



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00514**

(22) Data de depozit: **20/07/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2020** BOPI nr. **2/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2018 BOPI nr. **1/2018**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI"**
DIN CLUJ-NAPOCA,
STR. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 1,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• **MAGYARI KLARA-DOROTTYA,**
STR. DONATH NR. 105, AP. 73,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• **NAGY-SIMON TIMEA, STR. MALNAȘ**
NR. 25, COVASNA, CV, RO;
• **LAZĂR ADRIANA, ALEEA BĂLEA**
NR. 20-22, AP. 19, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• **BAIA GHEORGHE-LUCIAN,**
STR. L. REBREANU NR. 17A, AP. 10,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
S. SIMON, R. CICEO LUCACEL, T. RADU,
L. BAIA, I. PONTA, A. IEPURE, V. SIMION,
"GOLD NANOPARTICLES DEVELOPED
IN SOL-GEL GLASS COMPOSITES",
J. MATER. SCI: MATER MED, 2012;
V. AINA, G. CERRATO, G. MARTRA,
L. BERGANDI, C. COSTAMAGNA,
D. GHIGO, G. MALAVASI, G. LUSVARDI,
L. MENABUE, "GOLD CONTAINING
BIOACTIVE GLASSES: A SOLID STATE
SYNTHESIS TO PRODUCE ALTERNATIVE
BIOMATERIALS FOR BONE
IMPLANTATIONS", JOURNAL OF THE
ROYAL SOCIETY, 2013

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE DE STICLE BIOACTIVE**
POROASE DOPATE CU NANOPARTICULE DE AUR



RO 132343 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere de sticle bioactive poroase, de tip
60SiO₂ · 32CaO · 8P₂O₅, dopate cu nanoparticule de aur, cât și utilizarea acestora ca materiale
3 bioactive, biocompatibile, cu viabilitate îmbunătățită.

5 În plus, nanoparticulele de Au își păstrează proprietățile și după înglobarea lor în matri-
cea de sticlă, iar dimensiunea acestora poate fi controlată. Prezenta invenție este aplicabilă ca
7 material bioactiv și material biocompatibil în ingineria tisulară. Nanoparticulele de aur sferice cu
diametre mai mici de 5 nm sunt toxice pentru celule deoarece penetrează cu ușurință peretele
9 celulelor, provocând moartea acestora, după cum a fost descris de **Uhn Lee, Chan-Jong Yoo,
Yong-Jung Kim, and Young-Mi Yoo in, J. Biosci. Bioeng. (2015)**. De aceea este indicat ca
11 nanoparticulele de aur înglobate în sticlă să aibă diametrul de peste 10 nm. S-a dovedit faptul
că, prin introducerea atomilor de Au în sticla preparată prin metoda sol-gel, folosind acid
13 cloroauric (HAuCl₄ · 3H₂O), se pot obține nanoparticule de aur cu diametru de peste 25 nm, dar
pot apărea și ioni de aur Auⁿ⁺ (n = 1 sau 3) și Au⁰ în formă de atomi izolați, după cum a fost
15 descris de **G. Lusvardi, G. Malavasi, V. Aina, L. Bertinetti, G. Cerrato, G. Magnacca, C.
Morterra și L. Menabue în Langmuir (2010)** și **S. Simon, R. Ciceo-Lucacel, T. Radu, L. Baia,
O. Ponta, A. Iepure și V. Simon în J Mater Sci: Mater Med (2012)**.

17 De aceea, noutatea invenției constă în înglobarea nanoparticulelor de aur în matricea
poroasă de sticlă silicatică bioactivă, biomaterialul rezultat având proprietăți de bioactivitate,
19 biocompatibilitate și viabilitate îmbunătățite. Procedeu de înglobare a nanoparticulelor de Au
a constat în învelirea nanoparticulelor de Au cu un copolimer bloc, care ulterior a fost utilizat ca
21 precursor în procesul de preparare sol-gel, iar în final au fost eliminate componentele organice.

