulează compoziția cu etil dimetilamino carbodiimidă de concentrație 5...15 mM, prin agitare timp de 3...5 ore, la temperatura de 20...40 °C.

(f) sterilizarea produsului prin expunere la radiații UV, folosind o incintă de sterilizare, timp de 5...10 ore.

### **Avantaje**

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- produsul obținut are în compoziția sa ceramici (hidroxiapatită, fosfat tricalcic, akermanit) îmbogățite cu siliciu, asociate cu macromolecule extrase din matricea extracelulară a țesuturilor conjunctive (gelatină, condroitin sulfat și acid hialuronic), în proporții bine definite, componente cu efect sinergic în tratamentul defectelor osteocondrale;

- hidrogelul realizează un contact strâns cu zona lezată și reprezintă un suport biopolimeric eficient pentru creșterea și migrarea celulelor normale din jurul răni, sintetizând astfel noul țesut;

- adăugarea de molecule bioactive mici de tipul flavonoidelor, cunoscute ca substituenți ai factorilor de creștere celulari, care influențează pozitiv viabilitatea, proliferarea și condrogenza celulelor țesutului subcondral, amplifică capacitatea de reparare a leziunilor osteocondrale;

- hidrogelurile compozite prezintă biocompatibilitate ridicată, biodegradabilitate controlată și stabilitate în timp;

- produsul este non-genotoxic și nu creează mediul prielnic de dezvoltare al microorganismelor la nivelul țesutului;

- procedeul de obținere este fezabil, are cost redus, nu necesită echipamente complexe și are durată redusă.

Prezenta propunere de invenție se ilustrează prin următoarele exemple:

### **Exemplul 1**

Se prepară 75 g de akermanit pulbere prin metoda de reacție în faza solidă folosind ca materii prime oxidul de calciu, oxidul de magneziu și dioxidul de siliciu, amestecate în raport stoechiometric, utilizând o moară cu bile. Raportul dintre materii prime: apă distilată: bile a fost

de 1:2:1, iar omogenizarea s-a făcut la 300 rpm. Amestecul obținut se usucă la 100 °C după care se supune tratamentului termic la 1200 °C, timp de 4 ore.

Într-un vas de inox prevăzut cu agitator și capacitatea de 2000 ml se prepară compoziția de macromolecule matriceale prin amestecarea a 1000 ml soluție de gelatină din piele de porc de concentrație 10% și greutatea moleculară medie de 120 kDa, cu 40 g pulbere de condroitin 6-sulfat cu greutatea moleculară medie de 30 kDa și 10 g pulbere de acid hialuronic cu greutatea moleculară medie de 1500 kDa. Obținerea acestei compoziții are loc cu agitare continuă, la temperatura de 50 °C, timp de 2 ore.

Separat, în alt vas de inox se prepară compoziția de hidrogel compozit prin adăugarea a 75 g pulbere de akermanit peste amestecul de macromolecule matriceale, obținut mai sus sub formă de gel, la temperatura de 40 °C, cu agitare continuă. După amestecarea completă, se adaugă la această temperatură 1,5 ml de icariin de concentrație 10 mg/ml, dizolvat în prealabil în soluție de dimetil sulfoxid. Se verifică pH-ului amestecului de hidrogel compozit și se ajustează la valoarea de 7,0 cu o soluție de hidroxid de sodiu 0,5 M, după care se amestecă cu carbodiimidă ca agent de reticulare de concentrație 10 mM, timp de 3 ore la temperatura de 30 °C, cu agitare. Hidrogelul astfel reticulat se sterilizează într-o incintă de sterilizare prin expunere la radiații UV, timp de 8 ore.

## Exemplul 2

Hidroxiapatita dopată cu siliciu se prepară prin metoda co-precipitării. Într-un vas de inox prevăzut cu agitator se prepară 500 ml soluție de 0,15 M carbonat de sodiu ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) peste care se adaugă, sub agitare, o soluție preparată, în prealabil, din fosfat acid de amoniu de concentrație 0,081 M  $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$  și o soluție de silicat de sodiu ce conține siliciu 10%. Reacția are loc cu agitare puternică la pH 11, valoare care se menține prin adăugarea unei soluții de amoniac 25%. Amestecul se agită la temperatura camerei, timp de 24 de ore și apoi precipitatul format se spală de trei ori cu apă distilată. Precipitatul alb se usucă timp de 24 ore la etuvă, la temperatura de 105 °C.

