



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00705**

(22) Data de depozit: **23/11/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2023 BOPI nr. **5/2023**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA VALAHIA DIN TÂRGOVIȘTE, ALEEA SINAIA, NR.13, TÂRGOVIȘTE, DB, RO;**
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **DAVID MĂDĂLINA ELENA, ȘOS.BERCENI, NR.100, BL.CORP A, ET.6, AP.31, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ION RODICA MARIANA, STR. VOILA NR. 3, BL. 59, SC.3, ET.1, AP. 36, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GORGHIU LAURA MONICA, BD.UNIRII, NR.19, BL.64, SC.B, ET.2, AP.52, TÂRGOVIȘTE, DB, RO;**
• **IANCU LORENA, BD. ALEXANDRU OBREGIA NR.17, BL.M 5, SC.A, ET.6, AP.54, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GRIGORESCU RAMONA MARINA, CALEA FERENTARI NR.10, BL. 119A, SC. 1, ET. 2, AP. 10, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ION NELU, STR. VOILA NR. 3, BL.59, SC.3, ET.1, AP.36, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **FILME ANTIMICROBIENE DIN NANOTUBURI DE CARBON CU PEREȚI MULTIPLI DECORATE CU NANOPARTICULE DE DIOXID DE TITAN PENTRU PROTECȚIE ȘI REGENERARE DERMATOLOGICĂ**

(57) Rezumat:

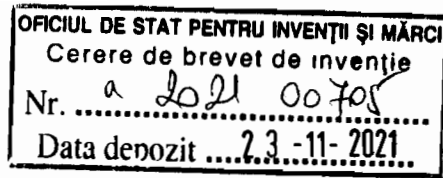
Invenția se referă la un film antimicrobian, biocompatibil și non-toxic, pentru protecție și regenerare dermatologică. Filmul, conform invenției, este compus din colagen 48...51%, acetat de celuloză 48...51%, nanotuburi de carbon cu pereți multipli, decorate cu nanoparticule de dioxid de titan 0,28...0,32% având dimensiunea de 480...550 nm, grosimea de 45...50 nm și diametrul

nanoparticulelor de TiO_2 depuse pe suprafața nanotuburilor de 12...15 nm, soluție 1% glutaraldehidă 1,4...1,5x10⁻⁶%.

Revendicări: 4
Figuri: 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).





FILME ANTIMICROBIANE DIN NANOTUBURI DE CARBON CU PEREȚI MULTIPLI DECORATE CU NANOPARTICULE DE DIOXID DE TITAN PENTRU PROTECȚIE ȘI REGENERARE DERMATOLOGICĂ

Invenția de față se referă la o compoziție realizată din nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de dioxid de titan încorporată într-o soluție de collagen și acetat de celuloză cu proprietăți antimicrobiene, rezultând filme biocompatibile cu pielea și non-toxice, care aplicate pe suprafața răni sunt capabile să promoveze vindecarea prin îmbunătățirea capacității de proliferare celulară, să minimizeze citotoxicitatea și să ofere protecție și regenerarea dermatologică cu aplicabilitate în medicină, industria farmaceutică.

Pielea este prima barieră de protecție a corpului uman și animal și reprezintă o suprafață receptorie extrem de vastă, cel mai mare organ din anatomia umană și animală. Acest organ asigură o multitudine de funcții, având o sensibilitate crescută și diversă. Pielea protejează corpul de leziuni mecanice (răni) și microorganisme, îndeplinește rolul de termoreglare, secretarea unor produse finale ale metabolismului, execută funcțiile de respirație și facilitează legătura omului cu mediul înconjurător. Pielea este constituită din trei învelișuri: epidermul, dermul și hipodermul.

Epidermul este stratul exterior, care constă dintr-un epiteliu stratificat și pavimentos de keratinocite delimitat de membrana bazală și melanocite, într-un număr mai redus. Epidermul este un protector mecanic contra pierderilor de apă din straturile profunde ale pielii și împiedică pătrunderea microbilor în organism. *Dermul* este stratul intern care asigură integritate structurală, elasticitate și nutriția și este un țesut conjunctiv compus din fibroblaste și matrice extracelulară îmbogățită în collagen și fibre elastice. *Hipodermul* este stratul care separă pielea de straturile subiacente. Acesta este alcătuit din lipocite, cu rol de izolator termic și mecanic și de rezervă nutritivă. Vindecarea rănilor cutanate este un mecanism complex care are rol în restabilirea funcției de barieră pentru a preveni deteriorarea ulterioară sau infecția. Datorită funcțiilor sale vitale ca barieră fizică, chimică și bacteriană, vindecarea rănilor cutanate reprezintă un pas esențial în finalizarea închiderii rănilor. Reglarea fiziologică a vindecării rănilor cutanate este un proces complex, care depinde de multe tipuri de celule și mediatori care interacționează continuu. Cu toate acestea, fazele prelungite de vindecare a rănilor, răspunsurile excesive ale organismului la leziune și tratamentul necorespunzător împiedică vindecarea normală a rănilor, apărând astfel cicatricile. Cele patru etape ale vindecării rănilor sunt:

- Faza de hemostază, este procesul prin care rana este închisă prin coagulare. Această fază începe atunci când sângele curge din corp. Primul pas al hemostazei este atunci când vasele de sânge se strâng pentru a restricționa fluxul sanguin. Ulterior, trombocitele se lipesc împreună pentru a sigila ruptura din peretele vasului de sânge. În cele din urmă, are loc coagularea și care întărește dopul trombocitar cu fire de fibrină. Pe măsură ce rețeaua de fibrină apare, sângele este transformat din lichid în gel prin pro-coagulante. Formarea unui tromb sau cheag menține trombocitele și celulele sanguine prinse în zona răni, **Sorg, H., Tilkorn, D.J., Hager, S., Hauser, J., Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 2017. 58, 81-94.**

- Faza inflamatorie, este a doua etapă a vindecării rănilor și începe imediat după leziune, provocând umflături localizate. Inflamația controlează sângerarea și previne infecția. În timpul acestei faze, celulele deteriorate, agenții patogeni și bacteriile sunt îndepărtate din zona răni. Aceste celule albe din sânge, factori de creștere, nutrienți și enzime creează umflarea, căldura, durerea și roșeața observate frecvent în această etapă de vindecare a rănilor. Inflamația este o parte naturală a procesului de vindecare a rănilor și este problematică numai dacă este prelungită sau excesivă, **George Broughton, I., Janis, J., Attinger, C. Wound healing: an overview. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006. 117 (7S).**

- Faza proliferativă, are loc atunci când rana este reconstruită cu țesut nou format din colagen și matrice extracelulară. În această fază, rana se contractă pe măsură ce se construiesc țesuturi noi. În plus, trebuie construită o nouă rețea de vase de sânge, astfel încât țesutul de granulație să fie sănătos și să primească suficient oxigen și nutrienți. În faza finală a etapei proliferative de vindecare a rănilor, celulele epiteliale reapar la suprafața leziunii. Epitelizarea are loc mai rapid atunci când rănilor sunt menținute umede și hidratate. În general, atunci când pansamentele sunt aplicate în decurs de 48 de ore după leziune, acestea vor menține umiditatea corectă a țesuturilor pentru a optimiza epitelizarea și vindecarea mai rapidă, **George Broughton, I., Janis, J., Attinger, C. The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006. 117(7S).**

- Faza de maturare, are loc atunci când colagenul este remodelat de la tipul III la tipul I și rana se închide complet. Celulele care au fost folosite pentru a repara rana, dar care nu mai sunt necesare, sunt îndepărtate prin apoptoză sau moartea celulară programată. În general, remodelarea începe la aproximativ 21 de zile după accidentare și poate continua timp de un an

sau mai mult. Chiar și cu reticulare, zonele rănilor vindecate continuă să fie mai slabe decât pielea nevătămată, având în general doar 80% din rezistența la tracțiune a pielii nevătămate

Sorg, H., Tilkorn, D.J., Hager, S., Hauser, J., Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 2017. 58, 81-94.

Descrierea din prezenta invenție este direcționată către un film pe bază de compoziție antimicrobiană, biocompatibilă și non-toxică pentru protecția și regenerarea dermatologică. Rănile cutanate expuse mediului sunt susceptibile la atacul diverselor tipuri de microbi, bacterii și chiar ciuperci patogene. Atacul acestor microorganisme la nivelul răni este un factor critic în eșecul de vindecare a unei răni, deoarece prezența mai multor specii de bacterii care trăiesc la nivelul răni poate duce la formarea unor biofilme foarte bine organizate și foarte greu de distrus. Aceste biofilme sunt capabile să protejeze bacteriile de terapia cu antibiotice și de răspunsul imun al pacientului. Rănile sunt cele mai predispuse la infecția cu *Staphylococcus aureus*,

Chandan, K., Gayle, M., Sashwati, R., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T., Gottrup, F., Gurtner, C., Longaker, M. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 2009. 17, 763–771. Prin urmare, este nevoie de o compoziție cu o activitate antimicrobiană crescută, care să fie biocompatibilă cu organismul și să nu producă toxicitate acestuia. Se cunosc câteva cazuri de utilizare a nanomaterialelor pe bază de carbon în aplicații medicale, după cum urmează: în brevetul de invenție **US8614189 (B2), Carbon nanotube composite scaffolds for bone tissue engineering**, se prezintă obținerea unor materiale compozite biocompatibile cu proprietăți adecvate pentru repararea și regenerarea osoasă. Acesta presupune utilizarea unui material compozit biocompatibil pe bază de nanotuburi de carbon funcționalizate și un polimer biodegradabil. Invenția are dezavantajul că produsul nu prezintă proprietăți antibacteriene, și prin urmare nu se poate utiliza în aplicații de vindecare a rănilor, ci oferă un compozit cu proprietăți îmbunătățite pentru a fi utilizat pentru repararea și regenerarea oaselor.

