



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00550**

(22) Data de depozit: **15/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2023 BOPI nr. **3/2023**

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

(72) Inventatori:
• **ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA,
NR. 43, BL.012, SC. B, ET.1, AP. 62,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RADU IONUȚ- CRISTIAN, NR.192,
SAT GLĂMBOCELU, COMUNA BOGAȚI,
AG, RO;**
• **ISTRĂȚOIU ELENA-ALEXANDRA,
ȘOS.NAȚIONALĂ, NR.149, CÂMPULUNG,
AG, RO;**

• **COSTACHE MARIETA, STR.TELIȚA
NR.12, BL.56, SC.4, ET.1, AP.46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IGNAT SIMONA REBECA,
STR.PODUL NEAGULUI, NR.49,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ȘERBAN MIRELA VIOLETA,
STR.VETERANILOR, NR.2, BL.M13, SC.1,
ET.7, AP.89, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **DINESCU SORINA, BD. 1 DECEMBRIE
1918, NR. 45, BL. J41, AP. 81, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE DE NOI BIONANOCOMPOZITE
PE BAZĂ DE ARGILE MODIFICATE ȘI POLIMERI
DESTINATE INGINERIEI ȚESUTULUI MOALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor bionanocompozite utilizate ca suporturi (scaffold) în domeniul ingineriei tisulare pentru regenerarea țesuturilor moi. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare a unei soluții de fibroină de concentrație 2%, obținere a argilei hidroxid dublu stratificat (LDH), modificarea argilei LDH cu 1,2-anhidrida acidului 1,2,4-benzen-tricarboxilic (LDH-TA), modificare a LDH-TA cu monomer 2-hidroxietil metacrilat (HEMA), reacția sol-gel de polimerizare radicalică liberă prin contactarea cu agitare a soluției de fibroină în amestec

cu agent de reticulare (AMPSA), inițiator (PK), HEMA și sericină cu dispersia de argilă LDH-TA-HEMA, timp de 48 h la temperatura de 60°C, rezultând nanocompozite de tip hidrogel cu structură de rețea polimerică sintetică de HEMA și AMPSA în asociere cu polimeri naturali sericină și fibroină, care asigură compatibilitate cu țesuturile moi prin atașare și proliferarea celulară, iar structura internă reticulată asigură rezistența mecanică.

Revendicări: 3
Figuri: 6



**PROCEDEU DE OBTINERE DE NOI BIONANOCOMPOZITE PE BAZA DE ARGILE
MODIFICATE SI POLIMERI DESTINATE INGINERIEI TESUTULUI MOALE**

Inventia se refera la **dezvoltarea de bionanocompozite polimerice cu continut de argile pentru potentiale aplicatii in ingineria tisulara**. Conform inventiei, biomaterialele au rol de suport in ingineria tesutului moale prin sustinerea dezvoltarii tesutului biologic. Bionanocompozitele gandite pentru aceasta aplicatie sunt formate din mai multe componente: **argila sintetica de tip hidroxizi dublu stratificati (LDH)** modificata pe suprafata cu agenti de organofilizare (anhidrida) si agenti de cuplare (HEMA); **polimeri sintetici** de tipul poli (2-hidroxietilmetacrilat) (PHEMA) si poli(2-acrilamido-2-metil-1-propan acid sulfonic) (PAMPSA); **polimeri naturali** obtinuti din matasea naturala (**fibroina si sericina**).

Particulele de argila de tip LDH sunt modificate pe suprafata cu diferiti agenti astfel incat sa prezinte legaturi chimice duble care pot participa la o reactie de polimerizare/reticulare. Procedura de obtinere a bionanocompozitelor presupune doua etape bine stabilite: modificarea argilei si realizarea propriu-zisa a biomaterialelor. Argila LDH a fost modificata pe suprafata prin reactia cu 1, 2-anhidrida acidului 1, 2, 4 benzen-tricarboxilic. Produsul rezultat (LDH-anh) a fost reactionat cu monomerul 2-hidroxietilmetacrilat pentru obtinerea produsului final (LDH-anh-HEMA). A doua parte a procedurii a presupus reactia dintre argila modificata (LDH-anh-HEMA), 2 monomeri sintetici si 2 polimeri naturali, in prezenta initiatorului persulfat de potasiu (1% concentratie procentuala fata de masa de monomer). Cei doi monomeri sintetici adaugati (**HEMA si AMPSA in raport molar 97:3 si 95:5**) duc la formarea polimerilor sintetici PHEMA si PAMPSA. Au fost realizate doua sisteme cu concentratii diferite de monomer care duc la formarea de biomateriale cu caracteristici diferite. Reactia de polimerizare este in mediu apos, iar concentratia totala a celor doi monomeri este de **2 mol/L** si **5 mol/L**, cate una pentru fiecare sistem. Concentratia argilei modificate in fiecare sistem a fost de 1% fata de volumul amestecului de reactie. Cei doi polimeri naturali au urmatoarele concentratii: **sericina 0,5% fata de volumul amestecului de reactie; fibroina este adaugata sub forma de solutie 2%**, iar volumul solutiei este de 15% din volumul amestecului de reactie. Bionanocompozitele la care se refera inventia sunt obtinute prin polimerizare la temperatura de 60 °C.

DESCRIERE

Scaffold-urile prezinta o importanta deosebita in domeniul ingineriei tisulare deoarece sunt capabile sa asigure succesul si functionalitatea implanturilor vii obtinute cu ajutorul culturilor celulare. Aceste suporturi necesita anumite forme si morfologii, atat la exterior cat si la interior. Morfologia exteriorului trebuie sa asigure aderarea celulara, iar interiorul trebuie sa prezinte o structura poroasa interconectata. Intreaga dezvoltare a acestor materiale cu destinatii speciale si tintite este cuprinsa in domeniul ingineriei tisulare. Acest domeniul este strans legat de proiectarea materialelor optime pentru refacerea unor tesuturi care prezinta defecte din diferite cauze: patologii variate sau traume de diferite feluri [1-2]. In prezent, metodele de tratament pentru astfel de afectiuni prezinta o serie de limitari si provocari menite sa fie depasite. Principala abordare folosita pe scara larga este utilizarea autogrefelor. Aceasta tehnica pune serioase semne de intrebare legate de zona selectata pentru donare si toate consecintele care tin de procedeu. In acest sens, ingineria tisulara ofera noi solutii prin dezvoltarea de suporturi sintetice sau naturale bioactive care pot sustine dezvoltarea de tesut nou in zona afectata. Aceste suporturi sintetice trebuie sa asigure atat refacerea structurii cat si a functiei zonei afectate. Domeniul ingineriei tisulare abordeaza obtinerea de suporturi care pot fi directionate pentru regenerarea diferitelor tipuri de tesuturi in functie de caracteristicile tesutului natural. Ingineria tesutului moale este o directie extrem de importanta care se ocupa cu proiectarea suporturilor sintetice sau naturale pentru regenerarea unor tesuturi moi precum pielea [3-5]. Suporturile create trebuie sa tina seama de proprietatile, functiile si caracteristicile tesutului natural. Astfel, proprietatile mecanice sunt definitorii pentru compararea suportului nou creat cu tesutul care trebuie inlocuit. Suporturile proiectate pentru inlocuirea tesuturilor moi sunt realizate in general pe baza de polimeri sintetici, naturali, combinatii sintetic-natural sau materiale compozite. Hidrogelurile reprezinta o alegere importanta a cercetatorilor atunci cand se doreste dezvoltarea de materiale care sa imite tesuturile moi. Acestea au caracter hidrofil, absorb apa si au un raspuns mecanic dinamic asemanator cu cel al tesuturilor naturale moi. Materialele compozite si nanocompozite sunt abordari noi care tin seama de proprietatile mecanice pe care trebuie sa le prezinte un astfel de suport. In anumite situatii (grad de gonflare ridicat), hidrogelurile pot avea o rezistenta mecanica sub cele necesare unui suport conform. Materiale compozite au in compozitie agenti de armare care asigura cresterea proprietatilor mecanice si un raspuns mecanic mai bun in comparatie cu cel al hidrogelurilor.



