



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00556**

(22) Data de depozit: **16/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
28/04/2023 BOPI nr. **4/2023**

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

(72) Inventatori:
• **GHEBAUR ADI, STR. PONTONIERILOR
NR. 51, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CURTI FILIS, STR. ARGEȘ, NR.26,
EFORIE SUD, CT, RO;**
• **IOVU HORIA, STR.MARIA TĂNASE NR.3,
BL.13, SC.B, ET.4, AP.49, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A MATERIALELOR COMPOZITE
FIBROASE UTILIZATE LA ACOPERIREA STRATIFICATĂ
A ALIAJELOR DE MAGNEZIU AZ31**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui material compozit fibros pe bază de policaprolactonă, chitosan, oxid de zinc și cumarină folosit pentru acoperirea stratificată a aliajelor de magneziu AZ31 utilizate în domeniul ingineriei tisulare osoase. Procedeu conform invenției începe cu pregătirea aliajului AZ31 prin îndepărtarea stratului de oxid de magneziu, pregătirea soluțiilor precursor de amestec policaprolactonă de concentrație 15% și glutaraldehidă, amestec de chitosan de concentrație 2% și policaprolactonă, urmată de filarea electrostatică a soluțiilor precursor pe aliajul AZ31 în 6 straturi alternante utilizând următorii parametri: debit de

material 8 μ l/min., cu temperatura incintei de 23°C, umiditatea relativă din incintă de 50%, voltajul pozitiv aplicat de 23 kV și voltajul negativ de -4 kV, în urma acestei acoperiri aliajul de magneziu AZ31 dobândind proprietăți fizico - chimice considerabil îmbunătățite cum sunt: stabilitate mărită în apă, în fluidul corporal simulat (SBF) și în soluție tampon fosfat (PBS), gradul mărit de mineralizare al sistemului și eliberarea controlată a cantității de cumarină.

Revendicări: 4
Figuri: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 00556
Data depozit 16 -09- 2021

DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la un material compozit pe bază de policaprolactonă, chitosan, oxid de zinc și cumarină cu aplicații în acoperirea stratificată a aliajelor de magneziu AZ31, și la un procedeu de obținere a acestora. Aceste aliaje acoperite pot fi utilizate în domeniul ingineriei tisulare osoase.

Aliajele de Mg (AZ31, compoziție Mg 96 /Al 3 /Zn 1) sunt biocompatibile și bioactive, promovează procesul de proliferare celulară și diferențiere și sunt implicate într-o serie de funcționalități biologice, inclusiv stabilizarea ARN și ADN, iar produsele obținute din degradarea aliajelor pe bază de Mg pot fi excretate inofensiv prin urină. În ciuda acestor avantaje, viteza ridicată de degradare a magneziului și a aliajelor sale în condiții fiziologice este cea mai provocatoare problemă deoarece principalul produs de coroziune al magneziului este hidroxidul de magneziu, care în prezența ionilor de clorură se transformă rapid în $MgCl_2$ foarte solubil. Ca urmare a degradării rapide, materialele biomedicale pe bază de Mg își pierd integritatea mecanică înainte de regenerarea țesuturilor. Acoperirile de conversie protejează substratul de coroziune, acționând ca o barieră izolatoare de solubilitate redusă între suprafața substratului și mediul biologic.

În prezent se cunosc mai multe tipuri de procedee utilizate la realizarea diferitelor tipuri de acoperiri ale aliajelor de magneziu cu aplicații în domeniul biomedical, acestea fiind descrise în diverse studii de literatură:

În invenția **CN109610093A** s-a obținut un aliaj de magneziu acoperit cu fibre de poliacrilonitril (PAN). Principala dezavantaj îl reprezintă toxicitatea mare a fibrelor de PAN și faptul că noul strat acoperitor este hidrofob și nu permite degradarea aliajului de magneziu.

CN112675362A raportează obținerea unor stenturi din aliaj de magneziu utilizate la repararea țesutului osos, acoperit cu fibre de fibroină încărcate cu factor de creștere PDGF sau VEGF. Dezavantajul acestui sistem este faptul că fibrele de fibroina obținute prin filare electrostatică nu sunt reticulate iar în acest mod stratul protector fibrilar se degradează mai repede.