Separat, se prepară o soluție de macromolecule matriceale în condiții asemănătoare exemplului 1 prin amestecarea gelatinei de concentrație 12% și greutatea moleculară medie de 100 kDa cu pulbere de condroitin 6-sulfat cu greutatea moleculară medie de 25 kDa și apoi, pulbere de acid hialuronic cu greutatea moleculară medie de 1000 kDa, în raport de greutate de 2:0,7:0,3 g/g/g. Procedul de obținere al hidrogelului compozit și instalația necesară sunt similare cu cele de la exemplul 1 cu deosebirea că peste amestecul preparat mai sus se adaugă hidroxiapatita îmbogățită cu siliciu în raport de greutate componente matriceale:hidroxiapatită

de 2:1 g/g și se amestecă cu agitare, la temperatura de 30 °C, timp de 2 ore.

După amestecarea completă se adaugă în aceleași condiții 2 ml de icariin de concentrație 10 mg/ml, dizolvat în prealabil în soluție de DMSO. Se verifică pH-ului amestecului compozit de hidrogel și se ajustează la valoarea de 7,2 cu o soluție de hidroxid de sodiu 0,5 M, după care se amestecă cu carbodiimidă de concentrație 15 mM, timp de 4 ore, la temperatura de 30 °C, cu agitare. Hidrogelul astfel reticulat se sterilizează într-o incintă de sterilizare prin expunere la radiații UV, timp de 8 ore.

### Exemplul 3

Se prepară o soluție de fosfat tricalcic îmbogățit cu siliciu prin metoda co-precipitării. Inițial, se prepară 500 ml soluție de azotat de calciu 0,15M [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ], care se ajustează la pH 8 cu ajutorul unei soluții de amoniac 25%. Separat, se prepară un amestec format din soluție de fosfat de amoniu 0,09 M [ $\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ] și soluție de tetra etil orto silicat cu siliciu 0,01 M, care se adaugă, sub agitare, peste prima soluție. Soluția rezultată se agită la temperatura camerei, timp de 2 ore. Precipitatul rezultat se filtrează și se spală de trei ori cu apă distilată, după care se usucă la temperatura de 80 °C până la masă constantă. Tratamentul termic a fost realizat la 900 °C.

Se utilizează amestecul de gelatină, condroitin sulfat și acid hialuronic obținut în exemplul 1, etapa (b). Etapele procedurii de obținere sunt similare cu cele de la exemplul 1, cu deosebirea că, în etapa (a) se folosește ca ceramică pentru hidrogelul compozit fosfatul tricalcic îmbogățit cu siliciu, în raport de greutate de 1:2,5 g/g (ceramică/macromolecule naturale). Se adaugă apoi ca flavonoid 1,5 ml soluție de quercetin 10 mg/ml. Etapele de reticulare și sterilizare pentru hidrogelul compozit obținut sunt cele prezentate în exemplul 1.

Hidrogelurile compozite obținute conform exemplurilor de mai sus au fost caracterizate din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice, și anume ultrastructură, grad de reticulare, grad de gonflare și grad de biodegradare. Din punct de vedere al ultrastructurii, hidrogelurile reticulate au prezentat o structură compozită omogenă, densă și microporoasă. Gradul de reticulare al hidrogelurilor a fost evaluat prin determinarea spectrofotometrică a grupărilor amino libere prezente în materialul nereticulat (martor), comparativ cu cel reticulat. Față de proba martor, gradul de reticulare al hidrogelurilor compozite a fost de 30-40%, în funcție de tipul de bioceramică. Rezultatele au arătat că au un gradul de gonflare al hidrogelurilor compozite sintetizate a fost ridicat, permițând o absorbție a apei și o mărire a volumului cu 200-400%, ceea ce reprezintă o proprietate utilă în vindecarea rănilor. Gradul de biodegradare

al hidrogelurilor compozite a fost controlat în timp, datorită reticulării structurii polimerice cu carbodiimidă și a prezentat o creștere mai mică în timp scurt, comparativ cu martorul nereticulat, ceea ce ajută la refacerea noului țesut.