23 Din articolul **S. Simon, R. Ciceo Lucacel, T. Radu, L. Baia, I. Ponta, A. Iepure, V.
Simion, "Gold nanoparticles developed in sol-gel glass composites", J. Mater. Sci: Mater
Med 2012**, se cunoaște o sinteză a unui nou material compozit obținut prin metoda sol-gel, care
25 constă din sticlă bioactivă și nanoparticule de aur, utilizate în medicina regenerativă în aplicații
medicale utilizate la eliberarea particulelor de aur. Pentru obținerea de sticle bioactive de com-
27 poziție 0,3Au₂O₃ · 99,7[61,5SiO₂ · 30,8CaO · 7,7P₂O₅] dopate cu 0,399,7 Au₂O₃, se utilizează
tetraortosilicat și clorură de aur. Se prepară o mixtură din TEOS:H₂O:HCl (1N) în raport de
29 1:4:0,1, pH de 1,5, se amestecă la temperatura camerei timp de 30 min, rezultând o soluție
clară și omogenă. Rezultatul final și AuCl₃ se dizolvă în acid clorhidric în raport de 1:2, 1:5 și
31 1:13, apoi, după amestecarea energetică a acestora timp de 10 min, se obține un gel vâscos,
care se usucă la temperatura de 110°C timp de 24 h. Rezultatul final se calcinează la 300 și
33 500°C pentru 30 min.

35 Din **V. Aina, G. Cerrato, G. Martra, L. Bergandi, C. Costamagna, D. Ghigo, G.
Malavasi, G. Lusvardi, L. Menabue, "Gold containing bioactive glasses: a solid state
synthesis to produse alternative biomaterials for bone implantations", Journal of the
37 Royal Society, 2013**, se cunoaște o analiză a sticlelor bioactive care conțin nanoparticule de
aur, și două compoziții de sticle cu formula molară 46,2 SiO₂ · 24,3Na₂O · 26,9CaO · 2,
39 6P₂O₅ · x Au₂O (unde x poate fi intervalul 0...0,050). Produsul final poate fi obținut prin amesteca-
rea a Na₂CO₃, CaCO₃, SiO₂, Na₃PO₄ · 12H₂O și HAuCl₃ · 3H₂O într-un recipient timp de 1 h.
41 Amestecul a fost introdus în cuptorul electric la temperatura de 1350°C, temperatura
menținându-se constantă timp de 1 h. Pentru a avea loc reducerea termală a ionilor de aur
43 urmată de formarea de AuNP, pudra de sticlă a fost tratată la temperatura de 600°C timp de 1 h
și 17 h.

45 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unor materiale bioactive
funcționalizate cu molecule specifice, și care prezintă o viabilitate crescută.