În invenția **US2021187158A1** o membrană de aliaj de magneziu a fost acoperită prin tehnica de filare electrostatică cu un amestec polimer/matrice extracelulară și utilizat la repararea defectelor osoase de dimensiuni mari. Principala dezavantaj al acestei metode este dificultatea în manevrarea membranei respective în timpul implantării.

Nanofibrele de policaprolactonă (PCL) au fost utilizate la scară largă în diferite studii în ultimii ani, demonstrând potențialul lor ca biomateriale pentru regenerarea țesutului osos. Funcționalizarea suprafeței aliajului cu molecule bioactive poate favoriza îmbunătățirea

procesului de osteointegrare, iar nanoparticulele de oxid de zinc (ZnO) încărcate în acoperiri pe bază de PCL s-a demonstrat că posedă activitate antibacteriană și un grad bun de biocompatibilitate la celulele stem din pulpa dentară umană [A. I. Rezk, H. M. Mousa, J. Lee, C. H. Park, and C. S. Kim, **Composite PCL/HA/simvastatin electrospun nanofiber coating on biodegradable Mg alloy for orthopedic implant application**, *J. Coatings Technol. Res.*, vol. 16, no. 2, pp. 477–489, 2019, doi: 10.1007/s11998-018-0126-8]. Problema acestor acoperiri este caracterul hidrofob ridicat al fibrelor de PCL încărcate cu nanoparticule de ZnO care împiedică degradarea aliajului de magneziu și implicit nu mai este prezent caracterul osteoimunomodular al aliajului de magneziu.

Chitosanul (CS) a fost aplicat în modificarea magneziului și a aliajelor acestuia, pentru îmbunătățirea ambelor proprietăți, de rezistență la coroziune și biocompatibilitate. Mai mult, acoperirea cu chitosan poate chiar permite biodegradarea implantului de magneziu la o rată dorită prin funcția sa de barieră. Numeroase cercetări au descoperit că acoperirea cu chitosan a crescut semnificativ rezistența la coroziune a aliajului și performanța pe care a avut-o a fost dependentă atât de masa moleculară a chitosanului, cât și de numărul de straturi în acoperire. În general, acoperirea polielectrolitică derivată din natura polizaharidelor nu poate împiedica permeabilitatea apei/ionilor. În schimb, învelișul compozit HAp/CS prezintă o rezistență mai bună la coroziune comparativ cu CS acoperit pe substrat însă în acest caz la contactul cu mediul biologic nanofibrele de CS se degradează rapid deoarece nu sunt reticulate chimic [H. R. Bakhsheshi-Rad, X. Chen, A. F. Ismail, M. Aziz, E. Abdolahi, and F. Mahmoodiyan, **Improved antibacterial properties of an Mg-Zn-Ca alloy coated with chitosan nanofibers incorporating silver sulfadiazine multiwall carbon nanotubes for bone implants**, *Polym. Adv. Technol.*, vol. 30, no. 5, pp. 1333–1339, May 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/pat.4563>].

Acoperirile polimerice singure pot să nu satisfacă nevoile practice, totuși prin combinarea acoperirilor polimerice se pot satisface aplicațiile vizate. Ținând cont de mediul biologic extrem de complex, o acoperire compozită are proprietăți combinate ale diferitelor acoperiri. Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în dezvoltarea unor materiale compozite noi, polimeri-nanoparticule anorganice-substanță activă, cu potențiale aplicații în dezvoltarea de țesuturi osoase, având proprietăți de sisteme cu eliberare controlată, cumarină (substanța activă) care are proprietăți antibacteriene, ce se regăsește în fibrele de PCL și CS (polimeri) încărcate cu nanoparticule de ZnO (nanoparticulele anorganice).

Procedeul de obținere a materialelor compozite fibroase implică mai multe etape precum: (1) pregătirea aliajului AZ31ce implica indepartarea stratului de oxid de magneziu, (2) pregătirea



soluțiilor precursor de amestec policaprolactonă de concentrație 15% și glutaraldehidă, amestec chitosan de concentrație 2% și policaprolactonă, (3) filarea electrostatică a soluțiilor precursor pe aliajului AZ31 în 6 straturi alternante utilizând următorii parametrii: debit de material 8 $\mu\text{l}/\text{min}$, temperatura incintei 23 $^{\circ}\text{C}$, umiditatea relativă din incintă 50%, voltaj pozitiv aplicat 23 kV și voltaj negativ -4 kV.

