



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00055**

(22) Data de depozit: **26/01/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/06/2019** BOPI nr. **6/2019**

(41) Data publicării cererii:
28/07/2017 BOPI nr. **7/2017**

(73) Titular:

- **INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU"**,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI**,
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **CALDERON MORENO JOSE MARIA**,
STR. CRÂNGULUI NR. 9-11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **POPA MONICA**, STR. CRÂNGULUI
NR. 9-11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- **VASILESCU CORA**, STR. LOTRIOARA
NR. 5, BL. V31, SC. C, AP. 113, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **DROB SILVIU IULIAN**,
STR. RÂUL DOAMNEI NR.5, BL.C4, SC.D,
AP.140, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- **CÎMPEAN ANIȘOARA**,
STR.ILEANA COSÂNZEANA NR.10, BL.P 7,
SC.3, ET.3, AP.78, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **MITRAN VALENTINA**,
STR. CODRII NEAMȚULUI NR. 15, BL. 6,
SC. 2, AP. 64, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

YENDRY REGINA CORRALES URENA,
SILVIA HELENA PRADO BETTINI, **PABLO**
RIVEROS MUNOZ, **LINDA WITTING**,
KLAUS RISCHKA, **PAULO N.**
LISBOA-FILHO, "IN SITU SONOCHEMICAL
SYNTHESIS OF ZnO PARTICLES
EMBEDDED IN A THERMOPLASTIC
MATRIX FOR BIOMEDICAL
APPLICATIONS", MATERIALS SCIENCE
AND ENGINEERING: C, NR. 1, VOL. 49,
PP. 58-65, 2015; **CHAODONG HE**, **LANLAN**
LIU, **ZEGUO FANG**, **JIA LI**, **JINBAO GUO**,
JIE WEI, "FORMATION AND
CHARACTERIZATION OF SILVER
NANOPARTICLES IN AQUEOUS
SOLUTION VIA ULTRASONIC
IRRADIATION", ULTRASONICS
SONOCHEMISTRY, VOL. 21, PP. 542-548,
2014

(54) **PROCEDEU DE ACOPERIRE ANTIBACTERIANĂ
A UNEI SUPRAFEȚE DINTR-UN ALIAJ TERNAR DE TITAN
PRIN METODA SONOCHEMICĂ**



1 Invenția se referă la metoda sonochimică de funcționalizare a suprafeței aliajelor, prin
aplicarea de nanoacoperire antibacteriană care asigură protecție bacteriostatică și bacteri-
3 cidă pe durată lungă, pentru implanturi ortopedice.

 Este cunoscută, din articolul **Yendry Regina Corrales Ureña, Silvia Helena Prado Bettini, Pablo RiverosMuñoz, Linda Wittig, Klaus, Rischka, Paulo N. Lisboa-Filho, "In situ sonochemical synthesis of ZnO particles embedded in a thermoplastic matrix for biomedical applications"**, **Materials Science and Engineering: C, Vol. 49, 1 April 2015, pp. 58-65**, sinteza de particule antimicrobiene de oxid de zinc într-o matrice de polistiren, folosind ultrasunete, utilizând astfel compozitul preparat *in situ* pentru acoperiri antibacteriene.

 De asemenea, se cunoaște, din articolul "**Formation and characterization of silver nanoparticles in aqueous solution via ultrasonic irradiation**" - **Chaodong He, Lanlan Liu, Zeguo Fang, Jia Li, Jinbao Guo, Jie Wei, Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 21, 2014, pp. 542-548**, sinteza nanoparticulelor antimicrobiene de Ag în soluție apoasă, prin iradierea ultrasonică.

 Ingineria suprafețelor, capabilă să stimuleze formarea și dezvoltarea țesuturilor care înconjoară implantul metalic, este în momentul de față o provocare în domeniul biomaterialelor. Studii recente au arătat că modificări ale suprafeței la nivel nanometric au influență semnificativă, pozitivă asupra stimulării activității celulare, a îmbunătățirii bioactivității, dar trebuie să aibă și activitate antibacteriană, protejând organismul uman de reacții adverse.