RO 132343 B1

Invenția înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se referă la un procedeu pentru obținerea unor sticle silicatic bioactive poroase, dopate cu nanoparticule de aur utilizate în ingineria tisulară. Procedeu de obținere a acestora constă în prepararea nanoparticulelor de aur și învelirea lor în copolimer bloc, prepararea sticlelor dopate cu nanoparticule de aur învelite în copolimer bloc prin metoda sol-gel, maturarea gelului rezultat timp de 1...9 zile, uscarea la o temperatură de 50...140°C, tratarea termică a xerogelului rezultat la temperatura de 300...800°C, din care se obțin sticle bioactive, biocompatibile și cu viabilitate celulară îmbunătățită.	1 3 5 7
Spectrele de absorbție electronică ale nanoparticulelor coloidale de Au au fost înregistrate cu spectrometrul Jasco V-670 UV-Viz-NIR cu o rezoluție spectrală de 1 nm. Înregistrarea spectrelor de absorbție electronică ale sticlelor dopate cu nanoparticulele de Au au fost înregistrate cu spectrometrul UV-Viz Analytic Jena Specord 250 plus cu o rezoluție spectrală de 2 nm. Imaginile TEM au fost înregistrate cu microscop electronic cu transmisie de înaltă rezoluție Tecnai F20 XTWIN cu emisie în câmp, echipat cu o cameră de achiziție CCD Eagle 4k.	9 11 13
Pentru caracterizarea structurală și morfologică a sticlelor obținute au fost folosite un difractometru de raze X (DRX), un spectroscop în infraroșu cu transformata Fourier (FT-IR) și un microscop electronic de baleaj (SEM).	15 17
Analizele de difracție de raze X au fost efectuate pe difractometrul Shimadzu XRD 6000 cu radiația CuK α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), cu filtru Ni. Dimensiunile medii ale cristalitelor au fost calculate din lățimea la semiînălțimea picurilor caracterisice cu ajutorul formulei lui Scherrer. Spectrele FT-IR au fost înregistrate cu spectrometrul Jasco 6000 (Jasco, Tokyo, Japan), la temperatura camerei, în intervalul 400...4000 cm $^{-1}$, folosind tehnica de pastile KBr.	19 21
Bioactivitatea <i>in vitro</i> a materialelor a fost evaluată prin urmărirea creșterii stratului de tip apatitic format pe suprafața probelor, după imersia acestora în fluidul biologic simulat care a fost preparat după protocolul lui Kokubo, descris de T. Kokubo și H. Takadama în Biomaterials (2006) . Stratul apatitic a fost detectat prin măsurători DRX, SEM și FT-IR.	23 25
Pentru a prezice biocompatibilitatea <i>in vitro</i> a sticlelor obținute a fost urmărită adsorbția proteinei pe suprafața materialului. Adsorbția proteinei pe suprafața probelor în prima etapă a fost evaluată calitativ prin măsurarea potențialului zeta, după care a fost determinată cantitativ prin spectroscopia de fluorescență.	27 29
Potențialul zeta a fost măsurat cu Malvern Instrument Zetaiser Nano-ZS la temperatura de 25°C. Rezultatul a fost obținut din media aritmetică a trei măsurători. Spectrele de fluorescență au fost înregistrate cu spectrofluorimetrul Jasco LP-6500 la lungimea de undă de excitație de 278 nm, în celule de cuarț de 2 mm.	31 33
Biocompatibilitatea materialelor a fost analizată prin schimbarea conformației proteinelor, precum și prin viabilitatea celulară.	35
Eventualele modificări în conformația proteinelor după adsorbția pe suprafață presupune afectarea biocompatibilității materialului, precum și posibilitatea de a funcționaliza materialul studiat. Structura secundară a proteinelor a fost analizată prin deconvoluția semnalului de absorbție a amidei I din spectrul FTIR, după cum a fost descris de A. Barth în Biochimica et biophysica acta (2007) . Spectrele FT-IR ale materialelor după atașarea proteinei au fost înregistrate cu microscopul FT-IR Jasco-5000 cuplat la spectrometrul Jasco FT-IR 6000 în reflectantă, în domeniul spectral 400...4000 cm $^{-1}$, cu o rezoluție spectrală de 4 cm $^{-1}$, folosind obiectivul Cassegranian cu o mărire de 32 de ori și cu aria de măsurare ~50 x 50 μm . Localizarea poziției componentelor suprapuse ale amidei I a fost efectuată prin analiza derivatei a doua folosind JASCO Spectra Manager. Deconvoluția benzii de absorbție a amidei I a fost realizată cu o funcție Gaussiană, după aplicarea unei corecții la linia de bază, între 1720 și 1600 cm $^{-1}$.	37 39 41 43 45 47

RO 132343 B1

1 În exemplul 1 sunt prezentați parametrii de sinteză ai unor sticle cu conținut de nano-
particule de aur, analizarea lor din punct de vedere structural și morfologic, iar în exemplele 2-4
3 sunt prezentate testele de bioactivitate, a proprietății de funcționalizare și a biocompatibilității
unor sticle cu conținut de nanoparticule de aur. Pentru a vedea dimensiunea și forma nano-
5 particulelor coloidale de Au și ale nanoparticulelor învelite în copolimer bloc au fost înregistrate
spectre de absorbție în ultraviolet și vizibil, precum și imagini de microscopie electronică de
7 transmisie (TEM). Rezultatele obținute au fost ulterior comparate cu aceleași tipuri de rezultate
obținute pe sticle dopate cu Au, pentru a se urmări dacă se produc schimbări în dimensiunea
9 și/sau forma nanoparticulelor de Au, după înglobarea în matricea de sticlă.

Avantajele utilizării sticlelor obținute pentru aplicații în biomedicină, conform brevetului
11 de față, sunt următoarele:

- 13 - păstrarea proprietăților nanoparticulelor de aur după introducerea în sticlă;
- bioactivitatea materialelor obținute permite utilizarea acestora în ingineria tisulară;
- 15 - materialul compozit obținut este biocompatibil și prezintă o viabilitate crescută;
- aceste materiale au proprietatea de a fi funcționalizate cu molecule specifice;
- ca material biocompatibil pot fi utilizate în ingineria tisulară cu aplicații specifice.