Stadiul tehnicii

Literatura de specialitate prezinta numeroase brevete in care au fost dezvoltate suporturi (scaffold-uri) pentru ingineria tesutului moale care au la baza diferiti polimeri:

Brevetul **US20110293685A1** descrie metodele si compozitiile a trei noi suporturi poroase tridimensionale folosite in regenerarea si repararea tesuturilor. Fibrele polimerice obtinute pe baza electrofilarii stau la baza acestor noi materiale. Astfel, fibrele sunt obtinute sub forma unor role cu forme variate si sunt insamantate cu celulele specifice. Suporturile sunt destinate inlocuirii unor tesuturi moi variate precum muschii, tendoanele sau nervii. Principalele materiale utilizate sunt polimeri biodegradabili precum poliesterii alifatici: acid polilactic, acid poliglicolic, policaprolactona, etc. Acesti polimeri duc la obtinerea unor materiale fibroase cu rezistenta mecanica deosebita si o inalta biocompatibilitate.

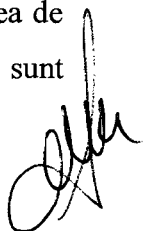
In brevetul **WO2018041784A1** se prezinta inventia unei combinatii de materiale polimerice cu rol de support in ingineria tisulara. Materialul este compus din polimer natural, albumina, cu capacitate de reticulare, si un polimer sintetic care contine unitati compatibile cu procesul de reticulare al albuminei. Sistemul este realizat astfel incat cei doi polimeri sa poata forma o retea reticulata.

Brevetul **US20060286144A1** descrie obtinerea unor suporturi pe baza de polimeri. Suportul pe baza de colagen, o proteina animala, a fost armat cu polimeri sintetici. Materialul a fost astfel imbunatatit cu capacitatea de a interactiona cu proteinele din organism si de a livra agenti bioactivi. Asocierea dintre colagen si polimeri sintetici asigura integritate materialului si proprietati mecanice superioare. Suportul a fost incarcat cu agenti bioactivi (factori de crestere) cu scopul de a creste performantele si capacitatea de bioadeziune.

Brevetul **EP2532703A1** evidentiaza un model de obtinere a unui suport stratificat (lamelar) compus din polimeri sintetici si naturali. Suportul are forma de membrana polimerica si este format din straturi micronice cu morfologie si orientare speciala. Astfel de materiale sunt utilizate pentru tesuturi importante precum corneea, tendoane sau piele in cadrul unor procese de refacere a tesutului natural deteriorat sau pierdut.

Brevetul **US20120264689A1** prezinta compozitia unui suport care induce si sustine diferentierea si cresterea celulara. Sistemul contine un factor de crestere cu activitate biologica farmacologica precum IGF-1 (factorul de crestere al insulinei). In acest sens, suportul este format din hialuronan in care se incarca nanoparticule polimerice ce contin factorul de crestere. In acest caz, suportul este tintit pentru refacerea si regenerarea tesutului dermal. Nanoparticulele polimerice elibereaza factorul de crestere si produce activarea celulelor stem pentru diferentiere in noi celule dermale.

Ca o concluzie a stadiului tehnicii, se poate afirma faptul ca brevetele ce propun dezvoltarea de suporturi (scaffold-uri) pe baza de materiale polimerice cu inalta biocompatibilitate sunt



preponderent axate pe refacerea si regenerarea tisulara in ingineria tesuturilor moi. In literatura sunt putine sisteme care au la baza bionanocompozite de origine organica/anorganica cu proprietati speciale, iar prezenta propunere de brevet abordeaza exact aceasta nisa.

Problema tehnica pe care o rezolva prezenta inventie consta in obtinerea de suporturi (scaffold-uri) pe baza de materiale nanocompozite sub forma de hidrogeluri capabile sa sustina refacerea si regenerarea tesuturilor moi prin insamantarea cu linii celulare specifice. Biomaterialele nanocompozite au la baza o structura de hidrogel armat cu argile minerale modificate pe suprafata pentru imbunatatirea proprietatilor mecanice. Reteaua reticulata a hidrogelurilor nanocompozite asigura o morfologie speciala cu porozitate controlabila. Mai mult, biomaterialele contin o asociere de polimeri sintetici si naturali (fibroina si sericina din matasea naturala) care asigura atat integritatea mecanica, dar si o inalta biocompatibilitate. Modificarea chimica a argilei asigura o legare chimica a celor doua componente din materialul nanocompozit: faza organica si cea anorganica. Acest lucru asigura o rezistenta si flexibilitate superioare altor materiale de tip hidrogel. Aceste caracteristici sunt foarte apropiate de cele ale tesuturilor moi. Morfologia suprafetei si inalta biocompatibilitate a celor doi polimeri naturali (proteine din matase) asigura atasarea si proliferarea celulara, iar structura interna reticulata asigura rezistenta mecanica.

Matasea naturala este un material proteic fibros, cunoscuta in industria textile datorita luciului ei si a proprietatilor mecanice remarcabile, fiind produsa de o varietate de organisme, incluzand viermii de matase si paianjenii [6]. Matasea e produsa de clasa *Arahnidelor* (peste 30000 de specii de paianjeni) si de cativa viermi din categoria *Lepidoptera*, ce include acarieni, fluturi si molii. Matasea este sintetizata in celule epiteliale specializate [7]. În zilele noastre mătasea se folosește în principal în industria textilă datorită caracteristicilor ei, rezistență, luciu, conductivitate mică la căldură și adsorbanța la umezeală. Pe lângă acestea se folosește la decorațiuni interioare, la biciclete și material de armare. Cel mai important aspect se refera la utilizarea la scară largă ca material biomedical in zilele noastre, în special în ingineria țesuturilor și în medicina regenerativă. Sutura de matase este cel mai simplu biomaterial folosit in diversele tipuri de chirurgii.

Hidrogelurile sunt rețele polimerice tridimensionale ce absorb si retin o mare cantitate de apa sau solutii apoase, dar nu se dizolva in aceste solutii [8]. In general, hidrogelurile se obtin prin reticularea chimica sau fizica a lantului polimeric. Este esential sa se determine caracteristicile fundamentale ale hidrogelului inainte de a se studia pentru potentialul sau biomedical. Proprietatile majore care trebuie investigate pentru un hidrogel sunt porozitatea, continutul de apa si gradul de gonflare, dimensiunea si forma, proprietatile mecanice si reologice, biocompatibilitatea si biodegradabilitatea. Nu este suficienta determinarea proprietatilor initiale ale hidrogelului, dar si

modul in care acestea variaza pe timpul utilizarii hidrogelului. Aceste proprietati cat si dinamica lor influenteaza comportamentul spatio-temporal al hidrogelului, ducand la utilizarea lui in aplicatii specifice. Deoarece conditiile de obtinere influenteaza foarte mult caracteristicile hidrogelurilor, este de dorit sa existe un control strict asupra acestora [9].

Argilele sunt compusi care se gasesc pe toata suprafata pamantului si de aceea reprezinta componenta principala a solului si a rocilor sedimentare. Argila este tradițional clasificată la silicați, dar cum compoziția chimică conține mai mult oxigen decât Si, Al sau Mg aceste minerale sunt considerate ca fiind oxizii sau chiar hidroxizii lor. Principalele proprietati ale mineralelor de argila sunt structura cristalina si dimensiunea coloidala. Aceste proprietati sunt traduse prin suprafata specifica ridicata, proprietati reologice optime si capacitate mare de adsorbție. Toate aceste proprietati fac ca argilele cationice sau anionice sa fie foarte folositoare intr-o gama mare de aplicatii [10-12].

