

**UNIVERSITATEA ”POLITEHNICA” DIN BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR**

**Teză de doctorat**

**“*Materiale biopolimerice composite pentru aplicații medicale obținute prin printarea 3D*”**

**Rezumat**

**Autor**: Ing. Rebeca LEU

**Conducător de doctorat**: Prof. Dr. Ing. Horia IOVU

*București*, 2023

# CUPRINS

[Mulțumiri 3](#_Toc135757315)

[Cuprins 4](#_Toc135757316)

[Tabel de imagini 6](#_Toc135757317)

[Listă de abrevieri 7](#_Toc135757318)

[Scopul și structurarea tezei 8](#_Toc135757319)

[Capitolul 1 – Introducere 11](#_Toc135757320)

[1.1. Printarea 3D și prprietățile materialelor utilizate în ingineria tisulară 11](#_Toc135757321)

[1.2. Gelatină și gelatină metacrilată (GelMA) 14](#_Toc135757322)

[1.2.1 Gelatină 14](#_Toc135757323)

[1.2.2. GelMA 16](#_Toc135757324)

[1.3. Alginat 19](#_Toc135757325)

[1.3.1. Metode de reticulare ale alginatului 20](#_Toc135757326)

[1.3.2. Aplicații ale alginatului în printarea 3D 21](#_Toc135757327)

[1.4. Hydroxyapatita 21](#_Toc135757328)

[1.5. Nanoargile 23](#_Toc135757329)

[Capitolul 2 – Obiective generale și specifice 39](#_Toc135757330)

[2.1. Obiective generale 39](#_Toc135757331)

[**Obiectiv 1** 39](#_Toc135757332)

[**Obiectiv 2** 39](#_Toc135757333)

[2.2. Obiective specifice (OS) 39](#_Toc135757334)

[Capitolul 3 – Articole publicate 43](#_Toc135757335)

[3.1. Matrici printate 3D pe bază de gelatină metacrilată, cu potențiale aplicații în ingineria țesuturilor 43](#_Toc135757336)

[3.2. Evaluarea cernelurilor de imprimare 3D pe bază de argile minerale din surse naturale pentru obținerea de biopolimeri pe bază de nanocompozite 60](#_Toc135757337)

[3.3. Materiale biopolimerice compozite printabile 3D pe bază de GelMA și Hydroxyapatită dopată cu ioni de ceriu pentru regenerarea osoasă 82](#_Toc135757338)

[3.4. Schele compozite imprimate 3D pe bază de GelMA și nanopulberi de hidroxiapatită dopate cu ioni de Mg/Zn în vederea evaluării expresiei genelor și a proteinelor markerilor osteogenici 106](#_Toc135757339)

[3.5. Imprimarea 3D a cernelurilor superconcentrate pe bază de alginat-nanoargile cu potențiale aplicații în medicina regenerativă 136](#_Toc135757340)

[3.6. Printarea 3D a hidrogelurilor nanocompozite pe bază alginat și montmorilonit 148](#_Toc135757341)

[Capitolul 4 – Concluzii generale 170](#_Toc135757342)

[Capitolul 5 – Contribuții originale 174](#_Toc135757343)

[Capitolul 6 – Diseminare 176](#_Toc135757344)

[6.1. Lista de publicații 176](#_Toc135757345)

[6.2. Lista de conferințe 178](#_Toc135757346)

[6.3. Lista de brevete 180](#_Toc135757347)

[6.4. Lista de premii 180](#_Toc135757348)

**Rezumatul tezei de doctorat**

Datorită bolilor osoase din ce în ce mai frecvente și a creșternii necesității de transplanturi de organe, au fost studiate, pe scară largă, o multitudine de materiale și tehnologii. Printre aceste materiale, gelatina și alginatul au câștigat un interes deosebit, datorită proprietăților lor versatile și reglabile, dar și datorită caracteristicilor fundamentale precum solubilitatea în apă, biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, proprietățile biomimetice, mecanice și non-imunogenitatea. Un alt aspect important care recomandă utilizarea biopolimerilor de gelatină și alginat în ingineria țesuturilor este costul mic al acestora.