Noile hidrogeluri compozite au fost testate din punct de vedere al citotoxicității, genotoxicității și încărcăturii microbiene folosind modele experimentale *in vitro* pe culturi de celule animale, umane și bacteriene. Astfel, s-au investigat viabilitatea, proliferarea și aderarea celulară, precum și morfologia celulară în culturi de fibroblaste cultivate în prezența hidrogelurilor compozite timp de 72 de ore. Rezultatele obținute au demonstrat că hidrogelurile compozite au prezentat proprietăți considerabil îmbunătățite, favorizând viabilitatea, proliferarea și aderarea celulelor în vederea formării de țesut nou. Materialele nu prezintă genotoxicitate prin testul Comet și nici încărcătură microbiană după sterilizarea prin radiații UV timp de 8 ore.

De asemenea, s-a testat efectul hidrogelurilor compozite din punct de vedere al vindecării osteocondrale pe modele experimentale de co-cultură celule stem mezenchimale umane-celule endoteliale HUVEC umane. S-au investigat procesele de diferențiere osteogenică și condrogenică a celulelor stem mezenchimale, precum și de angiogeneză prin cultivare în prezența hidrogelurilor compozite timp de 21 de zile. Rezultatele au demonstrat potențialul hidrogelurilor compozite de a stimula procesele de vindecare la nivelul țesutului osos și cartilagos prin evidențierea markerilor specifici de fosfatază alcalină, collagen tip I și tip II, osteocalcin, mineralizarea matricei extracelulare, precum și capacitatea de formare a vaselor de sânge.



## REVENDICĂRI

1. Compoziția de hidrogel compozit pe bază de componente ceramice și naturale pentru regenerarea defectelor osteocondrale, conform invenției, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 20...40% bioceramici îmbogățite cu siliciu, alese între hidroxiapatită-siliciu, fosfat tricalcic-siliciu și akermanit, 20...50% gelatină de concentrație 10...20% din piele de porc cu greutatea moleculară medie de 100...220 kDa, 10...30% polizaharide de tip condroitin 6-sulfat cu greutatea moleculară medie de 25...50 kDa și acid hialuronic cu greutatea moleculară medie 750...2000 kDa, sau amestec al acestora în raport de greutate de 4:1...9:1 și 0,001...0,01% flavonoid ales între icariin și quercetin.

2. Procedul de obținere al produsului, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se realizează un hidrogel compozit din bioceramici, gelatină și polizaharide și are la bază următoarele etape: (a) obținerea bioceramicelor îmbogățite cu siliciu prin adăugarea acestui mineral în compoziția ceramicelor hidroxiapatită și fosfat tricalcic, folosind metoda coprecipitării a 10% oxid de siliciu folosind ca sursă silicatul de sodiu, soluția de siliciu coloidal Ludox As 40 sau tetra etil orto silicatul, la temperaturi și timpi adecvați (pentru hidroxiapatită-siliciu la temperatura camerei, pH 11, cu agitare continuă, iar pentru fosfat tricalcic-siliciu la pH 8, timp de 22 ore). Akermanitul se prepară prin metoda de reacție în faza solidă prin amestecarea oxidului de calciu, oxidului de magneziu și dioxidului de siliciu, în raport stoechiometric, omogenizare la 300 rpm, uscare la 100 °C și tratament termic la 1200 °C, timp de 3...5 ore; (b) prepararea amestecului de macromolecule matriceale prin amestecarea soluției de gelatină de concentrație 10...20% cu pulbere de condroitin sulfat și apoi cu acid hialuronic, în raport de combinare de 2:0,8:0,2...2:0,9:0,1 (g/g/g) cu agitare continuă, la temperatura de 30...50 °C, timp de 2...5 ore; (c) obținerea compoziției de hidrogel prin adăugarea componentelor bioceramice peste amestecul de macromolecule matriceale preparat mai sus, în raport de combinare 1:1...1:2 (g/g), amestecarea se realizează la temperatura de 30...50 °C, cu agitare continuă; (d) îmbunătățirea proprietăților biologice ale hidrogelului compozit prin adăugarea în compoziția obținută a unui flavonoid, de preferință icariin sau quercetin, de concentrație 10 mg/ml, temperatura de 20...40 °C; (e) verificarea pH-ului amestecului compozit și ajustarea valorii acestuia în intervalul 6,5...7,4 cu o soluție de hidroxid de sodiu 0,5 M, după care se reticulează compoziția cu etil dimetilamino carbodiimidă de concentrație 5...15 mM, prin agitare timp de 3...5 ore, la temperatura de 20...40 °C; (f) sterilizarea produsului prin expunere la radiații UV, folosind o incintă de sterilizare, timp de 5...10 ore.