Invenția prezintă multiple **avantaje**:

- materialele compozite dezvoltate pentru acoperirea aliajelor de magneziu AZ31 au un cost de producție relativ scăzut, PCL este un polimer sintetic ieftin de sintetizat, la fel și nanoparticulele de ZnO iar CS și cumarina sunt compuși ce se extrag din materii prime naturale;
- metoda de acoperire a aliajului AZ31 este simplă, prin filare electrostatică;
- aliajul acoperit prezintă proprietăți antibacteriene și osteoimunomodulatoare;
- aliajul acoperit poate fi un potențial sistem cu eliberare controlată de substanțe active la locul implantării.

Materialele compozite dezvoltate conform invenției, înlătură dezavantajele materialelor compozite cunoscute în literatura de specialitate, **prin aceea că** sunt formate din 6 straturi fibroase diferite cu ajutorul cărora sunt acoperite aliajele de magneziu AZ31, primul strat electrofilat care se regăsește la interfața polimer aliaj este realizat din amestecul PCL-glutaraldehida-cumarină-ZnO, urmat apoi de al doilea strat electrofilat pe aliajul AZ31, PCL-CS-cumarină-ZnO și ulterior urmat de încă două astfel de cicluri de straturi.

Prezentăm în continuare cele 4 tipuri de acoperiri ce au fost realizate în cadrul invenției și care se referă la figurile 1-3:

Figura 1: Probele imersate în SBF după 7, 14 și respectiv 21 zile

Figura 2: Comportamentul în H_2O și PBS al aliajelor acoperite

Figura 3: Maximele de eliberare de cumarină în 24 de ore și SBF

Exemplul 1: Acoperirea aliajului AZ31 cu straturi alternante de PCL și CS implică mai multe etape:

- în prima etapă se obține o soluție stoc (1,9 ml) de PCL de concentrație 15%, prin dizolvarea a 0,285g PCL într-un amestec diclorometan:acid acetic 70:30. Apoi această soluție a fost omogenizată cu 0,1 ml glutaraldehidă;

- în a doua etapă a fost preparată soluția stoc amestec PCL/CS; 1 ml soluție CS de concentrație 2% a fost obținută prin dizolvarea a 0,02 g chitosan în 0,98 ml amestec acid acetic:apă 60:40. Aceasta a fost amestecată cu 1 ml soluție PCL fără glutaraldehidă;
- în a treia etapă a fost preparat pentru acoperire aliajul AZ31; a fost taiată o bară de aliaj dimensiuni 100x10x1 mm care apoi a fost șlefuită pentru a îndepărta stratul oxidat, pentru ca în final să fie spălată cu etanol;
- în a patra etapă au fost electrofilate pe suprafața aliajului cele două soluții în straturi alternante; pentru obținerea straturilor 1, 3 și 5 soluția din etapa 1 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μ l/min. 50 μ l de soluție au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la temperatura constantă de 23 °C și o umiditate relativă de 50%. Pentru obținerea straturilor 2, 4, 6 soluția din etapa 2 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μ l/min. 100 μ l de soluția au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la temperatura constantă de 23 °C și o umiditate relativă de 50%. Voltajul pozitiv aplicat a fost de 23 kV în timp ce voltajul negativ de pe colector a fost de -4 kV. Viteza de mișcare a duzei este de 5 mm/s pe toata distanța colectorului pentru a dispune de o acoperire omogenă a fibrelor pe aliajul AZ31.