 În aplicarea implanturilor metalice ortopedice apar infecții; prevenirea infecțiilor care apar atât la începutul implantării, cât și pe parcursul existenței implantului se face foarte eficient prin creșterea abilității antibacteriene a materialelor implantate; pentru implanturile metalice pe bază de titan și aliajele acestuia, se folosesc următoarele metode:

- impregnarea cu antibiotice a cementurilor sau acoperirilor de hidroxiapatită; are dezavantajul că acestea acționează pe termen scurt, sunt toxice și dezvoltă rezistență la stafilococi [**H. Gautier, G. Daculsi, C. Merle, "Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro characterization and microbiological activity"**, **Biomaterials 22, (2001), 2481**];

- acoperiri cu agenți antimicrobieni organici non-antibiotici [**A. Kozlovsky, Z. Artzi, O. Moses, N. Kamin-Belsky, R. B. Greenstein, "Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces"**, **J. Periodontol, 77, (2006), 1194**] - au eficiență scăzută;

- acoperiri cu agenți antimicrobieni anorganici, pe bază de argint, obținute prin depunere în plasmă, laser sau metoda chimică [**B. S. Necula, L. Apachitei, F. D. Tichelaar, L. E. Frațilă-Apachiței, J. Druszczuk, "An electron microscopical study on the growth of TiCVAg antibacterial coatings on Ti₆Al₇Nb biomedical alloy"**, **Acta Biomater. 7 (2011) 2751**; **J. Jelinek, T. Kocourek, J. Remsa, M. Weiserowa, K. Jurek, J. Miksovsky, J. Strnad, A. Galandakova, J. Ulrichova, "Antibacterial, cytotoxicity and physical properties of laser-Silver doped hydroxyapatite layers"**, **Mater. Sci. Eng. C 33 (2013) 1242**; **X. Zhang, Z. Li, X. Yuan, Z. Cui, H. Bao, X. Li, Y. Liu, X. Yang, "Cytotoxicity and antibacterial property of titanium alloy coated with silver nanoparticle-containing polyelectrolyte multilayer"**, **Mater. Sci. Eng. C 33, (2013)2816**];

- sinteza de particule antimicrobiene de oxid de zinc (ZnO), prin metoda chimică sau sonochimică, incluse în matrice de polistiren, și folosite ca medicamente, fără a fi depuse pe suprafețe metalice [**M. Cepin, G. Hribar, S. Caserman, Z. Crnjak Orei, "Morphological impact of zinc oxide particles on the antibacterial activity and human epithelia toxicity"**, **Mater. Sci. Eng. C 52 (2015) 204**; **Y. R. Corrales Urena, S. H. Prado Bettini, P. Riveros Munoz, L. Wittig, K. Rischka, P.N. Lisboa-Filho, "In situ sonochemical synthesis of ZnO particles embeded in a thermoplastic matrix for biomedical applications"**, **Mater. Sci. Eng. C 49 (2015) 58**].

RO 132032 B1

Metoda sonochimică a fost folosită pentru obținerea de particule antimicrobiene de Ag [C. He, L. Liu, Z. Fang, J. Li, J. Guo, J. Wei, *“Formation and characterization of silver nanoparticles in aqueous solution via ultrasonic irradiation”*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21 (2014) 542] sau ZnO [Y.R. Corrales Urena, S.H. Prado Bettini, P. Riveros Munoz, L. Wittig, K. Rischka, P.N. Lisboa-Filho, *“In situ sonochemical synthesis of ZnO particles embaded in a thermoplastic matrix for biomedical applications”*, *Mater. Sci. Eng. C* 49 (2015) 58], fără a fi aplicate pe suprafețe metalice. 1
3
5
7