Concluzionand datele de literatura prezentate mai sus, propunerea de brevet se refera la obtinerea unor modele de suporturi (scaffold-uri) pentru pentru regenerarea si regenerarea tesutului moale. Modelul propus este constituit sub forma unui hidrogel bionanocompozit ce are la baza polimeri sintetici, naturali (proteine din matase) si argile de tip hidroxizi dublu stratificati (LDH) modificate chimic pe suprafata. Aceste tipuri de nanocompozite combina avantajele hidrogelurilor polimerice cu cele ale nanocompozitelor speciale din punct de vedere al raspunsului biologic si proprietatilor mecanice. Modelele de suport dezvoltate au fost testate si biologic din punct de vedere al biocompatibilitatii prin evaluarea viabilitatii, nivelului de citotoxicitate si prin marcarea celulelor vii si a nucleilor celulelor moarte care au fost insamantate.

In continuare vor fi descrise materialele utilizate in studiul experimental cat si metodele necesare pentru obtinerea si testarea materialelor descrise in cererea de brevet.

2. EXEMPLE DE OBTINERE BIONANOCOMPOZITE IN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENTIE

2.1 Materiale folosite in obtinerea bionanocompozitelor

Materialele folosite pentru realizarea cererii de brevet sunt urmatoarele: 2-hidroxietilmetacrilat (HEMA), 2-acrilamido-2-metil-1-propan acid sulfonic (AMPSA), hidroxizi dublu stratificati (LDH), fibroina, sericina, 1, 2-anhidrida acidului 1, 2, 4 benzen-tricarboxilic, clorura de aluminiu, clorura de cobalt. Alte materiale si substante folosite: hidroxid de sodiu, fosfat acid de potasiu, apa,

acid clorhidric, bromura de litiu, carbonat si bicarbonat de sodiu, dodecil sulfat de sodiu, acetona, persulfat de potasiu.

Sericina este o glicoproteina, sub forma de clei solubil in apa, ce leaga fibrele de proteina, in timp ce fibroina este proteina structurala a fibrei de matase ce este insolubila in apa. Sericina reprezinta 20-30% din matasea provenita de la viermele de matase. Sericina are un rol functional in acoperirea si adeziunea filamentelor gemene de fibroina [13-16], de protejare a coconului de degradare microbiana, de digestia animala si de conditiile nefavorabile de mediu. De asemenea, mai are si alte proprietati precum rezistenta la lumina ultraviolet si oxidare si abilitatea de a absorbi si elibera umiditatea usor. Sericina este compusa din 18 aminoacizi, 80% reprezentand serina, acid aspartic si glicina, oferind bune proprietati de absorbtie a umiditatii.

Fibroina este proteina structurala principala a fibrei de matase si este insolubila in majoritatea solventilor, inclusiv in apa. Fibroina este o proteina macromoleculara cu masa moleculara mare, formata din mai mult de 5000 de aminoacizi si reprezinta aproximativ 75% din compozitia matasii. Fibroina prezinta o zona cristalina (~66%) si o zona amorfa (~33%). Fibroina pe baza de matase a fost folosita cu succes in domeniul biomedical ca material de sutura timp de decenii si astfel a fost recent explorata ca un suport polimeric pentru ingineria tesuturilor si eliberarea de medicamente [17-20].

Hidroizii dublu stratificati (LDH) mai sunt numiti si argile anionice datorita proprietatilor chimice si fizice unice care sunt surprinzator de apropiate de cele ale mineralelor de argila. Clasificarea de tip hidrotalcit (HT) este de asemenea foarte intalnita, probabil datorita faptului ca majoritatea caracterizarilor au fost facute pe hidrotalcit (hidroxicarbonat de Mg,Al) si datorita faptului ca se poate sintetiza usor si ieftin. Hidroizii dublu stratificati (LDH) sunt argile stratificate in care straturile de argila sunt incarcate cu sarcini pozitive ale unor cationi divalenti precum Mg, Co, Ni partial substituiti de cationi trivalenti precum Al, Fe, Cr, iar intre straturi se gasesc anioni. Ionii care compenseaza sarcinile pozitive ale straturilor de argila pot fi indepartati fara a distruge structura stratificata a LDH-ului si difera de argilele incarcate negativ prin densitatea de sarcina [21].

Poli(2-hidroxietil metacrilat) (PHEMA) alaturi de polimetilmetacrilati este unul dintre cei mai utilizati polimeri sintetici in aplicatii biomedicale. Principalele avantaje ale acestui polimer sintetic tin de inalta biocompatibilitate si faptul ca nu este toxic. Monomerul, 2-hidroxietil metacrilatul (HEMA), poate fi usor polimerizat sau copolimerizat, iar functiunile esterice permit formarea de noi derivati de HEMA cu legatura dubla. PHEMA permite la randul sau asemenea grefari, ceea ce conduce la formarea unei game largi de derivati PHEMA pentru multiple aplicatii biomedicale [22].



2.2. Metode de lucru

2.2.1. Obținerea soluției de fibroina

Fibrele din mătase au fost obținute din viermii de mătase *Bombyx mori*. Coconii de matase au fost degomati prin spălare de patru ori în soluție apoasă de Na_2CO_3 , NaHCO_3 și dodecil sulfat de sodiu la $100\text{ }^\circ\text{C}$. O soluție de LiBr în apă cu o concentrație de 9,3M a fost obținută. Mătasea degomată a fost dizolvată în 30mL de LiBr pentru a obține soluție de fibroină de concentrație 2%. Soluția de fibroină a fost supusă dializei în apă distilată timp de șapte zile.

2.2.2. Obținerea argilei LDH

Obținerea de hidroxid dublu stratificat (LDH) este realizată prin metoda coprecipitării. În acest sens, o soluție de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a fost obținută în apă. O a doua soluție a fost obținută prin dizolvarea NaOH în apă sub agitare. Valoarea pH-ului a fost menținută în jur de 10 și amestecul a fost agitat timp de 22 de ore la $80\text{ }^\circ\text{C}$. Precipitatul a fost filtrat și spălat cu apă caldă și apoi uscat timp de 48 de ore la temperatura camerei.

2.2.3. Modificarea suprafeței argilei LDH cu 1, 2-anhidrida acidului 1, 2, 4 benzen-tricarboxilic (LDH-TA)

Reacția de modificare implică dispersarea argilei LDH în acetona (conc. 0,5%). În același timp, grupele hidroxil de pe suprafața argilei au fost activate prin adăugarea de acid clorhidric 0,1M. Concentrația de acid clorhidric în soluția finală a fost de 10% v/v iar pH-ul a atins valoarea 3. Anhidrida a fost adăugată în soluția de acetona în raport TA:LDH – 4:1 (w/w). Reacția de modificare a durat 48 de ore la temperatura camerei. Produsul de sinteză a fost purificat prin spălare pe filtru cu acetona și uscat la $60\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.4. Reacția de modificare a LDH-TA cu monomerul HEMA (LDH-TA-HEMA)

Argila inițial modificată, LDH-TA, a fost supusă unei noi modificări a suprafeței prin legarea monomerului HEMA de grupele carboxil. Ideea de bază a acestei modificări a fost introducerea de duble legături polimerizabile pe suprafața argilei. În acest sens, argila LDH-TA a fost adăugată în monomerul HEMA care are și rol de reactant și mediu de reacție. Dispersarea argilei a fost făcută prin sonicare timp de o oră. Concentrația argilei în mediul de reacție este de 0,3%. În paralel, a fost preparat un amestec acetona-acid clorhidric 0,1M (4:1 v/v) cu rol de mediu acid și creșterea gradului de dispersare a argilei. Cele două medii au fost puse împreună și reacția durează 24 de ore la temperatura camerei. Produsul final a fost filtrat, spălat de câteva ori cu acetona și uscat.