Brevetul de invenție **US20160030640 (A1), Carbon nanotubes and graphene patches and implants for biological tissue**, descrie obținerea unor plasturi sau implanturi din nanotuburi de carbon și grafenă care sunt depuse peste un material plastic hidrofob, care cuprinde nanotuburi de carbon și/sau grafenă și un purtător sau material suport la care se adaugă agenți suplimentari, incluzând, dar fără a se limita la, adezivi, citokine, chemokine, chemoattractanți, agenți antivirali,

agenți antimicrobieni, antiinflamatorii, proinflamatorii, molecule regeneratoare osoase sau cartilajului și medicamente pentru chimioterapie. Invenția prezintă o metodă de fabricare a implanturilor sau platurilor și o metodă de utilizare a acestora pentru a repara, înlocui și/sau trata țesutul biologic rănit și/sau defect. De asemenea, și această invenție prezintă dezavantajul că nu asigură protecție antibacteriană.

În brevetul de invenție **WO2017/122224 (A1), A nanobiocomposite formulation for wound healing and a process for the preparation thereof**, este descrisă o compoziție antimicrobiană cu spectru larg multifuncțional. Compoziția se referă la o formulare de nanobiocompozit pentru vindecarea rănilor, prin sinteza chimico-mecanică a nanocristalelor de celuloză din materialul vegetal biologic impregnate cu nanoparticule de argint și la un procedeu de preparare a nanobiocompozitelor. Dezavantajul compușilor de tipul nanocristalelor de celuloză pot genera efecte adverse, inclusiv efecte toxice asupra organismului uman.

Brevetul de invenție **EP1638620 (B1), Antimicrobial wound dressing**, descrie obținerea unui material multistrat cuprinzând un prim strat dintr-un material polimeric și un al doilea strat conectat la primul strat, care conține un metal bacteriocid, argint. Un dezavantaj al acestui compozit este că eliberarea metalului în contact cu suprafața rănii nu poate fi controlată, prin urmare există riscul ca o cantitate excesivă de metal să fie eliberată prematur, ceea ce poate cauza probleme grave de sănătate.

În brevetul de invenție **US6274163 (B1), Keratinous protein material for wound healing applications and method**, este descris un material pe bază de keratină pentru vindecarea rănilor, de preferință derivat din părul pacientului sau al unui donator compatibil. Pulberea de keratină poate fi derivată din păr folosind câțiva pași de procesare, inclusiv curățarea, suspendarea într-un purtător lichid, omogenizarea și îndepărtarea lichidului. Materialul keratinos poate fi aplicat pe rană sub formă de pulbere și astfel poate ajuta în accelerarea procesului de vindecare a rănilor. Invenția are dezavantajul că nu prezintă proprietăți antibacteriene, prin urmare la locul rănii se poate crea cu ușurință biofilm bacterian.

De asemenea, se cunosc câteva cazuri pentru obținerea nanotuburilor de carbon decorate cu nanoparticule, după cum urmează: în brevetul de invenție **US20140377790 (A1), Metal nanoparticle decorated carbon nanotubes and methods of preparation and use**, sunt descrise metode de obținere a nanotuburilor de carbon decorate cu nanoparticule de metal. Metodele includ amestecarea unui precursor de metal cu o multitudine de nanotuburi de carbon

pentru a forma un amestec precursor de metal-nanotuburi de carbon. Brevetul de invenție **EP3396365 (A1), Metal nanoparticle-decorated carbon nanotubes and method of producing metal nanoparticle-decorated carbon nanotubes**, propune decorarea nanotuburilor de carbon cu nanoparticule metalice prin amestecarea a două soluții: o soluție pe bază de nanotuburi de carbon și o a doua soluție polimerică în care sunt dispersate nanoparticule metalice. Ulterior, are loc încălzirea amestecului la o temperatură mai mare decât temperatura de tranziție a polimerului pentru o perioadă suficientă, ceea ce face ca nanoparticulele metalice acoperite cu polimer să se lege de nanotuburile de carbon. Brevetul de invenție **US2016045882 (A1), Nanofluid with nanoparticle-decorated multiwall carbon nanotubes and method of preparation thereof**, propune decorarea nanotuburilor de carbon cu pereți multipli în trei etape. În prima etapă, nanotuburile sunt depuse pe substraturi prin depunere de vapori fără catalizator, ulterior, suprafața exterioară a nanotuburilor este funcționalizată pentru a se forma grupări polare legate covalent pe suprafața nanotuburilor, iar în a treia etapă, nanoparticulele metalice sunt depuse pe suprafața exterioară a nanotuburilor prin evaporarea termică/condensarea gazelor inerte sau ablația laser.