Metoda sonochimică, conform invenției, constă în aplicarea de ZnO netoxic pentru corpul uman, dar cu acțiune antibacteriană demonstrată. Undele sonice de înaltă intensitate, sau cele ultrasonice produc fenomene de cavitație și sinteză în soluție de nanoparticule de zinc, și, prin coliziune, introduc în substratul metalic nanoparticule antibacteriene; coliziunea dintre nanoparticule și substrat produce modificări ale morfologiei, compoziției și reactivității suprafeței; se asigură în același timp un ancoraj puternic la suprafața a nanoparticulelor bacteristatice. 9
11
13

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în depunerea de nanoparticule antibacteriene pe suprafețe metalice, prin metoda sonochimică. 15

S-a demonstrat că, datorită proprietăților speciale ale metodei sonochimice, nanoparticulele antibacteriene au fost adsorbite permanent pe substrat, asigurând în acest mod o protecție antibacteriană de lungă durată. Realizarea acoperirii antibacteriene s-a făcut prin metoda chimică verde, cu consum redus de substanță antibacteriană solubilă în apă. Nanoacoperirea antibacteriană are atât rezistență la coroziune, biocompatibilitate, cât și activitate bacteriostatică și bactericidă. 17
19
21

Avantajele procedurii de acoperire antibacteriană aplicată pe suprafața unui aliaj ternar de titan sunt următoarele: 23

- prin metoda sonochimică se asigură activitate antibacteriană continuă, pe termen lung, fără a afecta aderența și multiplicarea celulelor osoase pe suprafața implantului metalic; 25
- nanoacoperirea antibacteriană asigură protecție anticorozivă a suprafeței; 27
- soluția de lucru este apoasă, netoxică;
- durata necesară obținerii acoperirii antibacteriene este scurtă; 29
- consumul de energie este foarte scăzut;
- costul total al acoperirii este redus. 31

În continuare se prezintă în detaliu un mod de realizare a procedurii de acoperire antibacteriană aplicată pe suprafața unui aliaj ternar de titan, utilizând metoda sonochimică. 33

Etapile metodei sonochimice pentru aplicarea protecției antibacteriene rezistentă pe termen lung pe suprafața aliajului Ti-15Nb-5Zr sunt: 35

- pregătirea suprafeței probelor, prin polizare mecanică până la suprafața tip oglindă; 37
- degresare ultrasonică în acetonă pură, timp de 15 min;
- pregătirea soluției de depunere de ZnO cu concentrația de 0,05 M, folosind reactivi de puritate chimică analitică; 39
- depunerea acoperirii antibacteriene folosind sursa de ultrasunete cu o frecvență de 20 kHz și o putere de 750 W; 41
- procesarea sonochimică s-a aplicat pentru 60 min. Nanoparticulele antibacteriene s-au depus prin iradierea sonochimică a soluției pe suprafața aliajului; 43
- condiționarea acoperirii prin spălare cu apă distilată și etanol, și uscarea la temperatura camerei; 45
- verificarea morfologiei și compoziției acoperirii obținute cu metoda SEM.

RO 132032 B1

1 *Caracterizarea suprafeței procesate prin metoda sonochimică, cu soluție pe bază de*
oxid de zinc

3 Caracterizarea nanostratului antibacterian obținut a constat în măsurători de micro-
scopie electronică de baleiaj (SEM), spectroscopie de infraroșu (FT-IR) și spectroscopie de
5 fotoelectroni de raze X (XPS), pentru determinarea compoziției acoperirii, dimensiunii de
particule, morfologiei etc. S-a observat depunerea uniformă (fig. 1a) de nanoparticule anti-
7 bacteriene de ZnO (confirmată de analiza spectrală XPS - fig. 1b și FT-IR - fig. 1c), cu
dimensiuni tipice 10...20 nm.

9 *Evaluarea metodei sonochimice pentru acoperire antibacteriană*

11 Evaluarea nanoacoperirii antibacteriene pe bază de ZnO s-a făcut prin monitorizarea
pe termen lung (500 h de imersie în soluțiile Ringer) a morfologiei, structurii și rezistenței la
coroziune în condiții de funcționare severe ($pH = 3,21$; $pH = 7,58$ și $pH = 8,91$).