2.2.5. Prepararea hidrogelurilor nanocompozite cu rol de suport

Hidrogelurile nanocompozite au fost obținute printr-o reacție sol-gel de polimerizare radicalică liberă în care dublele legături de pe suprafața argilei participă la reacția de creștere a

macromoleculilor. În urma reacției se formează o structură rețiculată prin metoda de „grafting through” în care agentul de armare modificat are și rol de agent de rețiculare. Pe scurt, o soluție de fibroină de concentrație 2% (w/v) este preparată. Monomerul AMPSA este dizolvat în soluția de fibroină urmat de adăugarea inițiatorului (KP), a monomerului HEMA și a sericinei. În paralel, a fost pregătită dispersia de argilă LDH-TA-HEMA în apă prin sonicare timp de o oră. Cele două amestecuri sunt puse împreună și lăuate la agitat. Amestecul final este injectat într-o matrită de sticlă, iar acesata este plasată într-o etuvă. Reacția durează aproximativ 48 de ore la temperatura de 60 °C. Hidrogelurile nanocompozite obținute sunt purificate prin adăugarea lor într-un volum mare de apă pentru îndepărtarea monomerului nereacționat. Mai departe, probele gonflabile sunt înghețate în congelator și supuse procesului de liofilizare (-80°C/10⁻² mbar).

2.2.6. Caracterizarea fizico-chimică a argilelor prin spectroscopie FTIR

Argila LDH cât și formele modificate pe suprafață, LDH-TA și LDH-TA-HEMA, au fost investigate din punct de vedere fizico-chimic. În același timp au fost investigate și materiile prime TA și HEMA. Analiza a avut loc pe un aparat Bruker Vertex 70 FT-IR spectrometru cu o rezoluție la 4 cm⁻¹ și 32 de scanări consecutive (FTIR).

2.2.7. Caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor nanocompozite prin spectroscopie FTIR

Hidrogelurile nanocompozite cu diferite compoziții și concentrații molare au fost și ele investigate pe un aparat Bruker Vertex 70 FT-IR spectrometru cu o rezoluție la 4 cm⁻¹ și 32 de scanări consecutive (FTIR).

2.2.8. Evaluarea comportamentului la gonflare al hidrogelurilor nanocompozite

Hidrogelurile nanocompozite cu diferite compoziții și concentrații molare au fost evaluate și din punct de vedere al comportamentului la gonflare într-o soluție tampon la temperatura de 37 °C.

2.2.9. Evaluarea biocompatibilității și citotoxicității modelului de suport dezvoltat

Celule stem izolate din țesut adipos (ASC) au fost însămânțate pe materiale cu diferite rapoarte molare și concentrații numite M1-M4 (Tabelul 1) și a fost evaluată biocompatibilitatea prin teste cantitative (MTT, LDH) și calitative (Live/Dead) după 3 (T1) și 6 zile (T2) de la însămânțare.

3. REZULTATE OBTINUTE ÎN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENTIE

3.1. Modificarea suprafeței argilei LDH și obținerea hidrogelurilor nanocompozite

În cadrul cererii de brevet au fost obținute modele de hidrogeluri nanocompozite cu rol de suport în ingineria tisulară. Biomaterialele au compoziții și concentrații molare variate. Compoziția principală pune în evidență cele două raporturi ale monomerilor HEMA și AMPSA (95/5 și 97/3) iar concentrația molară arată concentrația totală a celor doi monomeri într-un litru de amestec (2 și 5 moli/Litru). Cele două proteine din matase au următoarele concentrații: sericina 0,5% față de volumul amestecului de reacție; fibroina este adăugată sub formă de soluție 2%, iar volumul soluției

este 15% din volumul amestecului de reactie. Compozitia biomaterialelor este descrisa detaliat in Tabelul 1. Argila cu rol de agent de armare si agent de reticulare a fost obtinuta prin reactii in doua etape: sinteza LDH-TA si sinteza LDH-TA-HEMA.

3.2. Caracterizarea fizico-chimica a argilelor LDH, LDH-TA, LDH-TA-HEMA si ale materiilor prime prin spectroscopie FTIR

Analiza FTIR prezinta spectrul anhidridei TA cu principalele maxime caracteristice: doua maxime cu intensitate mica la 3600 cm^{-1} si la 3548 cm^{-1} care pot fi atribuite vibratiilor de intindere ale legaturii hidroxil; patru maxime intre 2985 cm^{-1} si 2545 cm^{-1} specifice pentru vibratia de intindere asimetrica si simetrica a legaturii C-H; doua maxime la 1863 cm^{-1} si la 1837 cm^{-1} atribuite vibratiei asimetrice de intinderea a legaturii C=O din cetona si un maxim la 1773 cm^{-1} corespunzator vibratiei simetrice de intinderea a legaturii C=O din cetona; un maxim la 1692 cm^{-1} atribuit legaturii C=O din gruparea carboxil; doua maxime la 1576 cm^{-1} si 1503 cm^{-1} corespunzatoare vibratiei de intindere a inelului aromatic; un maxim la 1411 cm^{-1} atribuit vibratiei de deformare a gruparii hidroxil; cateva maxime in regiunea 1291 cm^{-1} si 1231 cm^{-1} corespunzatoare legaturii eterice C-OC. Spectrul argilei LDH este mult mai sarac in maxime specific datorita naturii anorganice. Astfel, spectrul prezinta maxime la 3394 cm^{-1} corespunzatoare pentru vibratia de intindere a legaturii hidroxil; un maxim la 1630 cm^{-1} corespunzator pentru vibratia de deformare a legaturii hidroxil; un maxim la 1368 cm^{-1} specific pentru moleculele organice adsorbate pe suprafata. Spectrul argilei modificate LD-TA arata maxime la 3600 cm^{-1} si 3478 cm^{-1} ceea ce poate insemna hidroliza gruparii anhidridice de pe suprafata argilei; maximul de la 1682 cm^{-1} este specific pentru vibratia de intindere a gruparii C=O din structura esterului si acidului provenit de la anhidrida; doua maxime la 1542 cm^{-1} si 1475 cm^{-1} corespunzatoare pentru vibratia nucleului aromatic al anhidridei TA; maximul de la 1225 cm^{-1} poate insemna vibratia de intindere a unei legaturi esterice care sa arate legarea anhidridei pe suprafata argilei. Spectrul monomerului HEMA prezinta urmatoarele maxime: un maxim la 3424 cm^{-1} corespunzator pentru vibratia de intindere a legaturii O-H; maxime specific pentru vibratia de intindere a legaturii C-H la 2958 cm^{-1} si 2931 cm^{-1} ; un maxim la 1718 cm^{-1} atribuit pentru vibratia de intindere a legaturii C=O din ester; maxim specific legaturii C=C la 1636 cm^{-1} ; maxime specifice vibratiilor de deformare C-H si de intindere C-O. Spectrul argilei finale, LDH-TA-HEMA, prezinta urmatoarele maxime: doua maxime la 3393 cm^{-1} si 2981 cm^{-1} corespunzatoare pentru gruparea hidroxil si vibratia legaturii C-H; un maxim la 1703 cm^{-1} atribuit pentru vibratia legaturii C=O; un maxim la 1596 cm^{-1} corespunzatori vibratiilor nucleului aromatic. Maximele corespunzatoare gruparii carboxil au disparut, ceea ce poate insemna legarea de grupele hidroxil ale monomerului HEMA. Reactia de modificare nu este totala, lucru indicat de maximele specifice pentru grupele hidroxil libere.

3.3. Caracterizarea fizico-chimica a hidrogelurilor nanocompozite prin spectroscopie FTIR

Spectrele hidrogelurilor nanocompozite nu prezintă diferențe semnificative în funcție de compoziție și rapoarte molare diferite. În acest sens, apar maximele de la 3419 cm^{-1} , 2980 cm^{-1} și 2948 cm^{-1} specifice pentru vibrațiile de întindere ale legăturilor O-H și C-H. Maximul de la 1722 cm^{-1} arată prezența grupării C=O din grupele carbonil ale unităților de HEMA. Maximul de la 1580 cm^{-1} corespunde vibrației legăturii N-H din unitățile de AMPSA. Mai multe maxime în regiunea 1400 cm^{-1} specifice pentru vibrația de deformare a legăturii C-H din grupe metil și metilen. Maximul de la 1249 cm^{-1} este specific pentru legătura C-N din proteine.