Invenția se referă la obținerea unor filme antimicrobiene, biocompatibile și non-toxice, care se pot aplica pe suprafața răni, realizate din nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de dioxid de titan, notată MWCNT_TiO₂, și încorporate într-o soluție de colagen și acetat de celuloză, capabile să promoveze vindecarea prin îmbunătățirea capacității de proliferare celulară, să minimizeze citotoxicitatea și să ofere protecție antimicrobiană crescută.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în inhibarea tulpinilor microbiene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Candida albicans* ATCC 10231 și promovarea proliferării celulare, conducând astfel la vindecarea rănilor într-un timp mai scurt, fără complicații și fără efecte toxice asupra organismului prin aplicarea pe locul răni.

Soluția problemei constă în realizarea unui film având în rapoarte masice următoarele componente: colagen 48...51%, acetat de celuloză 48...51%, nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de dioxid de titan 0,28..0,32%, soluție 1% glutaraldehidă 1,4....1,5x10⁻⁶ % .

Pentru obținerea filmului antibacterian mai întâi se realizează o compoziție antimicrobienă, biocompatibilă și non-toxică, având nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de dioxid de titan care se obține dintr-o soluție de izopropanol ($p > 99\%$) prin dispersarea de nanotuburilor de carbon cu pereți multipli, sub agitare magnetică timp de 1...2 h, și o soluție de izopropanol ($p > 99\%$) în care se dizolvă o cantitate de 2...3% de izopropoxid de titan (IV) ($p > 98\%$) pentru a se realiza nanoparticule de dioxid de titan.

În soluția de nanotuburi de carbon cu pereți multipli se adaugă soluția pe bază de dioxid de titan prin picurare ușoară, sub agitare magnetică, timp de 2...3 h, la temperatura camerei de 20°C , amestecul astfel se filtrează, se spală cu apă distilată și uscă într-un cuptor la temperatura de $90...100^{\circ}\text{C}$, timp de 2...3h. Produsul astfel realizat se sinterizează la temperatura de $450...500^{\circ}\text{C}$, timp de 0,5...1 h, urmat de mojararea produsului și rezultând nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de dioxid de titan - MWCNT_TiO₂, cu lungimea nanotuburilor decorate lungimea de 480..550 nm, grosime de 45...50 nm și diametrul nanoparticulelor de TiO₂ depuse pe suprafața nanotuburilor de 12...15 nm.

Pentru realizarea în continuare a filmului se obține o soluție de acid acetic glacial 67...71% în care se dizolvă o cantitate de 3,2...4,4% pudra de collagen și o soluție acid acetic glacial 67...71% în care se dizolvă o cantitate de 3,2...4,4% de acetat de celuloză. Se amestecă cele două soluții în care a fost adăugată o cantitate de 0,28...0,83%, raportată la cantitatea de collagen și acetat de celuloză, de nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de TiO₂ sub agitare magnetică continuă la 300 rot/min, la temperatura camerei timp de 0,5...1,5 h rezultând compoziția antimicrobiană, și non-toxică pe bază nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de TiO₂, acetat de celuloză și collagen, notată CC@MWCNT_TiO₂.

Compoziția rezultată se toarnă în vase plate de tipul vaselor Petri și pe suprafața ei se pulverizează o soluție de 1% de glutaraldehidă în apă distilată și apoi se uscă la temperatura camerei. Filmul astfel obținut se păstrează în ambalaje sterile în ser fiziologic, închise ermetic până la utilizare.

Utilizarea filmului antimicrobian, bicompatibil și non-toxic pe bază nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de TiO₂ încorporate în filme polimerice din collagen - acetat de celuloză se poate face imediat după ce rana s-a produs.

Pentru comparație, s-a folosit un film pe bază de colagen și acetat de celuloza (1:1), fără nanocompozit, notat CC.

Cinetica de absorbție: este un parametru important în ingineria tisulară pentru a confirma stabilitatea pansamentelor poroase. Această metodă oferă informații valoroase despre modul în care filmul va răspunde în contact cu fluidele corporale și despre modul în care această interacțiune poate limita procesul de diferențiere celulară. Pentru a realiza acest experiment, a fost preparată o soluție de fluid corporal simulat (SBF), cu o concentrație de ioni apropiată de cea a plasmei conform metodologiei lui Kokubo [Kokubo, T. și Takadama, H. **How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?**. *Biomaterials*, 2006. 27(15), 2907-2915].