13 *Variația în timp a morfologiei și structurii acoperirii antibacteriene*

15 Variația în timp a morfologiei și structurii acoperirii antibacteriene s-a efectuat cu
tehnica microscopiei electronice de baleiaj (SEM), și a spectroscopiei de energie dispersivă
de raze X (EDX), analizându-se periodic atât morfologia și microstructura depunerii, cât și
17 compoziția acesteia.

Inițial (fig. 2a) s-a observat o acoperire uniformă cu nanoparticule de ZnO de dimen-
19 siuni 20...30 nm, repartizată uniform pe întreaga suprafață. Spectrul EDX (fig. 2b) relevă atât
existența elementului Zn în concentrație destul de mare, cât și elementele componente ale
filmului de pe suprafața aliajului Ti-15Zr-5Nb: Ti, Zr, Nb, O.

După 300 h de expunere în soluții Ringer de $pH 7,58$ și $8,91$ a probelor acoperite cu
23 ZnO prin metoda sonochimică, observațiile SEM au arătat că suprafața a avut o micro-
structură stabilă în timp, cu nanoparticule de ZnO cu mărimi sub 30 nm, vizibile în imaginile
SEM de înaltă rezoluție (fig. 3a). Spectrul EDX (fig. 3b) a detectat prezența liniilor elemen-
25 tului Zn, precum și a elementelor constitutive ale stratului pasiv: Ti, Zr, Nb, O. Liniile specifice
zincului au intensitate mai mică în comparație cu cele de la acoperirea inițială, care semnifică
27 scăderea concentrației nanoparticulelor de ZnO, arătând că o mică parte din acoperirea de
ZnO s-a dizolvat, îndeplinindu-și astfel rolul de protecție antibacteriană.

După 500 h de expunere în soluții Ringer de $pH 7,58$ și $8,91$, imaginile SEM (fig. 4a)
31 au arătat aceeași microstructură stabilă, cu nanoparticule de ZnO cu mărimi sub 30 nm.
Spectrul EDX (fig. 4b) a detectat prezența liniilor elementului Zn, cu intensități mai mici decât
33 cele inițiale și cele de la 300 h de imersie, adică aceste nanoparticule s-au dizolvat în
continuare în soluțiile fiziologice, acționând ca factor antibacterian.

35 *Evaluarea activității antibacteriene a nanoparticulelor de zinc*

Capacitatea de inhibiție a activității bacteriilor se determină fie prin metoda „prin
37 difuzie, care poate da doar o estimare calitativă vizuală a eficienței antibacteriene, fie prin
metoda estimării turbidității, care constă în măsurarea absorbantei la 600 nm a unui mediu
39 nutritiv lichid inoculat cu microorganismul ales, atât în prezența agentului potențial antibac-
terian, cât și în absența acestuia, față de mediul steril, și calcularea indicelui de inhibiție.
41 Datele obținute pentru stafilococul auriu arată o inhibiție foarte bună, de 61,55%.

43 *Determinarea biocompatibilității in vitro a suprafeței procesate sonochimic*

Testarea biocompatibilității suportului Ti-15Zr-5Nb netratat și tratat sonochimic a fost
realizată din studii în contact direct. S-au efectuat studii de proliferare, adeziune, viabilitate,
45 diferențiere, mineralizare a celulelor pre-osteoblaste MC3T3-E1, precum și citotoxicitate a
suportului metalic.

Nici aliajul netratat, nici cel tratat antibacterian nu au exercitat efecte citotoxice. Testul
47 MTT arată o creștere a valorilor absorbantei formazanului la intervalele de 2 și 4 zile de
cultură, remarcându-se valori aproximativ egale pentru viabilitatea și proliferarea osteoblas-
49 telor cultivate atât pe aliajul protejat antibacterian, cât și pe cel neprotejat. Atașarea,

răspândirea și morfologia celulară au fost asemănătoare pentru cele două probe, și evidențiază organizarea actinei citoscheletice în fibre de stres. Mineralizarea matricei extracelulare este considerată un punct critic de evaluare pe termen lung a diferențierii celulare. Analizele calitative și cantitative au evidențiat o creștere semnificativă a mineralizării matricei extracelulare pe probele supuse tratamentului sonochimic, atât la 3, cât și la 6 săptămâni. A rezultat că aliajul tratat sonochimic prezintă o mai bună biocompatibilitate în comparație cu cel netratat.