3.4. Evaluarea comportamentului la gonflare al hidrogelurilor nanocompozite

Comportamentul la gonflare este foarte important pentru estimarea comportamentului biomaterialelor în timpul utilizării ca suport (Fig. 5 și Tabel 2). Probele uscate au fost imersate în soluție tampon și cântărite la diferite intervale de timp. În cazul probelor cu concentrația molară de 2%, gradul de gonflare este mai mare pentru compoziția cu un raport AMPSA mai mic. Acest rezultat este nespecific pentru situația unei rețele clasice cu o cantitate mai mare de monomer hidrofil. Explicația reiese din faptul că rețeaua hidrogelului nanocompozit este realizată de un agent de reticulare anorganic modificat (argila). Acest lucru arată faptul că rețeaua este mai densă în cazul în care se folosește mai mult monomer AMPSA probabil datorită unei dispersii a argilei. În cazul probelor cu concentrația molară de 5%, gradul de gonflare este mai mare pentru compoziția cu un raport AMPSA mai mare. Acest rezultat respectă situația rețelelor cu o cantitate mai mare de monomer hidrofil. Rețeaua polimerică este probabil mai densă pentru situația în care apare o cantitate mai mică de AMPSA.

3.5. Evaluarea biocompatibilității și citotoxicității a modelului de suport dezvoltat

În urma realizării testului MTT, la T1 și T2, pe materialele M3 și M4 s-au înregistrat cele mai mari niveluri ale viabilității celulare față de celelalte două materiale (fig. 6). Materialul M3 a promovat cel mai ridicat nivel de viabilitate celulară, sugerând faptul că este un suport favorabil celulelor. Rata de proliferare celulară a crescut de la 3 la 6 zile, pe toate materialele investigate, dar s-a remarcat o rată de proliferare semnificativ mai mare pe materialele M3 și M4 față de M1 și M2. Prin testul LDH, s-a observat faptul că M1 și M2 au indus cele mai mari niveluri de citotoxicitate, atât la T1, cât și la T2, sugerând condițiile nefavorabile celulelor, induse de compoziția materialelor. Nivelul cel mai scăzut al citotoxicității a fost indus de materialul M3, confirmând și rezultatele obținute prin testul MTT. Prin testul Live Dead au fost evidențiate prin microscopie de fluorescență, celulele vii (verde) și nucleii celulelor moarte (roșu). După 3 zile de la însămânțare, pe M1 și M2, au fost observate cele mai puține celule vii comparat cu M3 și M4, dispuse individual. Pe M3 și M4, celulele vii au fost dispuse în grupuri, ceea ce a favorizat viabilitatea și proliferarea celulară.

Cele mai multe celule vii au fost observate pe M3, rezultate care confirmă datele obținute prin testele cantitative. La T2, s-a observat o creștere a numărului de celule vii față de de T1, pe toate materialele investigate. Totuși, cele mai multe celule vii au fost observate pe M3 și M4, ceea ce sugerează superioritatea compoziției acestor materiale față de M1 și M2. Pe baza acestor rezultate, a fost confirmat biocompatibilitatea materialelor M1-M4, cu cele mai bune rezultate obținute pentru M3 și M4.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obtinute in urma realizării acestor studii se pot formula urmatoarele concluzii:

- Au fost obtinute hidrogeluri nanocompozite cu concentratii molare de 2% si 5%.
- Au fost obtinute hidrogeluri nanocompozite cu rapoarte molare intre cei doi monomeri de 95/5 si 97/3 (HEMA/AMPSA).
- A fost realizata modificarea chimica a suprafetei argilei LDH in doua etape: LDH-TA si LDH-TA-HEMA.
- Biomaterialele au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic (FTIR) si al comportamentului la gonflare
- A fost realizata evaluarea biocompatibilitatii si citotoxicitatii biomaterialelor dezvoltate

Aceste biomateriale au proprietati imbunatatite pentru domeniul ingineriei tisulare in cazul refacerii si regenerarii tesuturilor moi.

REFERINTE BIBLIOGRAFICE

1. R. Landers, A. Pfister, U. Hübner, H. John, R. Schmelzeisen, R. Mülhaupt, Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques, *Journal of Materials Science*, vol. 37, 2002, 3107 – 3116
2. Todd Courtney, Michael S.Sacks, JohnStankus, Jianjun Guan, William R.Wagner, Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy, *Biomaterials*, vol. 27, 2006, 3631-3638
3. Rohit T. Rao, Daniel P. Browe, Christopher J. Lowe, and Joseph W. Freeman, An Overview of Recent Patents on Musculoskeletal Interface Tissue Engineering, *Connect Tissue Res.*, vol. 57, 2016, 53–67.
4. Jennifer H. Choi, Jeffrey M. Gimble, Kyongbum Lee, Kacey G. Marra, J. Peter Rubin, James J. Yoo, Gordana Vunjak-Novakovic, David L. Kaplan, Adipose Tissue Engineering for Soft Tissue Regeneration, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 16, 2018,
5. Rishabha Malviya, Pramod Kumar Sharma, Susheel Kumar Dubey, Modification of polysaccharides: Pharmaceutical and tissue engineering applications with commercial utility (patents), *Materials Science and Engineering: C*, vol. 68, 2016, 929-938
6. V. Kearns, A.C. MacIntosh, A. Crawford, P.V. Hatton, *Silk-based Biomaterials for Tissue Engineering*, 2008
7. Charu Vepari, David L. Kaplan, Silk as a biomaterial, *Prog Polym Sci.*, vol. 32, 2007, 991–1007.
8. John G. Hardy, Lin M. Romer, Thomas R. Scheibel, Polymeric materials based on silk proteins, *Polymer*, vol. 20, 2008, 4309-4327
9. Sonia Kapoor, Subhas C. Kundu, Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications, *Acta Biomaterialia*, vol. 31, 2016, 17-32
10. Lonkar S., et al., Thermal, mechanical, and rheological characterization of polypropylene/layered double hydroxide nanocomposites, *Polymer Engineering and Science*, vol. 52, 2012, pp. 2006-2014
11. Costa F. R., et al., Morphology and fracture behaviour of polyethylene/Mg-Al layered double hydroxide (LDH) nanocomposites, *European Polymer Journal*, vol. 42, 2006, pp. 2140-2152
12. Lonkar S., Influence of reactive compatibilization on the structure and properties of PP/LDH nanocomposites, *Polymer International*, vol. 60, 2011, pp. 1688-1696.
13. Chirila TV, Suzuki S, Bray LJ, Barnett NL, Harkin DG., Evaluation of silk sericin as a biomaterial: in vitro growth of human corneal limbal epithelial cells on Bombyx mori sericin membranes., *Progress in Biomaterials.*, vol. 2, 2013, 14.



14. Sunita N. KS. Silk Protein Sericin: Promising Biopolymer for Biological and Biomedical Applications., *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, 2016, 142-58.
15. Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N., Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha., *Oncol Rep.*, vol. 10, 2003, 537-43.
16. Terada S, Sasaki M, Yanagihara K, Yamada H., Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture., *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, vol. 100, 2005, 667-71
17. John G. Hardy, Thomas R. Scheibel, Composite materials based on silk proteins, *Prog Polym Sci.*, vol. 35, 2010, 1093-1115
18. Raymond Chiasson, Moaraj Hasan, Qusai Al Nazer, Omid C. Farokhzad, Nazila Kamaly, The Use of Silk in Nanomedicine Applications as a vehicle for drug delivery applications, *Journal of Control Release*, 2011, 128-141
19. Qi Y, Wang H, Wei K, Yang Y, Zheng R-Y, Kim IS, et al. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *International Journal of Molecular Sciences.*, vol. 18, 2017, 237.
20. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced drug delivery reviews.*, vol.65, 2013, 457-70.
21. C. Del Hoyo, Layered double hydroxides and human health: An overview, *Applied Clay Science*, vol. 36, 2007, 103–121
22. Vinod Kumar Gupta Inderjeet Tyagi, Shilpi Agarwal, Hamidreza Sadegh Ramin Shahryari-ghoshekandi Mousa Yari, Omid Yousefi-nejat, Experimental study of surfaces of hydrogel polymers HEMA, HEMA–EEMA–MA, and PVA as adsorbent for removal of azo dyes from liquid phase, *Journal of Molecular Liquids*, vol. 206, 2015, 129–136.