Filmele obținute au fost tăiate în formă de disc, cu diametrul de 3 cm, după care au fost cântărite (masa inițială, W_i), iar ulterior, au fost complet imersate în 20 mL SBF și menținute la 37°C pentru diferite perioade de timp. La anumite perioade specifice de timp, probele au fost prelevate cu atenție, s-a îndepărtat ușor excesul de lichid de pe suprafața lor cu un servetel și au fost cântărite (masa la timpul t , W_t). Raportul de absorbție a fost calculat conform *Ecuației (1)*:

$$\text{Rata de absorbție, \%} = \frac{W_t - W_i}{W_i} (1)$$

Din cineticile de absorbție pentru filmele obținute, se observă că cinetica filmelor scade odată cu creșterea cantității de MWCNTs_TiO₂. Acest lucru este atribuit structurii de rețea formată între nanomateriale și polimeri, care împiedică absorbția unei cantități mari de molecule de apă. Se poate observa că în cazul filmului CC, absorbția maximă de aproximativ 66 % a fost atinsă după 60 de minute, în timp ce în cazul filmelor în care au fost încorporate nanomateriale, se observă maxime de absorbție mai mici. În cazul filmului CC se observă o ușoară scădere a absorbției care se stabilizează după 300 de minute. Odată cu adăugarea nanocompozitului se observă o maximă de absorbție mai scăzută și o tendință de scădere în timp a absorbției, în special când cantitatea de nanocompozit crește.

Măsurători de duritate: Valorile durității au fost determinate cu un durometru de duritate Shore, model PosiTector SHD-A, DeFelsko, SUA. Au fost înregistrate zece măsurători pentru fiecare probă și s-a calculat valoarea medie. Menținerea unui caracter mecanic crescut al materialului este o caracteristică foarte importantă a unui pansament. De asemenea, este bine cunoscut faptul că încorporarea nanomaterialelor în compozitele polimerice modifică proprietățile mecanice. Comportamentul filmelor sugerează că legarea și microstructura acestora

se modifică semnificativ odată cu creșterea conținutului de MWCNTs_TiO₂ comparativ cu filmul CC, celelalte filme au prezentat o duritate mai mare, ceea ce confirmă faptul că suprafața mare a nanomaterialelor duce la o interacțiune interfacială mai puternică între acestea și moleculele de polimer, rezultând proprietăți mai bune a filmelor. Prin urmare, încorporarea nanocompozitului în film ar putea acționa ca element de întărire, oferind rezistență suplimentară biomaterialelor compozite.

Activitatea antimicrobiană:

A fost studiată pentru tulpinile *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 și *C. albicans* ATCC 10231, iar toate experimentele au fost efectuate în triplicat.

- Testea inhibiției creșterii – metoda calitativă

Pentru a verifica efectul antibacterian al materialelor obținute a fost utilizat un test de difuzie adaptat, respectând regulile generale expuse în CLSI 2020. Suspensiile bacteriene McFarland de 0,5 obținute ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL), preparate anterior în soluție salină sterilă (soluție de NaCl 0,9%) au fost utilizate ca inocul standardizat pentru a tampona plăcile Petri inoculate care conțin agar nutritiv. Materialele obținute au fost tăiate sub formă de discuri cu diametrul de 6 mm și sterilizate prin expunere la UV timp de 30 de minute înainte de utilizare. Discurile de probă au fost plasate aseptice pe plăcile Petri inoculate și incubate timp de 20 de ore la 37 °C. Diametrul de inhibare a creșterii dezvoltat în jurul fiecărui specimen de material a fost măsurat după incubare și notat (mm).

Aceste rezultate demonstrează capacitatea antimicrobiană a filmelor pe bază de nanocompozit obținute. După cum se poate observa, cele mai mari valori ale zonelor de inhibare a creșterii au fost obținute pentru filmul cu cel mai mare conținut de MWCNTs_TiO₂.

- Dezvoltarea biofilmului monospecific

Eficiența antibiofilmului a fost realizată prin transferul de specimene (6 mm în diametru, sterile) în plăci sterile cu 24 de godeuri care conțin 1 ml bulion nutritiv, urmată de inocularea a 10 μL de suspensie bacteriană cu densitate standard McFarland de 0,5. Plăcile au fost incubate timp de 24 de ore la 37 °C. Ulterior, probele au fost spălate ușor cu 1 mL soluție salină sterilă. În cele din urmă, probele au fost transferate în tuburi de centrifugă de 1,5 ml, în soluție salină sterilă de 1000 μL. Ulterior, probele au fost agitate timp de 30 de secunde pentru a asigura desprinderea celulelor biofilm în suspensie.