Prin urmare, toate aceste caracteristici menționate propun alginatul și gelatina ca matrici biopolimerice satisfăcătoare pentru sinteza compozitelor biopolimerice cu mare aplicabilitate în medicina regenerativă.

Scopul principal al acestei teze de doctorat a fost sintetizarea ***compozitelor biopolimerice pentru aplicații medicale obținute prin imprimare 3D***. În acest sens, au fost selectati doi biopolimeri ca materii prime– alginatul și gelatina metacrilata care a fost sintetizata din gelatină. Pentru a obține materiale eficiente, cu potentiale aplicatii in medicina regenerativă, potrivite și pentru procesul de imprimare 3D, fiecare biopolimer a fost modificat cu diferiți agenți anorganici și anume, nanoargilă și hidroxiapatită. Caracteristicile structurale și morfologice ale materialelor sintetizate au fost investigate amănunțit.

***Obiectivul general al prezentei teze de doctorat este proiectarea și construcția de schele nanocompozite 3D bazate pe două materii prime și anume gelatină metacrilata și alginat, cu potențiale aplicații în medicina regenerativă, în special în regenerarea osoasă.***

In vederea atingerii acestor obiective ambițioase, studiul de cercetare a avut următoarele obiective:

**Obiectivul 1**

Primul obiectiv este reprezentat de dezvoltarea de noi materiale imprimabile 3D cu aplicații în regenerarea osoasă, utilizand gelatina metacrilata și alginatul ca materii prime, iar nanoargilele și hidroxiapatita ca nano umpluturi anorganice de întărire.

Nanoargilele au fost folosite pentru a îmbunătăți proprietățile mecanice, reologice morfologice și biologice ale biopolimerilor GelMA și alginat, datorită proprietăților lor osteoconductoare și osteoinductoare.

Hidroxiapatita dopată cu diferiți ioni a fost folosită pentru a îmbunătăți proprietățile mecanice si biologice ale GelMA, datorită caracteristicilor sale osteoconductoare și osteoinductoare.

**Obiectivul 2**

Al doilea obiectiv a fost evaluarea proprietăților de imprimare ale noilor nanocompozite, optimizarea parametrilor de imprimare 3D, proiectarea și evaluarea fidelității formelor structurilor obtinute. Pentru a investiga efectul agenților anorganici în matricea polimerică și efectul acestora asupra diferențierii osteogene, a fost urmărită cu atenție caracterizarea schelelor nanocompozite imprimate 3D în ceea ce privește proprietățile biologice, morfologice, mecanice, nanomecanice, de umflare și degradare.

**Obiective specifice (SO)**

Utilizand GelMA și alginatul ca materiale principale pentru a obține biocerneluri imprimabile 3D, au fost stabilite următoarele obiective:

* SO1. Stabilirea protocolului de imprimare 3D cu caracteristici optime pentru gelatina metacrilată. Astfel, s-au făcut următorii pași:
	+ Sinteza si caracterizarea gelatinei metacrilate (GelMA) cu diferite grade de metacrilare.
	+ Prepararea cernelurilor, folosind trei concentraţii de GelMA şi două concentraţii de fotoiniţiator pentru fiecare amestec.
	+ Studiu de imprimabilitate pentru fiecare compoziție obținută folosind tehnologia de extrudare și optimizarea parametrilor de imprimare 3D.
	+ Proiectare și fabricare de schele imprimate 3D pe baza GelMA.
	+ Caracterizarea schelelor imprimate 3D privind proprietățile morfologice, nanomecanice, reologice, de umflare și degradare.

Aceste rezultate au fost publicate în: *R.L. Alexa et al. „Schele pe bază de metacriloil cu gelatină imprimată 3D cu potențială aplicație în ingineria țesuturilor”, Polymers, 2021, 13(5), 727.*

* SO2. Îmbunătățirea proprietăților mecanice, reologice și biologice ale GelMA. În acest sens, au fost facuți următorii pași:
	+ Sinteza și caracterizarea structurală a GelMA.
	+ Formularea și caracterizarea cernelurilor nanocompozite pe bază de GelMA și trei tipuri de argilă.
	+ Investigarea imprimabilității 3D a nanocompozitului și observarea efectului argilelor asupra proprietăților reologice ale hidrogelului GelMA.
	+ Optimizarea parametrilor de imprimare 3D și evaluarea fidelității formelor schelei.
	+ Evaluarea schelelor imprimate 3D cu privire la proprietățile morfologice, mecanice, nanomecanice, de umflare și degradare pentru a investiga influența argilelor asupra materialelor in urma includerii acestora în matricea GelMA.