REVENDICARI

1. **Procedeu de obtinere de noi bionanocompozite** caracterizate prin aceea ca sunt constituite din argila sintetica de tip hidroxizi dublu stratificati (LDH) modificata si obtinuta in doua etape de sinteza (LDH-TA si LDH-TA-HEMA)

2. **Procedeu de obtinere de noi bionanocompozite** caracterizate prin aceea ca sunt constituite dintr-o retea polimerica sintetica cu diferite rapoarte molare si concentratie de monomeri HEMA si AMPSA (concentratie 2 mol/L si 5 mol/L; raport molar HEMA-AMPSA 97:3 si 95:5) si doi polimeri naturali cu urmatoarele concentratii - sericina 0,5% fata de volumul amestecului de reactie, fibroina adaugata sub forma de solutie 2%.

3. **Procedeu de obtinere de noi bionanocompozite** caracterizate prin aceea ca sunt constituite din doi polimeri naturali cu urmatoarele caracteristici: sericina 0,5% fata de volumul amestecului de reactie si fibroina adaugata sub forma de solutie 2%.



LEGENDA FIGURI

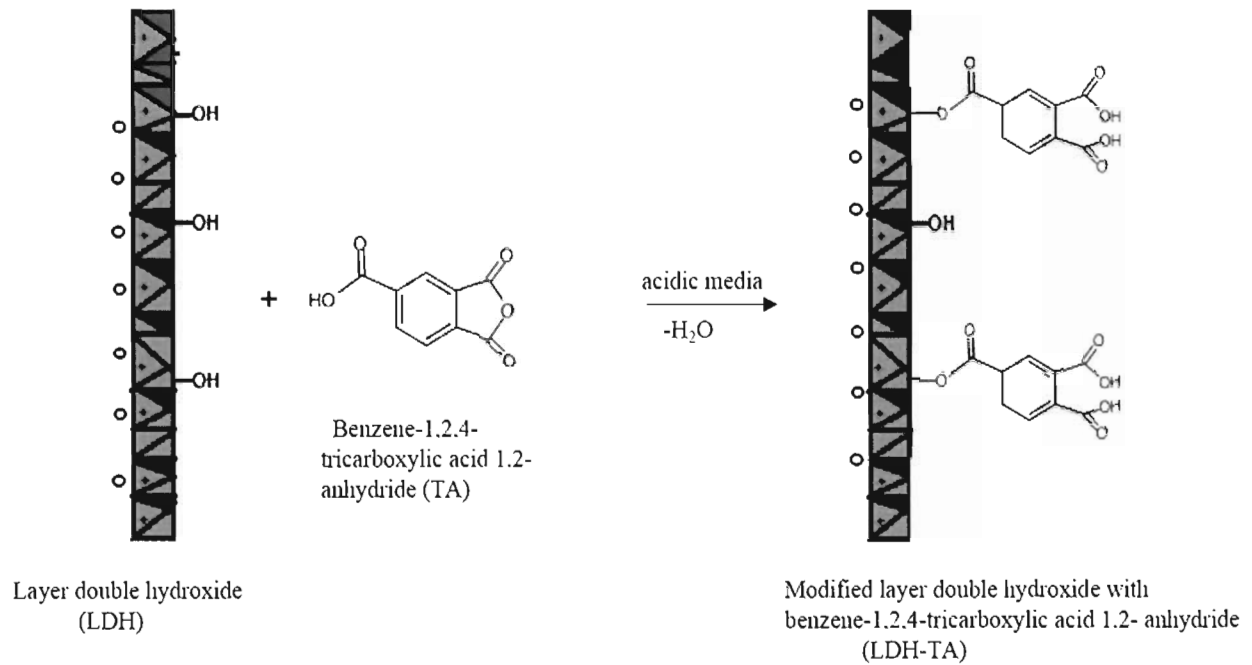


Figura 1. Reprezentare schematica a primei modificari a argilei LDH cu TA

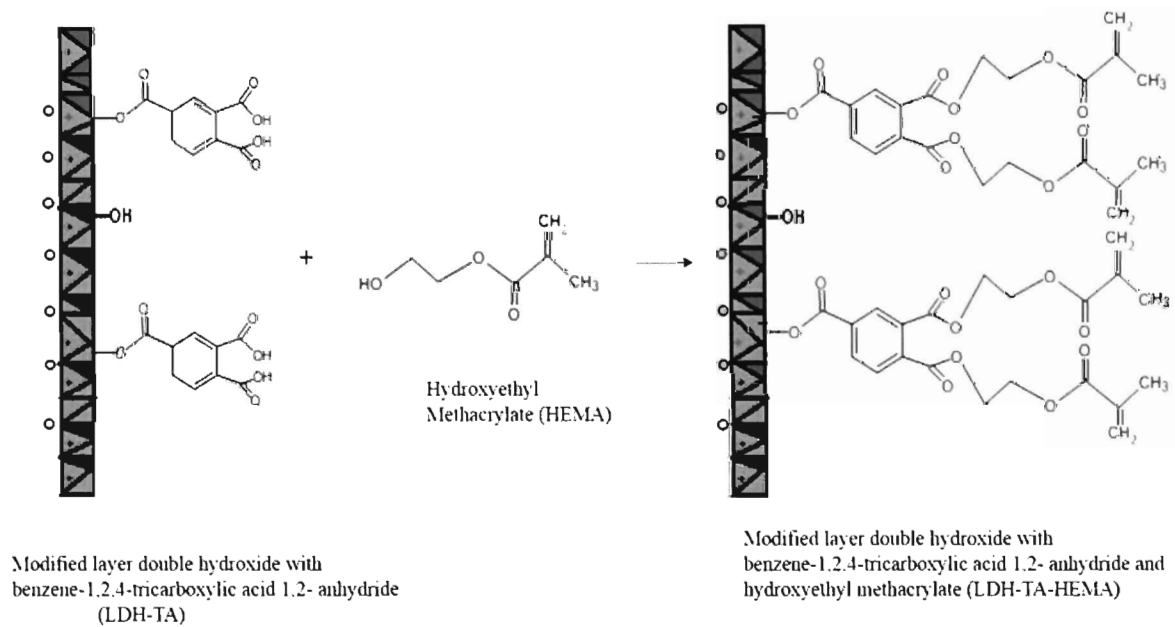


Figura 2. Reprezentare schematica a celei de-a doua modificari a argilei LDH-TA cu HEMA