Exemplul 2: Acoperirea aliajului AZ31 cu straturi alternante de PCL și CS în care a fost dispersată cumarină implică mai multe etape:

- în prima etapă se obține o soluție stoc (1,9 ml) de PCL de concentrație 15%, prin dizolvarea a 0,285g PCL într-un amestec diclorometan:acid acetic 70:30. Apoi această soluție a fost omogenizată cu 0,1 ml glutaraldehidă și 1,33 mg cumarină;
- în a doua etapă a fost preparată soluția stoc amestec PCL/CS; 1 ml soluție CS de concentrație 2% a fost obținută prin dizolvarea a 0,02 g CS în 0,98 ml amestec acid acetic:apă 60:40. Aceasta a fost amestecată cu 1 ml soluție PCL fără glutaraldehidă și cu 1,33 mg cumarină;
- în a treia etapă a fost preparat aliajul AZ31 pentru acoperire; a fost taiată o bară de aliaj cu dimensiunile 100x10x1 mm care apoi a fost șlefuită pentru a îndepărta stratul oxidat, pentru ca în final să fie spălată cu etanol;
- în a patra etapă au fost electrofilate pe suprafața aliajului cele două soluții în straturi alternante; pentru obținerea straturilor 1, 3 și 5 soluția din etapa 1 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μ l/min. 50 μ l de soluția au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la



temperatura constantă de 23 °C și o umiditate relativă de 50%. Pentru obținerea straturilor 2, 4, 6 soluția din etapa 2 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μl/min. 100 μl de soluție au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la temperatura constantă de 23 °C și o umiditate relativă de 50%. Voltajul pozitiv aplicat a fost de 23 kV în timp ce voltajul negativ de pe colector a fost de -4 kV. Viteza de mișcare a duzei este de 5 mm/s pe toata distanța colectorului pentru a dispune de o acoperire omogena a fibrelor pe aliajul AZ31.

Exemplul 3: Acoperirea aliajului AZ31 cu straturi alternante de PCL, CS și ZnO implică mai multe etape:

- în prima etapă se obține o soluție stoc (1,9 ml) de PCL de concentrație 15%, prin dizolvarea a 0,285g PCL într-un amestec diclormetan:acid acetic 70:30. Apoi această soluție a fost omogenizată cu 0,1 ml glutaraldehidă și cu 0,4 mg ZnO;
- în a doua etapă a fost preparată soluția stoc amestec PCL/CS; 1 ml soluție CS de concentrație 2% a fost obținut prin dizolvarea a 0,02 g CS în 0,98 ml amestec acid acetic:apa 60:40. Aceasta a fost amestecată cu 1 ml soluție PCL fără glutaraldehidă și cu 0,4 mg ZnO;
- în a treia etapă a fost preparat aliajul AZ31 pentru acoperire; a fost taiată o bară de aliaj cu dimensiunile 100x10x1 mm care apoi a fost șlefuită pentru a îndepărta stratul oxidat, pentru ca în final să fie spălată cu etanol;
- în a patra etapă au fost electrofilate pe suprafața aliajului cele două soluții în straturi alternante; pentru obținerea straturilor 1, 3 și 5 soluția din etapa 1 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μl/min. 50 μl de soluție au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la temperatura constantă de 23 °C și o umiditate relativă de 50%. Pentru obținerea straturilor 2, 4, 6 soluția din etapa 2 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μl/min. 100 μl de soluție au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la temperatura constantă de 23 °C și o umiditate relativă de 50%. Voltajul pozitiv aplicat a fost de 23 kV în timp ce voltajul negativ de pe colector a fost de -4 kV. Viteza de mișcare a duzei este de 5 mm/s pe toata distanța colectorului pentru a dispune de o acoperire omogena a fibrelor pe aliajul AZ31.

Exemplul 4: Acoperirea aliajului AZ31 cu straturi alternante de PCL, CS, cumarină și ZnO implică mai multe etape:



- în prima etapă se obține o soluție stoc (1,9 ml) de PCL de concentrație 15%, prin dizolvarea a 0,285g PCL într-un amestec diclormetan:acid acetic 70:30. Apoi această soluție a fost omogenizată cu 0,1 ml glutaraldehidă, 1,33 mg cumarină și 0,4 mg ZnO;
- în a doua etapă a fost preparată soluția stoc amestec PCL/CS; 1 ml soluție CS de concentrație 2% a fost obținut prin dizolvarea a 0,02 g CS în 0,98 ml amestec acid acetic:apă 60:40. Aceasta a fost amestecată cu 1 ml soluție PCL fara glutaraldehida, 1,33 mg cumarină si 0,4 mg ZnO;
- în a treia etapă a fost preparat aliajul AZ31 pentru acoperire; a fost taiată o bară de aliaj cu dimensiunile 100x10x1 mm care apoi a fost șlefuită pentru a îndepărta stratul oxidat, pentru ca în final să fie spălată cu etanol;
- în a patra etapă au fost electrofilate pe suprafața aliajului cele două soluții în straturi alternante; pentru obținerea straturilor 1, 3 și 5 soluția din etapa 1 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μ l/min. 50 μ l de soluție au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la temperatura constantă de 23 °C și umiditate relativă de 50%. Pentru obținerea straturilor 2, 4, 6 soluția din etapa 2 a fost pusă într-o seringă ce a fost ulterior atașată la un injector cu ajutorul căruia s-a stabilit un debit de 8 μ l/min. 100 μ l de soluție au fost injectați printr-o duză cu diametrul intern de 0,4 mm și electrofilați la temperatura constantă de 23 °C și o umiditate relativă de 50%. Voltajul pozitiv aplicat a fost de 23 kV în timp ce voltajul negativ de pe colector a fost de -4 kV. Viteza de mișcare a duzei este de 5 mm/s pe toată distanța colectorului pentru a dispune de o acoperire omogenă a fibrelor pe aliajul AZ31.

Revendicari

1. Procedeu de obținere a materialelor compozite fibroase caracterizat prin aceea că implică mai multe etape precum: (1) pregătirea aliajului AZ31 ce implică îndepărtarea stratului de oxid de magneziu, (2) pregătirea soluțiilor precursor de amestec policaprolactonă de concentrație 15% și glutaraldehidă, amestec chitosan de concentrație 2% și policaprolactonă, (3) filarea electrostatică a soluțiilor precursor pe aliajului AZ31 în 6 straturi alternante utilizând următorii parametri: debit de material 8 $\mu\text{l}/\text{min}$, temperatura incintei este de 23 $^{\circ}\text{C}$, umiditatea relativă din incintă este menținută la 50%, voltaj pozitiv aplicat de 23 kV și voltaj negativ de -4 kV.
2. Procedeu de reticulare al fibrelor de chitosan cu glutaraldehidă conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că acest procedeu se realizează prin contact la interfața dintre straturile polimerice consecutive (strat fibre de policaprolactonă cu glutaraldehidă (strat 1, 3, 5) și strat de policaprolactonă cu chitosan (strat 2, 4, 6)) ce are loc prin difuzia glutaraldehidei din straturile 1, 3 și 5 în straturile 2, 4 și 6 îmbunătățind astfel stabilitatea aliajului AZ31 în medii fiziologice (de la 9% ÷ 21% la 2% ÷ 11%).
3. Procedeu de obținere al unor materiale compozite fibroase conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că acestea sunt realizate pe bază de PCL-CS-ZnO-cumarină, utilizate la acoperirea aliajului AZ31.
4. Procedeu de obținere al unor materiale compozite fibroase conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că prezintă o îmbunătățire: a stabilității degradării aliajului AZ31, atât în apă cât și în soluție tampon fosfat (PBS) și în fluid corporal simulat (SBF) (tabel 1) (de la 24% la 16-19%); a mineralizării aliajului acoperit cu fibrele de material compozit (tabel 2); a procesului de eliberare a cumarinei pentru 24 h demonstrând caracterul de sistem cu eliberare controlată (2-5 μg cumarină eliberate).

Tabel 1. Cantitate de aliaj degradată la 7, 14, respectiv 21 zile de la imersia în SBF

Probe	7 zile, % material degradat	14 zile, % material degradat	21 zile, % material degradat
AZ31-PCL-CS	6	13,6	23,5
AZ31-PCL-CS-Cumarină	2,5	8,6	16,7
AZ31-PCL-CS-ZnO	2,1	11,3	19,6
AZ31-PCL-CS-ZnO-Cumarină	2,9	10	17,6

