



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00055

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

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

(71) Solicitant:
• 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

(54) PROCEDURĂ SONOCHIMICĂ PENTRU NANOACOPERIRE
ANTIBACTERIANĂ, APLICATĂ PE SUPRAFAȚA UNUI NOU
ALIAJ TERNAR DE TITAN, CU APLICAȚIE
ÎN IMPLANTOLOGIA ORTOPEDICĂ

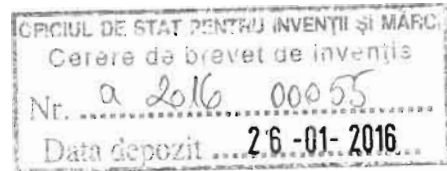
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de nanoacoperire antibacteriană, aplicată pe suprafața unui aliaj ternar de titan, cu aplicație în implantologia ortopedică. Procedeul conform invenției constă în pregătirea suprafeței prin polizare și degresare ultrasonică în acetonă pură, timp de 15 min, prepararea soluției de acoperire de ZnO 0,05 M, depunerea soluției folosind o sursă de

ultrasunete cu o frecvență de 20 kHz și o putere de 750 W, cu procesare sonochimică timp de 60 min, după care acoperirea antibacteriană rezultată este condiționată și caracterizată.

Revendicări: 1





DESCRIERE

Procedura sonochimica pentru nanoacoperire antibacteriana aplicata pe suprafata unui nou aliaj ternar de titan cu aplicație în implantologia ortopedica

Domeniul tehnic la care se refera inventia

Inventia se refera la metoda sonochimica de functionalizare a suprafetei aliajelor prin aplicarea de nanoacoperire antibacteriana care asigura protectie bacteriostatice si bactericida pe durata lunga, pentru implanturi ortopedice.

Prezentarea stadiului cunoscut al tehnicii din domeniu

Ingineria suprafetelor capabila sa stimuleze formarea si dezvoltarea tesuturilor care inconjoara implantul metalic este in momentul de fata o provocare in domeniul biomaterialelor. Studii recente au aratat ca modificari ale suprafetei la nivel nanometric au influenta semnificativa, pozitiva asupra stimulării activității celulare, a imbunatatirii bioactivității dar trebuie sa aiba si activitate antibacteriana protejand organismul uman de reactii adverse.

In aplicarea implanturilor metalice ortopedice apar infectii; prevenirea infectiilor care apar atat la inceputul implantarii cat si pe parcursul existentei implantului se face foarte eficient prin cresterea abilitatii antibacteriene a materialelor implantate; pentru implanturile metalice pe baza de titan si aliajele acestuia se folosesc urmatoarele metode:

- impregnarea cu antibiotice a cementurilor sau acoperirilor de hidroxiapatita; are dezavantajul ca acestea actioneaza pe termen scurt, sunt toxice si dezvolt rezistenta 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 agenti 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 eficienta scazuta;
- acoperiri cu agenti antimicrobieni anorganici pe baza de argint obtinute prin depunere in plasma, laser sau metoda chimica [B.S. Necula, L. Apachitei, F.D. Tichelaar, L.E. Fratila-Apachitei, J. Druszczyk, An electron microscopical study on the growth of TiO₂-Ag 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 particole antimicrobiene de oxid de zinc (ZnO) prin metoda chimica sau sonochimica incluse in matrice de polistiren si folosite ca medicamente, fara a fi depuse pe suprafete metalice [M. Cepin, G. Hribar, S. Caserman, Z. Crnjak Orel, 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 embaded in a thermoplastic matrix for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C* 49 (2015) 58].

Metoda sonochimica a fost folosita pentru obtinerea de particole 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] fara a fi aplicate pe suprafete metalice.

Metoda sonochimica dezvoltata in cadrul acestei propuneri de brevet consta in aplicarea de ZnO netoxic pentru corpul uman dar cu actiune antibacteriana demonstrata. Undele sonice de inalta intensitate sau cele ultrasonice produc fenomene de cavitate si sinteza in solutie de nanoparticole de zinc, si prin coliziune introduc in substratul metalic nanoparticole antibacteriene; coliziunea dintre nanoparticole si substrat produce modificari ale morfologiei, compozitiei si reactivitatii suprafetei; se asigura in acelasi timp un ancoraj puternic la suprafata a nanoparticolelor bacteristatice.

Prezentarea problemei tehnice pe care o rezolva inventia

Aceasta inventie rezolva problema depunerii de nanoparticole antibacteriene pe suprafete metalice prin metoda sonochimica. Aceasta metoda nu a fost aplicata pana in prezent pe suprafata noului aliaj Ti-15Nb-5Zr.