Monitorizarea rezistenței la coroziune și a activității antibacteriene a acoperirii bacteriostatice

Monitorizarea rezistenței la coroziune a acoperirii antibacteriene pe bază de ZnO în soluții Ringer de diferite valori de pH (3,21; 7,48; 8,91) s-a făcut prin metoda polarizării lineare, care a precizat principalii parametri de coroziune și variația acestora în timp: i_{cor} - densitatea curentului de coroziune; V_{cor} - viteza de coroziune; R_p - rezistența de polarizare. Monitorizarea activității antibacteriene s-a apreciat din cantitatea totală de ioni eliberați în soluție - Ion release.

Datele din tabel arată o îmbunătățire a valorilor tuturor parametrilor de coroziune pentru aliajul procesat antibacterian, ca urmare a efectului acoperirii antibacteriene de ZnO de a inhiba coroziunea aliajului prin reducerea efectivă a ariilor active de pe suprafața aliajului, prin acțiunea de strat pasiv eficace [N. Padmavathy, R. Vijayaraghavan, "Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study", Sci. Technol. Adv. Mater. 9, 2008, 035004; S. Sutha, G. Karunakaran, V. Rajendran, "Enhanced antimicrobial and long-term biostability of the zinc-incorporated hydroxyapatite coated 316L stainless steel implant for biomedical application", Ceram Int. 39, 2013, 5205]. De asemenea, comportarea în timp a aliajului procesat antibacterian este diferită de cea a aliajului neprocesat, și anume: aliajul procesat a prezentat o scădere a curentului de coroziune, i_{cor} , a vitezei de coroziune, V_{cor} , a Ion release, și o creștere a rezistenței de polarizare, R_p , ceea ce indică o creștere a rezistenței la coroziune în timp; pentru aliajul neprocesat, i_{cor} , V_{cor} , și Ion release au crescut în timp, iar R_p a scăzut ca urmare a unei ușoare susceptibilități la coroziune, adică a unei scăderi a rezistenței la coroziune [S. L. Assis, I. Costa, "Electrochemical evaluation of Ti-13Nb-13Zr, Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys for biomedical application by long-term immersion tests", Mater. Corros. 58 (2007) 329; S. Tamilselvi, V. Raman, N. Rajendran, "Corrosion behaviour of Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V ELI alloys in simulated fluid solution by electrochemical impedance spectroscopy", Electrochim. Acta 52 (2006) 839; M.A. Baker, S.L. Assis, R. Grilli, I. Costa, "Investigation of the electrochemical behaviour and surface chemistry of a Ti-13Nb-13Zr alloy exposed in MEM cell culture media with and without the addition of H₂O₂", Surf. Interface Anal. 40 (2008) 220].

Principalii parametri de coroziune pentru aliajul Ti-15Zr-5Nb neprocesat și procesat antibacterian cu ZnO, după imersie în soluții Ringer la 37 °C

Material	Timp (h)	i_{cor} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	V_{cor} ($\mu\text{m}/\text{an}$)	Clasa de rezistență	Ion release	R_p ($\Omega.\text{cm}^2$)
Ringer pH = 3,21						
Neprocesat	24	0,081	0,751	PS	76,30	330
	100	0,084	0,773	PS	78,54	315
	200	0,089	0,819	PS	83,21	300
	500	0,095	0,874	PS	88,79	290

RO 132032 B1

Tabel (continuare)