Tabel 2. Conținutul procentual atomic din probele analizate după imersare în SBF

Proba	C1s %	O1s %	N1s %	Mg1s %	Cl2p %	Ca2p %	P2p %
AZ31	35	42	-	13	-	10	-
AZ31 (7 zile)	20	48	-	13	10	9	-
AZ31 (14 zile)	20	47	-	18	9	6	-
AZ31 (21 zile)	17	47	-	15	11	10	-
AZ31-PCL-CS	73	27					
AZ31-PCL-CS (7 zile)	70	29		1			
AZ31-PCL-CS (14 zile)	53	36	1	10			
AZ31-PCL-CS (21 zile)	67	30	3				
AZ31-PCL-CS (28 zile)	24	48		6		11	12
AZ31-PCL-CS-Cumarină	70	28	2				
AZ31-PCL-CS-Cumarină (7 zile)	64	26	4	2	4		
AZ31-PCL-CS-Cumarină (14 zile)	33	66	1				
AZ31-PCL-CS-Cumarină (21 zile)	78	21	1				
AZ31-PCL-CS-Cumarină (28 zile)	61	31	4	1	2	1	
AZ31-PCL-CS-ZnO	73	27					
AZ31-PCL-CS-ZnO (7 zile)	73	26		1			
AZ31-PCL-CS-ZnO (14 zile)	62	32	1	3	1	1	
AZ31-PCL-CS-ZnO (21 zile)	62	35					3
AZ31-PCL-CS-ZnO (28 zile)	44	40		4	2	6	4
AZ31-PCL-CS-ZnO-Cumarină	72	27	1				
AZ31-PCL-CS-ZnO-Cumarină (7 zile)	71	27	3				
AZ31-PCL-CS-ZnO-Cumarină (14 zile)	69	30		1			
AZ31-PCL-CS-ZnO-Cumarină (21 zile)	53	36	1	3		4	3
AZ31-PCL-CS-ZnO-Cumarină (28 zile)	30	46		4		10	10