Rezultatele obținute indică faptul că dezvoltarea biofilmului este semnificativ redusă la 48 de ore în cazul tuturor tulpinilor testate, atunci când s-au folosit filmele cu conținut de nanocompozit crescut. Iar inhibarea bacteriilor crește odată cu creșterea concentrației de nanocompozit, deci putem afirma că activitatea antibiofilm este dependentă de concentrația de nanocompozite.

- Evaluarea dezvoltării planctonice a microorganismelor

Creșterea planctonică în prezența materialelor obținute a fost analizată în bulion nutritiv. Specimenele de 6 mm în diametru au fost plasate în plăci sterile cu 24 de godeuri, apoi, s-a adăugat 1 ml de bulion nutritiv și 10 μL din suspensiile bacteriene McFarland 0,5 obținute anterior în PBS. Specimenele au fost lăsate să se incubeze timp de 24 de ore la 37 °C. Cultura bacteriană obținută (150 μL) a fost transferată pe plăci cu 96 de godeuri și absorbanta la 600 nm a fost evaluată spectrofotometric, pentru a investiga creșterea culturilor planctonice (plutitoare libere). Rezultatele inhibării creșterii planctonice au arătat o inhibare a creșterii tulpinilor în cazul *S. aureus* și *E. coli* atunci când nanocompozitele sunt prezente, iar cea mai mare inhibare a creșterii bacteriene în bulionul nutritiv a fost obținută pentru filmul care a conținut cea mai mare cantitate de MWCNTs_TiO₂.

Teste de viabilitate celulară

- Testul MTT

Biocompatibilitatea filmelor sintetizate a fost estimată utilizând testul MTT [3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazoliu bromură]. Celulele HDFn de fibroblast dermic uman au fost crescute în mediu DMEM (Sigma-Aldrich) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotice (penicilină și streptomycin) (Sigma-Aldrich), schimbat de două ori pe săptămână. Creșterea celulelor HDFn a avut loc în plăci cu 96 de godeuri, cu o densitate de însămânțare de 3000 celule/godeu în prezența filmelor, timp de 72 de ore. Ulterior, 15 mL (12 mM) de MTT au fost adăugate celulelor, urmată de incubare la 37 °C timp de 4 ore. S-a adăugat o soluție de 1 mg dodecil sulfat de sodiu în 10 mL HCl (0,01 M) și s-a pipetat energic pentru a solubiliza cristalele de formazan formate. Un spectrofotometru TECAN Infinite M200 a fost utilizat pentru a evalua densitatea optică (DO) a formazanului solubilizat, la 570 nm, după 1 oră.

Filmele obținute prezintă valorile absorbantei apropiate de proba martor la 24 h până la 72 h, dovedind astfel efectul lor non-toxicologic. Activitatea metabolică a celulelor HDFn în prezența filmelor se dovedește a fi mai mare decât în cazul celulele de control, sugerând că

celulele sunt viabile și îmbunătățesc capacitatea de proliferare. La 72 h, s-a observat o capacitate crescută de proliferare pentru filmele care conțin o cantitate moderată de nanocompozite, comparativ cu martorul (CTRL).

Un colorant RED CMTPIX a fost utilizat pentru evaluarea biocompatibilității filmelor obținute. Colorantul a fost adăugat la cultura de celule HDFn, în prezența filmelor.

Viabilitatea (Figura 1) și morfologia celulelor HDFn (Figura 2) au fost evaluate după 5 zile. Pentru acestea, celulele au fost spălate cu PBS și vizualizate prin microscopie de fluorescență folosind o cameră digitală Olympus CKX 41. Imaginile de microscopie de fluorescență arată că celulele HDFn sunt viabile și filmele nu au efect citotoxic asupra lor. Metabolismul celular este activ, celulele absorbind colorantul CMTPIX în citoplasmă, sugerând astfel viabilitatea lor după cinci zile de incubare. Nu sunt detectate celule moarte sau fragmente de celule atunci când celulele sunt în contact cu filmul CC; celulele prezintă o morfologie normală, cu un fenotip fibroblast normal care păstrează morfologia lor inițială, cu dimensiuni omogene și distribuții de densitate în plăcile godeurilor de cultură. Deoarece celulele HDFn sunt implicate în numeroase procese celulare, inclusiv migrarea celulelor și vindecarea rănilor, se poate concluziona că celulele însămânțate prezintă o bună bioactivitate pentru toate probele analizate, în special atunci când concentrația de MWCNTs_TiO₂ a crescut.