Material	Timp (h)	icor ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	V_{cor} ($\mu\text{m}/\text{an}$)	Clasa de rezistență	Ion release	R_p ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
Procesat antibacterian cu ZnO	24	0,061	0,561	PS	56,99	375
	100	0,059	0,543	PS	55,17	392
	200	0,057	0,524	PS	53,24	427
	500	0,054	0,497	PS	50,49	450
Ringer pH = 7,48						
Neprocesat	24	0,039	0,358	PS	36,70	397
	100	0,043	0,396	PS	40,23	380
	200	0,046	0,423	PS	42,98	370
	500	0,051	0,469	PS	47,65	365
Procesat antibacterian cu ZnO	24	0,022	0,202	PS	20,52	454
	100	0,020	0,184	PS	18,64	477
	200	0,018	0,166	PS	16,86	498
	500	0,015	0,138	PS	14,02	512
Ringer pH = 8,91						
Neprocesat	24	0,071	0,657	PS	66,75	305
	100	0,074	0,681	PS	69,19	295
	200	0,078	0,718	PS	72,95	281
	500	0,085	0,782	PS	79,45	270
Procesat antibacterian cu ZnO	24	0,058	0,534	PS	54,25	369
	100	0,056	0,515	PS	52,32	388
	200	0,053	0,488	PS	49,58	425
	500	0,050	0,460	PS	46,74	467

PS - Perfect Stabil

Din studiile efectuate rezultă că nanoacoperirea antibacteriană cu zinc asigură o bună protecție antibacteriană și împotriva coroziunii, precum și o bună biocompatibilitate.

RO 132032 B1

Revendicare

1

Procedeu de acoperire antibacteriană, aplicată pe suprafața unui aliaj ternar de titan, utilizând metoda sonochimică, ce este **caracterizat prin aceea că** se pregătește suprafața unui aliaj de titan Ti-15Zr-5Nb prin polizare și degresare ultrasonică în acetonă pură, timp de 15 min, se prepară soluția de acoperire de ZnO 0,05 M, se depune soluția folosind o sursă de ultrasunete cu o frecvență de 20 kHz și o putere de 750 W, cu procesare sonochimică timp de 60 min, se condiționează acoperirea prin spălare cu apă distilată și etanol, apoi se usucă la temperatura camerei.

3

5

7

9

(51) Int.Cl.

A61L 27/30^(2006.01);

C22C 14/00^(2006.01)