17 Se dau în continuare 4 exemple de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...5.

Exemplul 1

19 Suspensia coloidală de Au a fost preparată prin metoda Turkevich Frens, după cum a
fost descris de G. Frens în Nature Physical Science (1973). Acidul cloroauric (HAuCl_4) se
21 dizolvă în apă ultrapură la concentrație de 10^{-3} M, și se încălzește până la fierbere sub agitare
continuă. Se adaugă rapid 38,8 mM citrat de sodiu ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) în raport volumic de 10:1,
23 se continuă fierberea timp de 20...30 min sub agitare continuă și, la final, coloidul se răcește la
temperatura camerei. Nanoparticulele de aur obținute se stabilizează cu polimerul Pluronic
25 F127 prin amestecarea simplă a soluției coloidale cu soluția de copolimer bloc cu concentrația
finală de $0,5 \dots 10^{-3}$ M. După agitare continuă timp de 20 min, soluția se lasă la temperatura
27 camerei pentru 24 h, ca să se producă reacția. Cu scopul de a elimina polimerii nelegați din
soluție, și pentru a obține soluția concentrată de nanoparticule, coloizii se centrifughează timp
29 de 30 min la 12000 rpm. După obținerea soluției coloidale în concentrația dorită, precum și după
stabilizarea acesteia cu polimer se verifică forma și mărimea nanoparticulelor obținute.

31 În fig. 1 sunt prezentate spectrele de absorbție electronică ale nanoparticulelor de aur
sintetizate (linia neagră) și a nanoparticulelor de aur stabilizat cu Pluronic F127 (linia roșie) în
33 soluții apoase. Nanoparticulele de aur libere au banda plasmonică îngustă în domeniul vizibil
cu un maxim centrat la 518 nm, caracteristic nanoparticulelor de aur sferice individuale. După
35 stabilizarea nanoparticulelor cu polimer apare o deplasare a maximumului de absorbție de 2 nm
spre domeniul roșu, care se datorează schimbării indicelui de refracție în imediata vecinătate
37 a nanoparticulelor de aur, ca urmare a absorbției polimerului. Cu ajutorul imaginilor TEM se
determină distribuția dimensională și morfologică a nanoparticulelor de aur. În fig. 2 putem
39 vedea nanoparticulele de aur specifice cu diametrul de 12 ± 1 nm.

Sticle cu compoziții $60\text{SiO}_2 \cdot 32\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5$; $60\text{SiO}_2 \cdot 32\text{CaO}_8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 15\text{Au}_2\text{O}$ și
41 $60\text{SiO}_2 \cdot 32\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 0,2\text{Au}_2\text{O}$ (mol%) au fost preparate prin metoda sol-gel, folosind
precursorii tetratetil ortosilicat (TEOS), trietil fosfat (TEP), nitrat de calciu tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
43 $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), hidrolizate în prezența acidului nitric. Reactivii au fost adăugați consecutiv la intervale
de 1 h, sub agitare continuă. În final s-a adăugat soluția de nanoparticule coloidale agitând timp
45 de 1 h. Soluția (sol) s-a introdus în recipiente închise și a fost păstrată la temperatura de 37°C
până la gelare (gel), care a durat aproximativ o zi. Gelul obținut a fost lăsat la maturat timp de
47 3 zile la 37°C , după care a fost uscat la 110°C timp de 24 h. Stabilizarea materialului a fost făcut
prin tratament termic la temperatura de 600°C , timp de 3 h. Această temperatură a fost