Avantajele invenției sunt:

- Îmbunătățirea proprietăților mecanice ale filmului polimeric, prin prezența nanotuburilor de carbon cu pereți multipli care prezintă avantajul că au proprietăți mecanice superioare, odată aplicate pe suprafața acestuia.
- Îmbunătățirea și prelungirea semnificativă a activității antimicrobiene a filmului, prin prezența nanoparticulelor de dioxid de titan pe suprafața nanotuburilor.
- Îmbunătățirea activității celulare a fibroblastelor, și prin urmare vindecarea mult mai rapidă a răni, prin prezența nanocompozitelor.
- Obținerea unor filme care mențin un mediu steril pentru rană, accelerând astfel vindecarea acesteia.
- Utilizare rapidă și ușoară a compoziției obținute.
- Păstrarea compoziției până la utilizarea acesteia pentru o perioadă lungă în ambalaj steril și sigilat.
- Filme antimicrobiene, biocompatibile, netoxice ușor de realizat

Exemplu de realizare a invenției:

Intr-un vas se introduce o cantitate de 30 ml de soluție de izopropanol peste care se adugă 0.05 g de nanotuburi de carbon cu pereți multipli care se amestecă timp de 1h, sub agitare magnetică. Intr-un alt recipient se introduce o cantitate de 20 ml mLde izopropanol în care se dizolvă 0.9 g izopropoxid de titan (IV), după care prin picurare ușoară, sub agitare magnetică, timp de 2 h, la temperatura camerei se amestecă cu soluția de nanotuburi de carbon cu pereți multipli. Soluția astfel obținută se filtrează, se spală și usucă la 100°C, timp de 2 h. În final, produsul a fost sinterizat la 500 °C, timp de 0,5 h urmat de mojararea lui, rezultând astfel nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de dioxid de titan - MWCNT_TiO₂, cu lungimea nanotuburilor decorate de 500 nm, grosime de 50 nm și diametrul nanoparticulelor de TiO₂ depuse pe suprafața nanotuburilor de 13 nm. Se prepară un mix pentru a obține o soluție polimerică obținută prin dizolvarea în acid acetic glacial 75 mL și apă distilată 25 mL a unei cantități de 4 g pudra de colagen și a unei soluții de 4 g de acetat de celuloză dizolvat în aceeași cantitate de acid acetic glacial și apă distilată a fost adăugată o cantitate de 0,025 g de nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de dioxid de titan. Compoziția astfel obținută se supune operației de agitare magnetică la temperatura camerei, 300 rot/mim, timp de 0,5 h rezultând o compoziție antimicrobiană, biocompatibilă și non-toxică pe bază nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticule de TiO₂ încorporate în soluția polimerică de colagen și acetat de celuloză, această compoziție se toarnă în vase Petri obținându-se filme de grosimea de 1,1 ..1,3 mm, pe suprafața filmului se pulverizează prin 3...4 pufuri de soluție de 1% de glutaraldehidă în apă distilată și apoi se usucă la temperatura camerei, după acestea se pot utiliza sau se păstrează într-un ambalaj steril și sigilat până la utilizare.

**FILME ANTIMICROBIANE DIN NANOTUBURI DE CARBON CU PEREȚI
MULTIPLI DECORATE CU NANOPARTICULE DE DIOXID DE TITAN PENTRU
PROTECȚIE ȘI REGENERARE DERMATOLOGICĂ**

Revendicări

1. Film antimicrobian, biocompatibil și non-toxic pentru protecția și regenerarea dermatologică, **caracterizat prin aceea că** compune din colagen 48...51%, acetat de celuloză 48...51%, nanotuburi de carbon cu pereți multipli decorate cu nanoparticulele de dioxid de titan 0,28..0,32% având dimensiunea de 480..550 nm, grosime de 45...50 nm și diametrul nanoparticulelor de TiO₂ depuse pe suprafața nanotuburilor de 12...15 nm, soluție 1% glutaraldehidă 1,4...1,5x10⁻⁶ %.
2. Film antimicrobian biocompatibil și non-toxic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** inhibă dezvoltarea tulpinilor microbiene *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Candida albicans* ATCC 10231, asigurând un mediu propice pentru vindecare.
3. Film antimicrobian, biocompatibil și non-toxic, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** asigură un mediu steril la nivelul răni, timp de peste 24 h, accelerând astfel vindecarea acesteia.
4. Film antimicrobian, biocompatibil și non-toxic pentru vindecarea rănilor, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** îmbunătățește activitatea celulară a fibroblastelor, și prin urmare asigură vindecarea mult mai rapidă a răni.