Expunerea inventiei

S-a demonstrat ca datorita proprietatilor speciale ale metodei sonochimice, nanoparticolele antibacteriene au fost adsorbite permanent pe substrat, asigurand in acest mod o protectie antibacteriana de lunga durata. Realizarea acoperirii antibacteriene s-a făcut prin metoda chimica verde (compozitie originala) cu consum redus de substanta antibacteriana

solubila in apa. Nanoacoperirea antibacteriana are atat rezistenta la coroziune, biocompatibilitate cat si activitate bacteristatica si bactericida.

Conceptul propus este nou si nu exista la scara comerciala; s-a realizat la nivel de laborator si se bazeaza pe un proces sonochimic intr-o singura etapa producand nanoparticole si impregnandu-le ca factori antibacterieni pe suprafata metalica.

Prezentarea avantajelor inventiei in raport cu stadiul tehnicii

- Prin metoda sonochimica se asigura activitate antibacteriana continua, pe termen lung, fara a afecta adherenta si multiplicarea celulelor osoase pe suprafata implantului metalic.

- Nanoacoperirea antibacteriana asigura protectie anticoroziva a suprafetei.

- Solutia de lucru este apoasa, netoxica.

- Durata necesara obtinerii acoperirii antibacteriene este scurta.

- Consumul de energie este foarte scazut.

- Costul total al acoperirii este redus.

Prezentarea in detaliu a unui mod de realizare a inventiei revendicate

Etapele metodei sonochimice pentru aplicarea protectiei antibacteriene rezistenta pe termen lung pe suprafata aliajului Ti-15Nb-5Zr sunt:

- Pregatirea suprafetei probelor prin polizare mecanica pana la suprafata tip oglinda;

- degresare ultrasonica in acetona pura timp de 15 minute.

- Pregatirea solutiei de depunere de ZnO cu concentratia de 0.05 M folosind reactivi de puritate chimica analitica.

- Depunerea acoperirii antibacteriene folosind sursa de ultrasunete cu o frecventă de 20 kHz și o putere de 750W.

- Procesarea sonochimica s-a aplicat pentru 60 min.. Nanoparticulele antibacteriene s-au depus prin iradierea sonochimica a solutiei pe suprafata aliajului.

- Conditionarea acoperirii prin spalare cu apa distilata si etanol si uscarea la temperatura camerei;

- Verificarea morfologiei si compozitiei acoperirii obtinute cu metoda SEM.

Caracterizarea suprafetei procesate prin metoda sonochimica cu solutie pe baza de oxid de zinc

Caracterizarea nanostratului antibacterian obtinut a constat in masuratori de microscopie electronica de baleiaj (SEM), spectroscopie de infrarosu (FT-IR) și spectroscopie de fotoelectroni de raze X (XPS) pentru determinarea compozitiei acoperirii, dimensiunii de particole, morfologiei, etc. S-a observat depunerea uniforma (Fig. 1a) de nanoparticole

antibacteriene de ZnO (confirmata de analiza spectrala XPS – Fig. 1.b si FT-IR – Fig. 1c) cu dimensiuni tipice 10-20 nm.

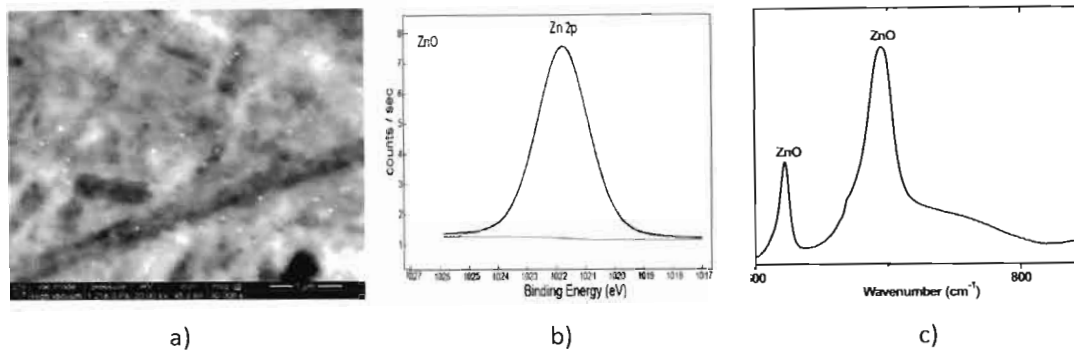


Fig. 1. Micrografie SEM (a), spectre XPS (b) si FT-IR (c) ale suprafetei aliajului după depunere antibacteriana de nanoparticole de zinc

Evaluarea metodei sonochimice pentru acoperire antibacteriana

Evaluarea nanoacoperirii antibacteriene pe bază de ZnO s-a facut prin monitorizarea pe termen lung (500 ore de imersie in solutiile Ringer) a morfologiei, structurii si a rezistentei la corozie in conditii de functionare severe (pH = 3,21; pH = 7,58 și pH = 8,91).