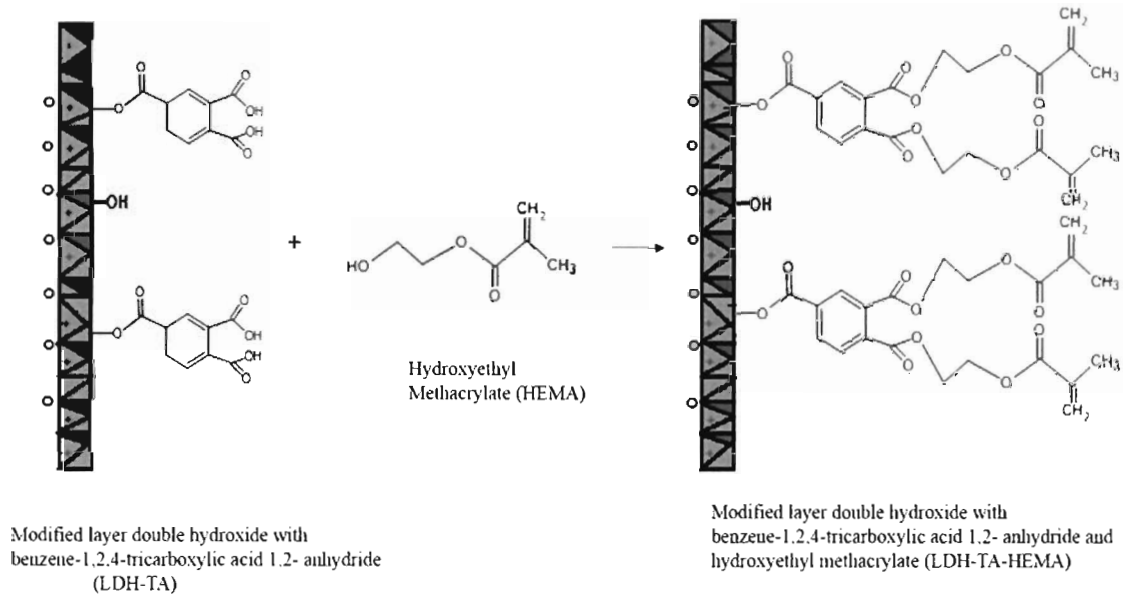


Figura 2. Reprezentare schematica a celei de-a doua modificari a argilei LDH-TA cu HEMA

Tabel 1. Compozitia si denumirea bionanocompozitelor

Concentratie monomer (mol/L)	HEMA: AMPSA (%)	KP (w/v)%	LDH (%)	Sericina (%)	2% Solutie fibroina (%)
2	95:5 (M1)	1%	1%	0.5%	15%
	97:3 (M2)				
5	95:5 (M3)	1%	1%	0.5%	15%
	97:3 (M4)				

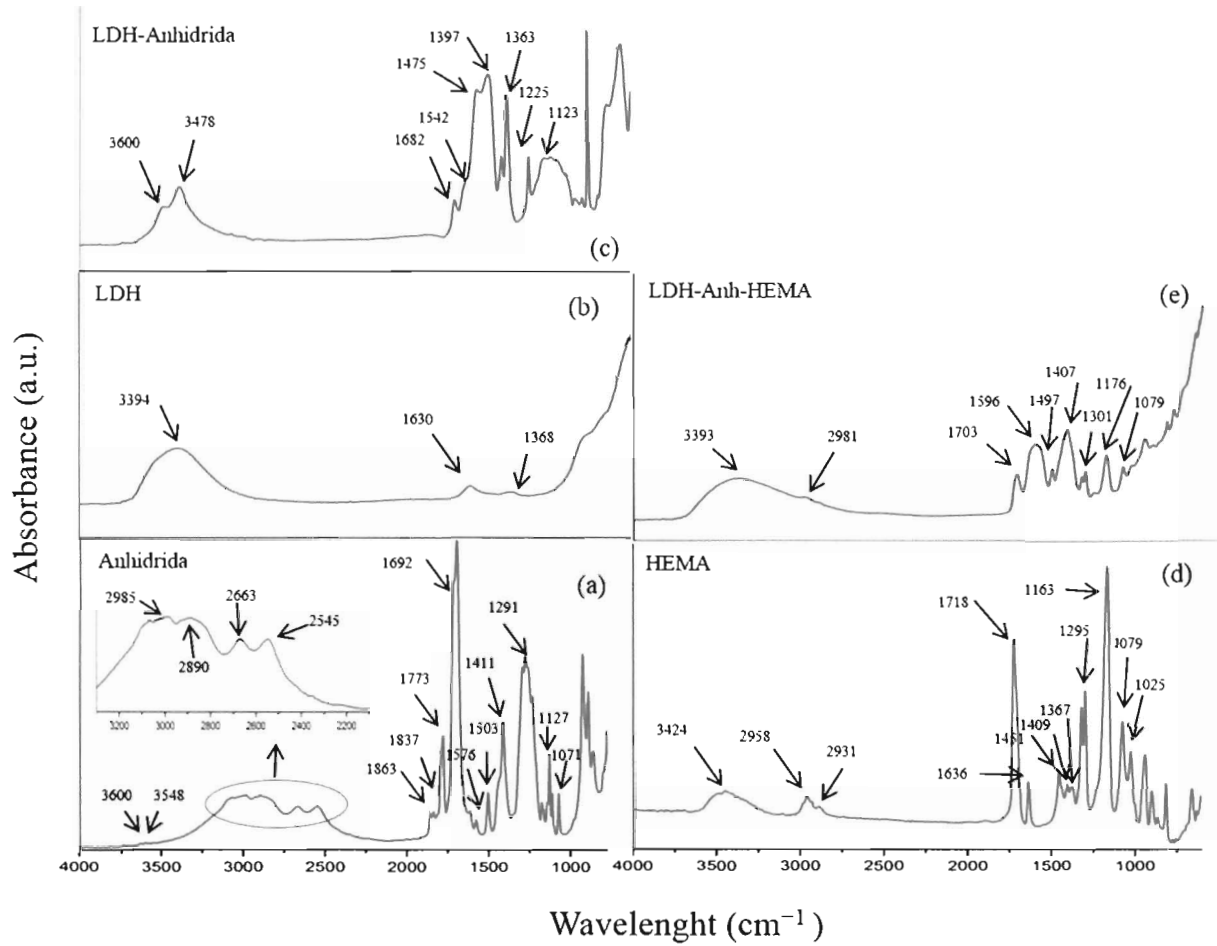


Figura 3. Analiza FTIR pentru argile (LDH; LDH-TA; LDH-TA-HEMA) si pentru materia prima (TA; HEMA)

[Handwritten signature]