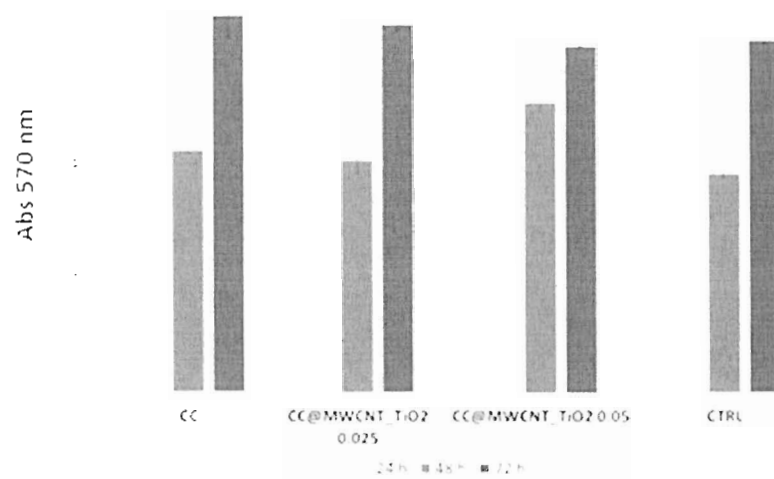


Figura 1. Viabilitatea celulelor HDFn în prezența filmelor prin test MTT

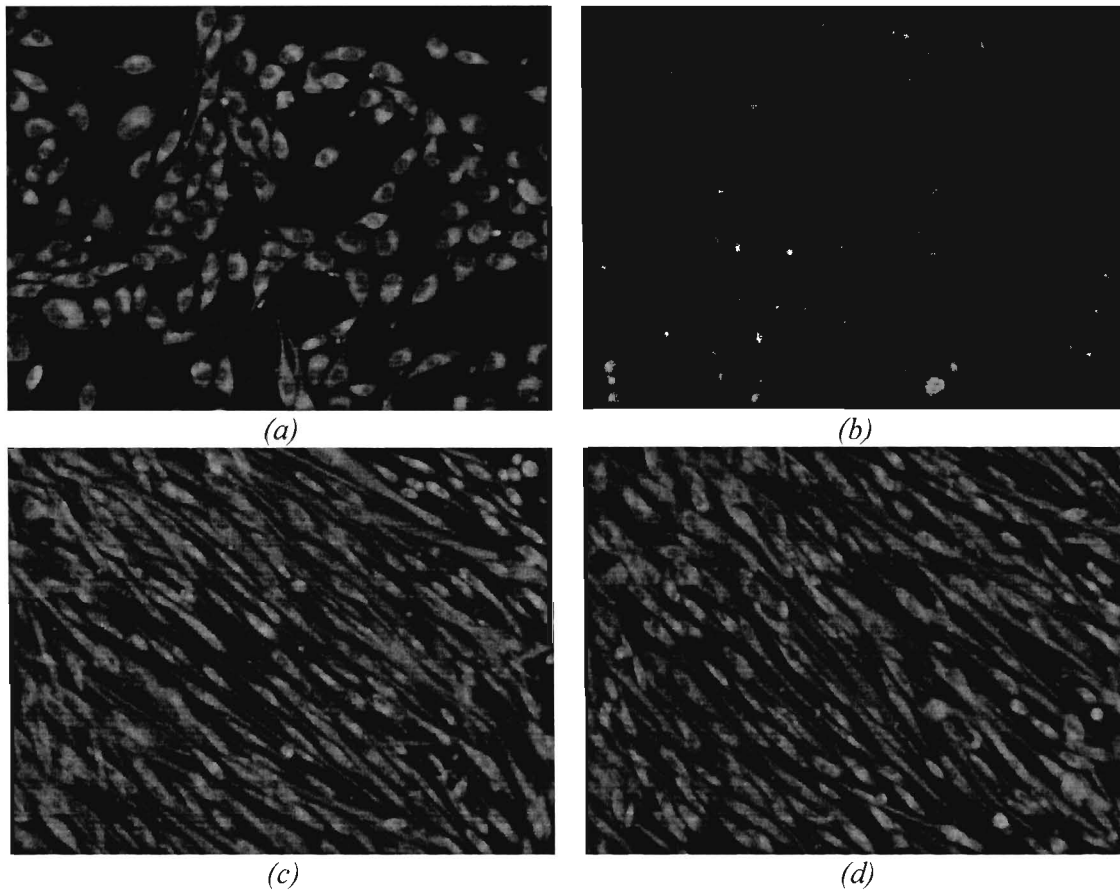


Figura 2. Imagini de fluorescență care arată viabilitatea celulelor HDFn colorate cu CMLPX: (a) probă de control; (b) film CC; (c) film CC@MWCNT_TiO₂ 0,025 și (d) film CC@MWCNT_TiO₂ 0,05