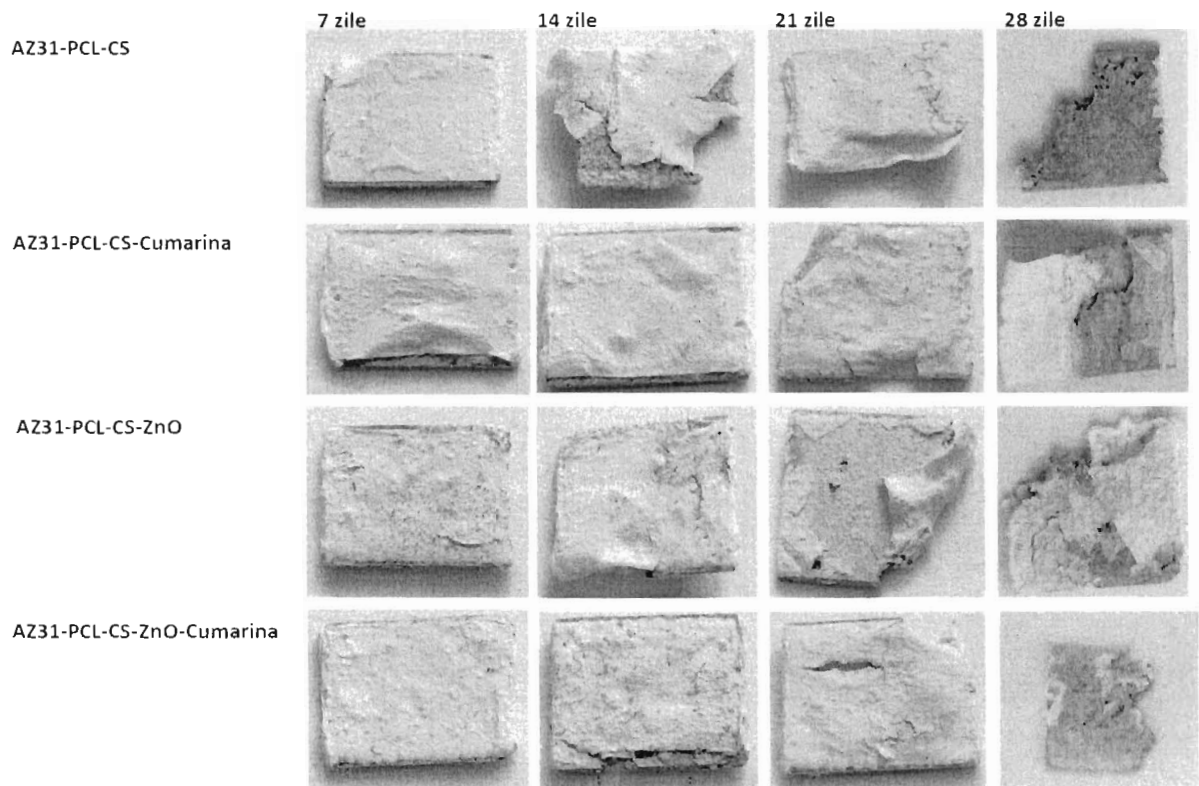


Figura 1. Probele imersate în SBF după 7,14 și respectiv 21 zile



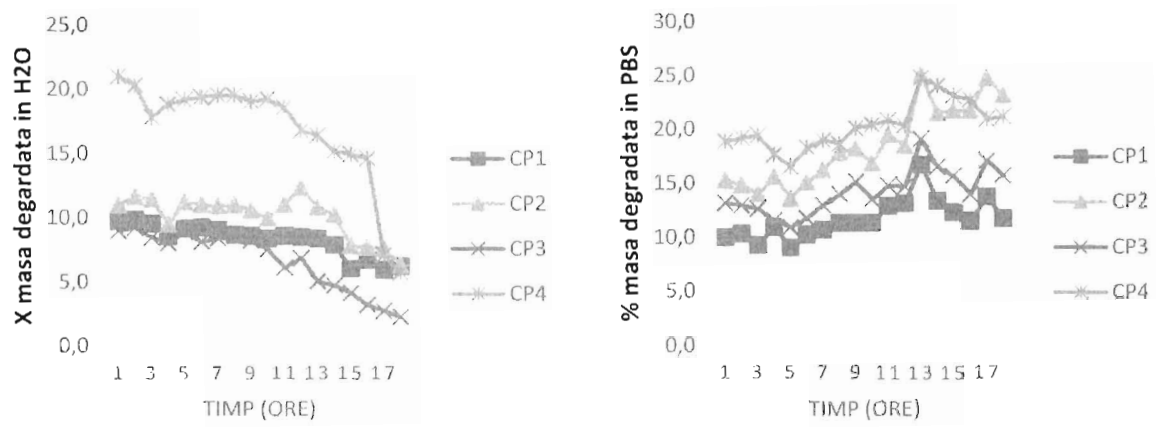


Figura 2. Comportamentul in H2O si PBS al aliajelor acoperide

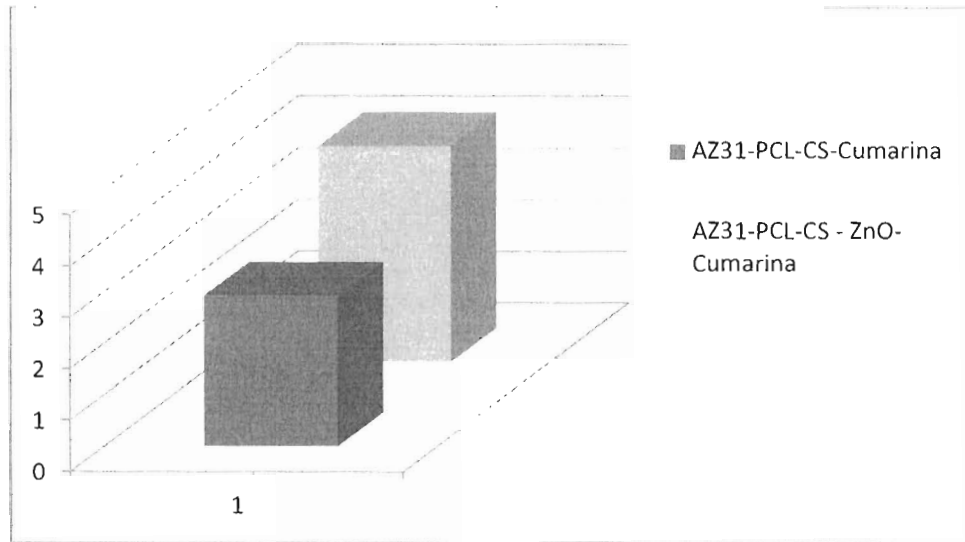


Figura 3. Maximele de eliberare de cumarină în 24 de ore și SBF