Variatia in timp a morfologiei si structurii acoperirii antibacteriene

Variatia in timp a morfologiei si structurii acoperirii antibacteriene s-a efectuat cu tehnica microscopiei electronice de baleiaj (SEM) si a spectroscopiei de energie dispersiva de raze X (EDX) analizandu-se periodic atat morfologia si microstructura depunerii cat si compozitia acesteia.

Initial (Fig. 2a) s-a observat o acoperire uniforma cu nanoparticole de ZnO de dimensiuni 20-30 nm repartizata uniform pe intraga suprafata. Spectrul EDX (Fig. 2b) releva atat existenta elementului Zn in concentratie destul de mare, cat si elementele componente ale filmului de pe suprafata aliajului Ti-15Zr-5Nb: Ti, Zr, Nb, O.

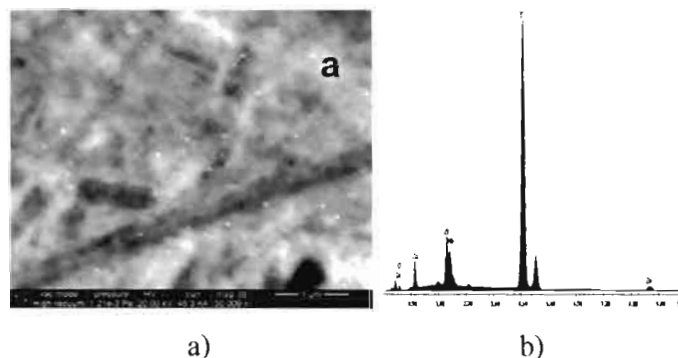


Fig. 2. Micrografie SEM (a) si spectrul EDX (b) pentru acoperirea initiala, antibacteriana de ZnO depusa sonochimic pe suprafata aliajului Ti-15Zr-5Nb

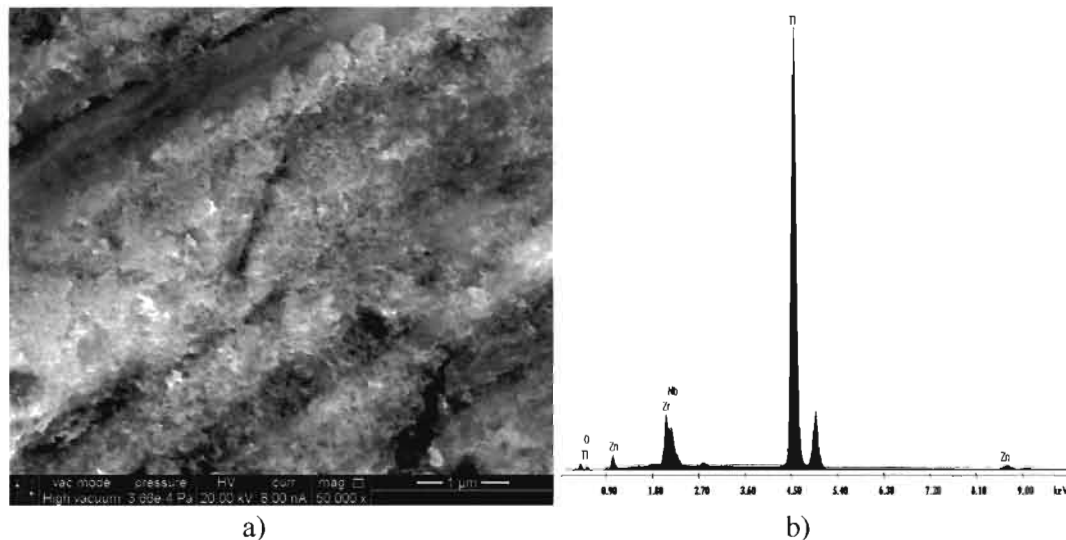


Fig. 4. Micrografie SEM (a) si spectrul EDX (b) pentru acoperirea antibacteriana de ZnO depusa sonochimic pe suprafata aliajului Ti-15Zr-5Nb după 500 ore de imersie in solutie Ringer de pH = 7,58, la 37⁰C

Evaluarea activitatii antibacteriene a nanoparticolelor de zinc

Capacitatea de inhibitie a activitatii bacteriilor se determina fie prin metoda „prin difuzie,, care poate da doar o estimare calitativa vizuala a eficientei antibacteriene, fie prin metoda estimarii turbiditatii care consta in masurarea absorbantei la 600 nm a unui mediu nutritiv lichid inoculat cu microorganismul ales, atat in prezenta agentului potential antibacterian cat si in absenta acestuia, fata de mediul steril, si calcularea indicelui de inhibitie. Datele obtinute pentru stafilococul auriu arata o inhibitie foarte buna de 61.55%.