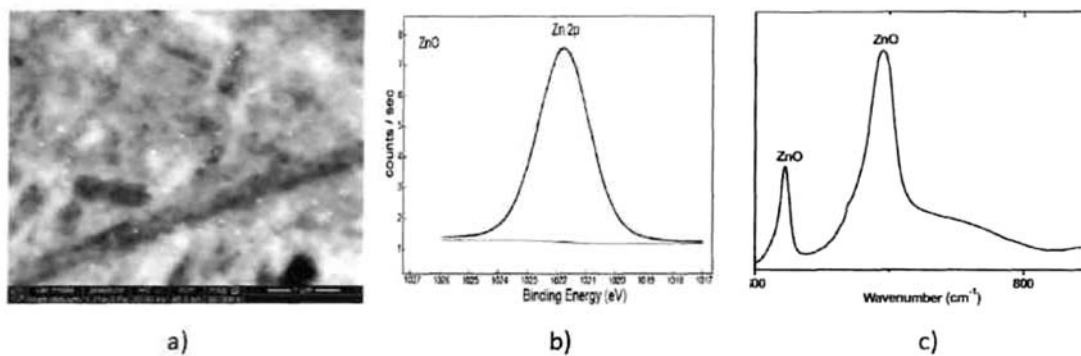


Fig. 1

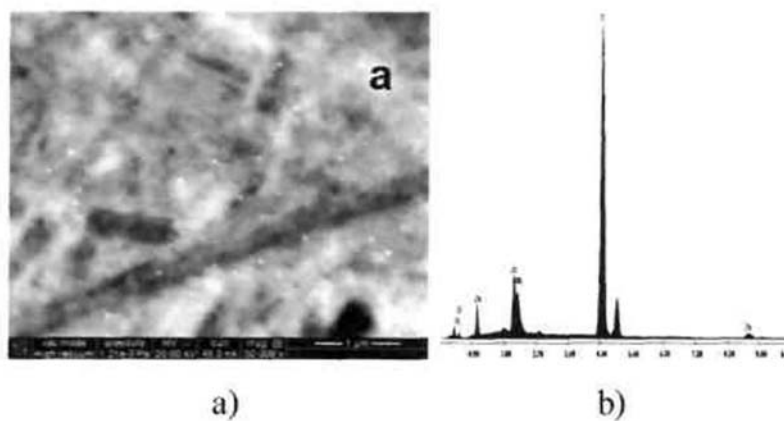


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61L 27/30 (2006.01);

C22C 14/00 (2006.01)

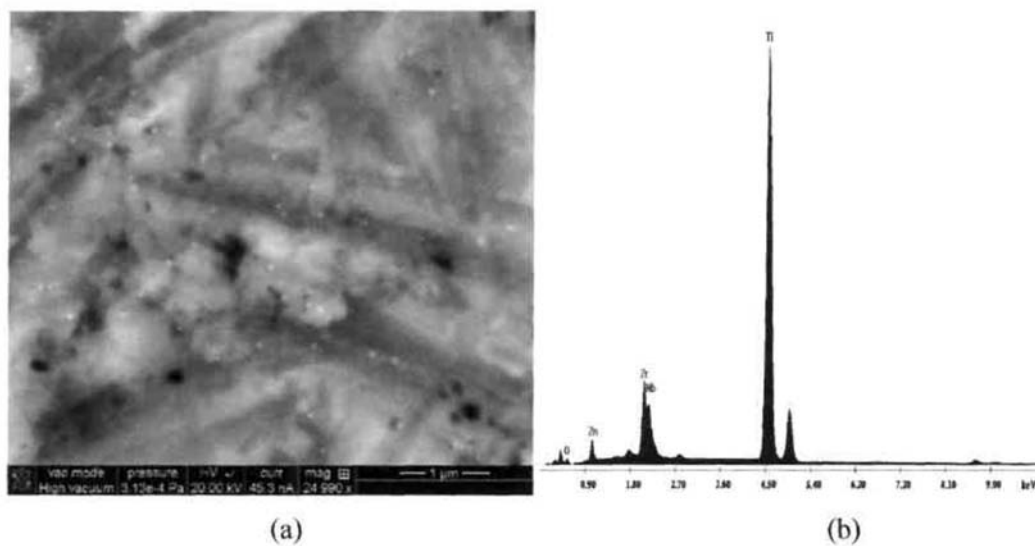


Fig. 3

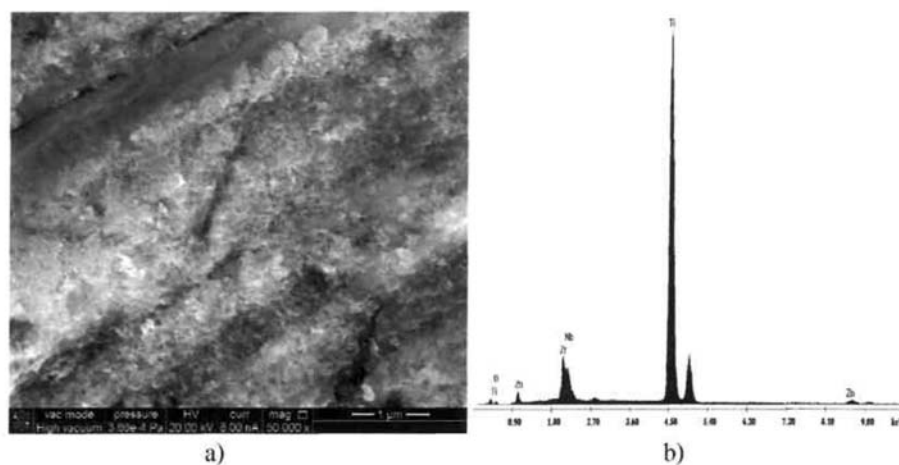


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 231/2019