Aceste rezultate au fost publicate în: *R.L. Alexa et al. „Evaluarea argilelor minerale din surse naturale pentru imprimarea 3D a cernelurilor nanocompozite pe bază de biopolimeri”, Nanomaterials, 2021, 11(3), 703*

* SO3. Construirea și investigarea nanocompozitelor imprimate 3D pe bază de GelMA modificată cu hidroxiapatită dopată cu diferiți ioni, în diferențierea osteogenă. Astfel, s-au făcut următorii pași:
	+ Sinteza și caracterizarea structurală a GelMA.
	+ Sinteza şi caracterizarea structurală a hidroxiapatitei dopate cu ioni Ce/Zn/Mg (HC, HZ, HM).
	+ Formularea si caracterizarea materialelor nanocompozite pe baza de 20% GelMA si diferite concentrații de hidroxiapatită dopată cu Ce/Zn/Mg (GelMA-HC1, GelMA-HC3, GelMA-HC5, GelMA- HZ1, GelMA- HZ5, GelMA- HZ10, GelMA - HM2, GelMA-HM5, GelMA-HM10).
	+ Pe baza rezultatelor biologice și morfologice, a fost efectuată selecția concentrației adecvate de HC, HZ, HM pentru a fi utilizată în continuare la obținerea de cerneluri de imprimare 3D.
	+ Imprimarea 3D a materialelor folosind tehnologia de extrudare și optimizarea parametrilor de imprimare.
	+ Verificarea geometriei schelelor imprimate 3D.
	+ Evaluarea caracteristicilor morfologice, nanomecanice, de umflare și degradare ale schelelor imprimate 3D, precum și a modului în care acestea afectează diferențierea osteogenă.

Aceste rezultate au fost publicate în: *R.L. Alexa et al. „Biomateriale compozite imprimabile 3D bazate pe pulberi de gelMA și hidroxiapatită dotate cu ioni de ceriu pentru regenerarea țesutului osos”, Jurnalul Internațional de Științe Moleculare, 2022, 23(3), 1841.*

*R.L. Alexa și colab. „Schele compozite imprimate 3D de nanopulberi GelMA și hidroxiapatită dopate cu ioni de Mg/Zn pentru a evalua expresia genelor și proteinelor markerilor osteogeni”, Nanomaterials, 2022, 12(19), 3420*

* SO4. Studierea efectului diferitelor tipuri de argilă asupra performanțelor biologice și osteogene ale schelelor imprimate 3D. În acest sens, s-au făcut următorii pași:
	+ Formularea și caracterizarea structurală a cernelurilor super concentrate nanocompozite pe bază de alginat (5% g/v) și argilă naturală, folosind două concentrații de Cloisit Na (18% g/g, 20% g/g).
	+ Studiu de imprimare 3D folosind tehnologia de extrudare și evaluarea fidelității formelor schelei.
	+ Evaluarea proprietăților morfologice, mecanice și de umflare induse de diferite concentrații de argilă în matricea polimerică.
	+ Formularea și caracterizarea (structurală și reologică) a cernelurilor nanocompozite pe bază de alginat și diferite tipuri de nanoargile (Cloisite Na, Closite 93A, Cloisite 30B, Cloisite 20A și Cloisite 15A)
	+ Studiul de imprimabilitate al cernelurilor și observarea efectului argilelor indus asupra proprietăților reologice ale matricei de alginat.
	+ Optimizarea parametrilor de imprimare 3D și evaluarea fidelității formelor schelei folosind analiza rotunjimii porilor deschiși.
	+ Caracterizarea proprietăţilor morfologice, mecanice, de umflare şi degradare induse de nanoargile şi efectul acestora asupra diferenţierii osteogene.