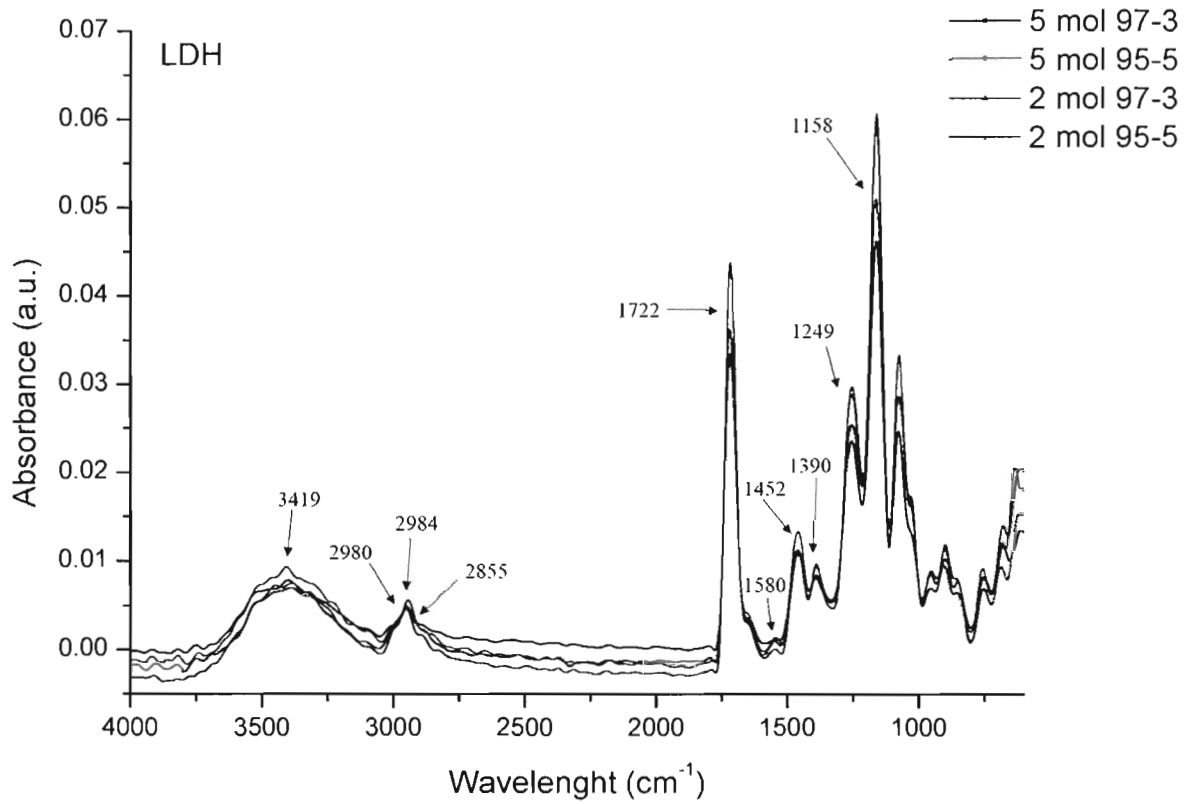


Figura 4. Analiza FTIR pentru hidrogelurile nanocompozite cu toate cele patru formulari

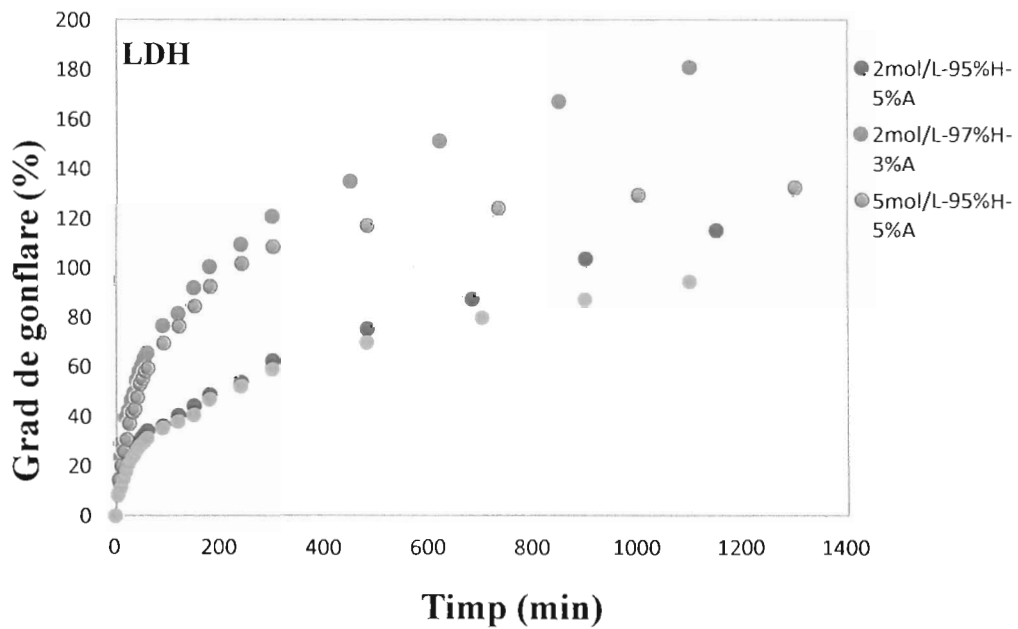


Figura 5. Compartamentul de gonflare pentru hidrogelurile nanocompozite cu toate cele patru formulari

Nr.crt	Timp (min)	Grad de gonflare (%)
2 mol/L-95%H-5%A-LDH	8000	197,25
2 mol/L-97%H-3%A-LDH	8200	216,87
5 mol/L-95%H-5%A-LDH	8000	143,26
5 mol/L-97%H-3%A-LDH	8000	107,34

Tabel 2. Gradul de gonflare al hidrogelurilor nanocompozite

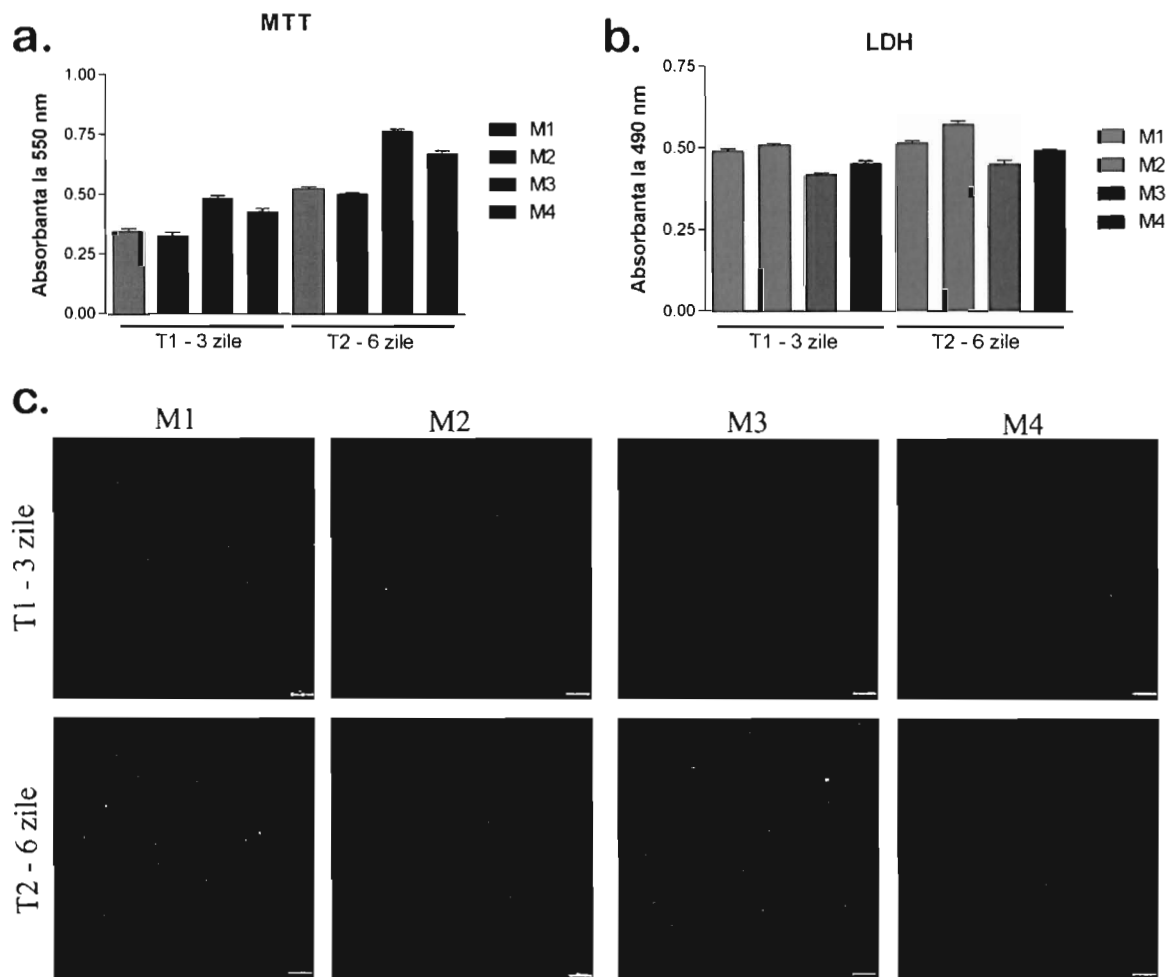


Figura 6. Biocompatibilitatea materialelor. a. Evaluarea viabilității și a ratei de proliferare a celulelor stem izolate din țesut adipos prin testul MTT; b. Evaluarea nivelului citotoxicității induse de materiale asupra celulelor stem izolate din țesut adipos prin testul LDH; c. Marcarea celulelor vii și a nucleilor celulelor moarte însămânțate pe materiale cu kitul Live/Dead.