Determinarea biocompatibilității in vitro a suprafetei procesate sonochimic

Testarea biocompatibilitatii suportului Ti-15Zr-5Nb netratat si tratat sonochimic a fost realizata din studii in contact direct. S-au efectuat studii de proliferare, adeziune, viabilitate, diferentiere, mineralizare a celulelor pre-osteoblaste MC3T3-E1 precum si citotoxicitate a suportului metalic.

Nici aliajul netratat, nici cel tratat antibacterian nu au exercitat efecte citotoxice. Testul MTT (Fig. 5) arata o crestere a valorilor absorbantei formazanului la intervalele de 2 si 4 zile de cultura, remarcandu-se valori aproximativ egale pentru viabilitatea si proliferarea osteoblastelor cultivate atat pe aliajul protejat antibacterian cat si pe cel neprotejat. Atasarea, raspandirea si morfologia celulara au fost asemanatoare pentru cele doua probe si evidentiaza organizarea actinei citoscheletice in fibre de stres. Mineralizarea matricei extracelulare este considerata un punct critic de evaluare pe termen lung a diferentierii celulare. Analizele calitative si cantitative au evidentiat o crestere semnificativă a mineralizarii matricei

extracelulare pe probele supuse tratamentului sonochimic, atat la 3 cat si la 6 saptamani. A rezultat ca aliajul tratat sonochimic prezinta o mai buna biocompatibilitate in comparatie cu cel netratat.

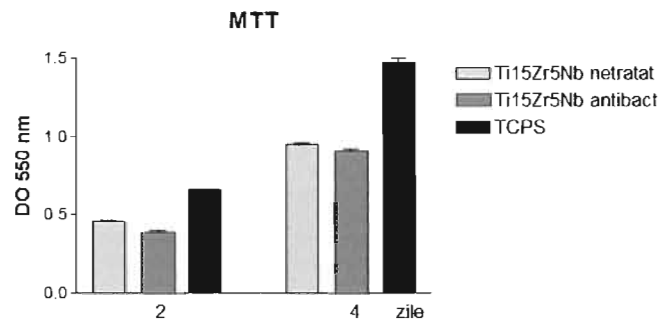


Fig.5. Rata de proliferare a celulelor MC3T3-E1 crescute in contact cu aliajul Ti-15Zr-5Nb netratat si tratat antibacterian

Monitorizarea rezistentei la coroziune si a activitatii antibacteriene a acoperirii bacteriostatice

Monitorizarea rezistentei la coroziune a acoperirii antibacteriene pe baza de ZnO in solutii 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 si variatia acestora in timp: i_{cor} – densitatea curentului de coroziune; V_{cor} – viteza de coroziune; R_p – rezistenta de polarizare. Monitorizarea activitatii antibacteriene s-a apreciat din cantitatea totala de ioni eliberati in solutie – Ion release.

Datele din Tabelul 1 arata o imbunatatire 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 efectiva a ariilor active de pe suprafata aliajului, prin actiunea 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 of 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 in timp a aliajului procesat antibacterian este diferita de cea a aliajului neprocesat si anume: aliajul procesat a prezentat o scadere a curentului de coroziune, i_{cor} , a vitezei de coroziune, V_{cor} , a Ion release si o crestere a rezistentei de polarizare, R_p , ceea ce indica o crestere a rezistentei la coroziune in timp; pentru aliajul neprocesat, i_{cor} , V_{cor} , si Ion release au crescut in timp iar R_p a scazut ca urmare a unei usoare susceptibilitati la coroziune, adica a unei scaderi a rezistentei 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].

Tabel 1. Principalii parametri de coroziune pentru aliajul Ti-15Zr-5Nb neprocesat si procesat antibacterian cu ZnO, dupa imersie in solutii Ringer la 37⁰C

Material	Timp (h)	i_{cor} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	V_{cor} ($\mu\text{m}/\text{an}$)	Clasa de rezistenta	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
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 rezulta ca nanoacoperirea antibacteriana cu zinc asigura buna protectie antibacteriana si impotriva coroziunii precum si buna biocompatibilitate.

REVENDICARI

Procedura sonochimica pentru nanoacoperire antibacteriana aplicata pe suprafata unui nou aliaj ternar de titan cu aplicatie in implantologia ortopedica

Depunerea de nanoparticole antibacteriene pe suprafete metalice prin metoda sonochimica se aplica pentru activitate antibacteriana de lunga durata a implanturilor ortopedice.

Procedura de obținere nanoacoperire antibacteriana aplicata pe suprafata unui nou aliaj ternar de titan, Ti-15Nb-5Zr **caracterizata prin aceea ca** utilizeaza metoda sonochimica de impregnare cu nanoparticole de zinc (din solutie apoasa, ecologica) a suprafetei aliajului.