Aceste rezultate au fost publicate în: *R.L. Alexa et al. „Imprimarea 3D a cernelii de argilă alginat super concentrată cu potențială aplicație în medicina regenerativă”, Buletinul științific UPB, Seria B: Chimie și Materiale, 2021.*

*R.L. Alexa și colab. „Imprimarea 3D a nanocompozitelor pe bază de hidrogel alginat-argilă naturală”, Gels, 2021, 7(4), 211*

Pentru atingerea acestor obiective, teza intitulată ***Compozite de biopolimeri pentru aplicații medicale obținute prin imprimare 3D***, a fost împărțită în sase capitole.

Scopul **Capitolului 1** este de prezenta pe scurt atât materialele selectate utilizate în obținerea cernelurilor imprimabile 3D, cât și tehnologiei utilizată în proiectarea și imprimarea 3D a matricilor 3D utilizate în ingineria țesuturilor (TE).

În **prima secțiune** este prezentată o introducere succintă a domeniului tematic general, în mod specific, caracteristicile biopolimerilor utilizați frecvent în TE, precum și tehnologia de fabricație 3D.

În **a doua secțiune**, sunt prezentate structura și proprietățile GelMA, metodele de reticulare și aplicațiile în imprimarea 3D.

În **a treia secțiune**, extracția, structura și proprietățile, metodele de reticulare și aplicațiile în imprimarea 3D sunt descrise pentru cea de-a doua matrice biopolimerică - alginatul.

**Ultima secțiune** descrie materiale de umplutură anorganice utilizate pentru sinteza hidrogelurilor nanocompozite și anume hidroxiapatita și nanoargile.

**Capitolul 2** prezintă obiectivele generale și specifice ale cercetării științifice.

**Capitolul 3** a fost împărțit în șase secțiuni, corespunzătoare celor șase articole publicate pe parcursul tezei.

**Secțiunea 3.1** introduce contribuția originală referitoare la metoda utilizată pentru construirea schelelor 3D folosind ca material principal gelatina metacrilată cu potențiale aplicații în medicina regenerativă.

În acest sens, a fost sintetizată GelMA cu trei grade diferite de metacrilare (63%, 64% și 66% g/v.). Apoi, au fost explorate concentrații diferite de gelatină metacrilată (10%, 20%, 30% g/v) și concentrații specifice de Irgacure 2959 (0,5% și 1% g/v) pentru fiecare tip de GelMA sintetizată (GelMA 63% , 64%, 66%g/v).

Scopul **secțiunii 3.2** este de a descrie metoda utilizată pentru a dezvolta hidrogeluri imprimabile 3D pe bază de GelMA și trei tipuri de nanoargile (Cloisite Na, Cloisite 30B, Cloisite 15A). Argilele au fost utilizate ca nano umpluturi anorganice de întărire, iar GelMA a servit ca matrice polimerică.

**Secțiunea 3.3** prezintă tehnologia și metodele utilizate pentru proiectarea și imprimarea schelelor 3D pe bază de gelatină metacrilată și HA dopată cu ioni de ceriu cu posibile utilizări în ingineria țesuturilor, respectiv în regenerarea osoasă. În prima etapă, ionii de ceriu au fost utilizați pentru a înlocui ionii de Ca2+ în structura HA. Ulterior, au fost folosite trei concentrații de HA dopată și trei concentrații de gelatină metacrilată, pentru a putea obține concentrația optimă pentru sintetizarea cernelurilor hidrogel imprimabile 3D.

Scopul s**ecțiunii 3.4** a fost de a dezvolta bio-cerneluri din gelatină metacrilată și HA dopată cu ioni de magneziu și zinc, cu potențiale aplicații in ingineria țesuturilor. În acest sens, ionii de Ca2+ care se găsesc în compoziția hidroxiapatitei au fost înlocuiți cu ioni de magneziu, respectiv cu ioni de zinc. Apoi, o anumită concentrație de hidroxiapatită dopată cu magneziu/zinc și trei concentrații de GelMA, au fost explorate în procesul de printare 3D in vederea obținerii platformelor inovatoare compozite 3D.

În **secțiunea 3.5**, este descrisă dezvoltarea de cerneluri hidrogel nanocompozite imprimabile 3D pe bază de alginat și nanoargilă naturală. Mai exact, studiul nostru a investigat două concentrații (18% și 20% g/v) de Montmorillonit (sub denumirea comercială de Cloisite Na) la o concentrație fixă ​​de alginat (5% g/v).

Scopul **secțiunii 3.6** a fost obținerea de biomateriale care prezintă o imprimabilitate 3D adecvată, pe bază de alginat și nanoargile. În acest sens, au fost dezvoltate șase hidrogeluri pe bază de alginat și alginat modificat cu cinci tipuri de argilă. Argilele utilizate pentru acest studiu au fost argilă nemodificată Cloisite Na și MMT modificat, și anume Cloisite 30B, Cloisite 93A, Cloisite 20A și Cloisite 15A. Toate amestecurile omogene obținute au fost imprimate 3D. În continuare, platformele nanocompozite 3D rezultate au fost examinate din perspectivă structurală și morfologică.

**Capitolul 4** prezintă concluziile generale ale conceptelor și rezultatele obținute, în timp ce **Capitolul 5** oferă o scurtă trecere în revistă a contribuțiilor originale ale acestei teze.

**Contribuții originale:**

1. Dezvoltarea de schele imprimate 3D pe bază de gelatină metacrilată cu potențiale aplicații în ingineria țesuturilor

Pentru prima dată în domeniu, a fost efectuat un studiu sistematic privind influența gradului de metacrilare, concentrația de polimer și concentrația fotoinițiatorului asupra imprimării 3D, folosind ca materie primă metacrilatul de gelatină.

Această activitate de cercetare este considerată ca avand o valoare semnificativă, deoarece oferă o evaluare amănunțită a unor parametri care afectează capacitatea hidrogelurilor pe baza de GelMA de a fi imprimate 3D, precum și proprietățile lor mecanice, morfologice și de umflare.

1. Evaluarea argilelor minerale din surse naturale pentru imprimarea 3D a cernelurilor nanocompozite pe bază de biopolimeri

Dezvoltarea și caracterizarea noilor cerneluri bazate pe GelMA-Cloisite Na, GelMA-Cloisite 30B, GelMA-Cloisite 15A a fost raportată pentru prima dată în acest studiu. Acest studiul este o investigație revoluționară a utilizării argilei naturale și modificate în cernelurile de imprimare 3D pe bază de GelMA.

Efectul indus de argila minerală asupra matricei GelMA a fost studiat prin teste reologice și de imprimare, arătând că includerea argilei în matricea polimerică a dus la vâscozități mai mari, în consecință, inducând stabilitate în timpul procesului de printare 3D. De asemenea, schele printate 3D au fost studiate în ceea ce privește fidelitatea formei folosind o analiză a rotunjimii porilor deschiși și în ceea ce privește proprietățile morfologice, mecanice și de umflare.

Toate aceste constatări îmbogățesc cunoștințele privind comportamentul acestor argile anorganice în matricea GelMA și în procesul de printare 3D.

1. Dezvoltarea de biomateriale compozite imprimabile 3D pe baza de GelMA și pulberi de hidroxiapatită dopate cu ioni de ceriu pentru regenerarea țesutului osos

Dezvoltarea de noi bio-cerneluri nanocompozite bazate pe pulberi GelMA-Hidroxiapatită dopate cu ioni de ceriu (GelMA-HC) cu aplicații în imprimarea 3D, a fost publicată pentru prima dată în acest studiu de cercetare.

În acest sens, pentru a selecta concentrația potrivită de HAP-C și GelMA care asigură biocompatibilitatea schelei și proliferarea celulară, au fost explorate trei concentrații de HAP și trei concentrații de GelMA, apoi biomaterialele au fost caracterizate fizic, chimic și biologic.

Rezultatele obţinute au arătat că porozitatea şi diferenţierea osteogenă au crescut atunci când s-a utilizat o concentraţie de 30% GelMA şi o concentraţie de 3% HC, pentru a obţine cerneala compozită. Prin urmare, noile schele bazate pe GelMA-HC5 care prezintă proprietăți și abilități de diferențiere osteogenă, sunt materiale promițătoare pentru a fi folosite în regenerarea osoasă.

1. Dezvoltarea de schele compozite imprimate 3D pe bază de GelMA și nanopulberi de hidroxiapatită dopate cu ioni de Mg/Zn pentru în vederea evaluării expresiei genelor și proteinelor markerilor osteogenici

Prin acest studiu de cercetare au fost explorate noi abordări pentru sinteza cernelurilor compozite imprimabile cu aplicații în regenerarea osoasă.

Pentru prima dată, a fost efectuat un studiu sistematic bazat pe noi cerneluri de imprimare 3D compuse din GelMA și pulberi de hidroxiapatită dopate cu zinc (HZ) și ioni de magneziu (HM).

Obiectivele acestei cercetări au fost selectarea concentrației potrivite de HZ, HM și GelMA, care să asigure proprietăți de imprimabilitate ale cernelurilor, biocompatibilitatea schelelor, proliferarea celulară și diferențierea osteogenă. Investigarea proprietăților morfologice induse de diferite concentrații de HZ și HM pe matricea GelMA, precum și proprietățile de imprimabilitate induse de diferite concentrații de GelMA-HZ și GelMA-HM, reprezintă un studiu de pionierat, noile informații obținute făcându-l unul valoros în domeniul biomedicinei.

Observând rezultatele morfologice și biologice ale schelelor imprimate 3D care și-au menținut fidelitatea formei și au asigurat viabilitate celulară și diferențiere osteogenă, putem afirma că hidrogelurile nanocompozite nou dezvoltate pe bază de 25%GelMA-3%Z3, 30% GelMA-3%Z3 , 25%GelMA-3%M3, 30%GelMA-3%M3 sunt materiale compozite adecvate pentru a fi utilizate în regenerare osoasă.

1. Imprimarea 3D a cernelii de argilă alginat super concentrată cu potențială aplicație în medicina regenerativă

Cercetările experimentale care au permis crearea de cerneluri imprimabile 3D cu potențiale aplicații de inginerie tisulară continuă prin investigarea imprimabilității alginatului și a combinației acestuia cu argilă naturală.

Inovația acestui studiu se referă la dezvoltarea de noi cerneluri imprimabile 3D pe bază de alginat și Cloisite Na care permite obținerea de schele cu vâscozitate ridicată, fidelitate mare a formei și rezistență ridicată la variațiie de temperatură.

De asemenea, studiul comparativ între hidrogelul pe bază de alginat și cele două cerneluri de imprimare pe bază de argila alginat-18% Cloisite Na și argila alginat-20% Cloisite Na, reprezintă o cercetare de pionierat, oferind informații importante despre caracteristicile induse matricei de GelMA de diferite concentrații de argile.

Cerneala nou dezvoltată pe bază de alginat-20% argilă a oferit reproductibilitatea procesului de imprimare 3D. Schelele imprimate 3D au arătat fidelitate înaltă a formei, rezistență ridicată la variațiile de temperatură și porozitate ridicată, făcând din cerneala pe bază de alginat-20% argilă un material adecvat pentru tehnologia de imprimare 3D, cu potențiale aplicații în ingineria țesuturilor.

1. Imprimarea 3D a nanocompozitelor pe bază de hidrogel de alginat-argilă naturală

Originalitatea acestui studiu este oferită de dezvoltarea noilor biomateriale imprimabile 3D pe bază de alginat-Cloisite Na, alginat-Cloisite 30B, alginat-Cloisite 93A, alginat-Cloisite 20A și alginat-Cloisite 15A. Aceasta este prima investigație cuprinzătoare asupra modului în care diferitele tipuri de argilă afectează matricea de alginat pentru a produce o cerneală pe bază de hidrogel cu aplicații în fabricarea aditivă.

Datorită rezultatelor biologice obținute, fidelitatea înaltă a formei schelelor imprimate 3D, proprietăților mecanice și reproductibilitatea metodei, nanocompozitele pe bază de alginat-Cloisite Na și alginat-Cloisite 93A sunt considerate materiale adecvate pentru a fi utilizate în proiectarea de platforme personalizate cu aplicații în regenerarea osoasă.

Toate aceste studii și materiale noi obținute, aduc contribuții semnificative atât la înțelegerea comportamentului anumitor materiale, cât și la proiectarea de noi biomateriale adecvate procesului de imprimare 3D, cu potențiale aplicații în inginerie tisulară.