determinată prin analiză termică diferențială pe gelul uscat. Toate analizele au fost efectuate pe probe sub formă de pulbere. Forma și mărimea nanoparticulelor de Au înglobate în structura sticlei au fost verificate prin măsurarea spectrului de absorbție, prezentat în fig. 3, și analize TEM, prezentate în fig. 4. Deplasarea benzii plasmonice spre roșu (de la 520 la 536 nm) indică prezența unor nanoparticule de Au mai mari decât a nanoparticulelor de aur din coloidul preparat inițial. Acest comportament se datorează aglomerării/agregării nanoparticulelor de Au după înglobarea lor în matricea de sticlă; în timpul tratamentului termic se elimină conținutul de polimer și apare agregarea suplimentară a nanoparticulelor, ca rezultat al mobilității mari a nanoparticulelor de aur și viscozității mici a matricei de sticlă silicatică, după cum a fost descris de **G. Lusvardi, G. Malavasi, V. Aina, L. Bertinetti, G. Cerrato, G. Magnacca, C. Morterra și L. Menabue în Langmuir (2010)**. Lărgirea benzii de absorbție indică polidispersitatea nanoparticulelor de aur încorporate în matricea de sticlă. Imaginile TEM confirmă aceste rezultate, ca urmare, după tratamentul termic, o parte din nanoparticulele de aur din sticlă își păstrează dimensiunea din coloid (12 ± 1 nm), dar apar și nanoparticule de Au cu dimensiuni de până la 100 nm. Prezența nanocristalelor de aur în structura sticlei este confirmată de difractograma de raze X prezentată în fig. 5. Liniile de difracție (100), (200), (220) și (311) aparțin planelor cristalografice ale structurii cubice cu fețe centrate, după cum a fost descris de **Sirajuddin, A. Mechler, A.A.J. Torriero, A. Nafady, G-Y. Lee, A.M. Bond, A.P. O'Mullane, S.K. Bhargava în Colloids and Surface A (2010)**. Pentru a asocia mai ușor faza nanocristalelor de aur, în difractograma de raze X a fost inclusă difractograma aurului preluat din baza de date RRUFF (RUFF ID: R0702791). Media mărimii cristalitelor de nanoparticule de aur obținute prin ecuația Scherrer este de 20,37 nm. Spectrele de vibrație în infraroșu obținute pe probele investigate sunt prezentate în fig. 6. Acestea au benzi caracteristice rețelei silicatică, și nu sunt influențate de prezența nanoparticulelor de aur, datorită conținutului mic al acestora. Se pot identifica vibrații specifice ale grupării Si-O-Si după cum urmează: vibrații de întindere asimetrică Si-O-Si (1080 și 1200 cm^{-1}), vibrație de întindere Si-O în structura tetraedrală SiO_4 care conține un atom de oxigen nelegat [Si-O-NOB] în intervalul $890 \dots 975$ cm^{-1} , vibrații de întindere simetrică Si-O-Si (800 cm^{-1}) și vibrație de deformare Si-O-Si (~ 460 cm^{-1}). Vibrații de deformare ale grupărilor fosfatice apar ca dublet la valorile 565 și 604 cm^{-1} .

Exemplul 2

Bioactivitatea *in vitro* a probelor cu conținut de nanoparticule de aur a fost testată în fluidul biologic simulat. După doar 7 zile de imersie se poate observa stratul apatitic autoasamblat pe suprafața probelor.

În fig. 8 sunt prezentate difractograme de raze X obținute după 7 zile de imersie. La toate probele este vizibilă apariția fazei cristaline de hidroxiapatită evidențiată prin peak-urile de la $25,4^\circ$ (002) și $31,5^\circ$ (211) în geometrie 2θ . Peak-ul de difracție larg între valorile 30° și 54° (20) corespunde componentelor suprapuse ale planelor cristalografice (112), (300) și (202) a hidroxiapatitei cristaline, după cum a fost descris de **R.K. Singh, A. Srinivasan în Applied Surface Science (2010)**. Aceste componente suprapuse sunt mai bine evidențiate la proba $60\text{SiO}_2 \cdot 32\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 0,2\text{Au}_2\text{O}$. Pentru a asocia mai ușor faza apatitică, în difractograma de raze X a fost inclusă difractograma hidroxiapatitei preluată din baza de date RRUFF (RUFF ID: R060180). În spectrele FT-IR prezentate în fig. 9 se observă faptul că după imersie în fluidul biologic simulat se accentuează dubletul la valorile 604 și, respectiv, 564 cm^{-1} , dublet caracteristic fazei cristaline de hidroxiapatită. Imaginile SEM prezentate în fig. 9 confirmă formarea stratului apatitic pe suprafața probelor după imersie în fluid biologic simulat. Cu toate că faza apatitică se formează pe suprafața tuturor probelor analizate, diferența apare în

1 morfologia stratului format, care depinde de conținutul de nanoparticule de aur, indicând influen-
2 ța nanoparticulelor de aur asupra bioactivității. În cazul probei $60\text{SiO}_2 \cdot 32\text{CaO}_8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 0,15\text{Au}_2\text{O}$
3 stratul depus conține forme sferice, iar la proba $60\text{SiO}_2 \cdot 32\text{CaO}_8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 0,2\text{Au}_2\text{O}$, pe lângă forme
sferice, apar nanostructuri tridimensionale de tip "floare".

5 Exemplul 3

6 Proprietățile de funcționalizare ale materialelor au fost testate prin monitorizarea adsor-
7 bției albuminei serice bovine (BSA). Teste calitative au fost efectuate prin măsurarea potenția-
lului zeta. Pentru a urmări schimbările de încărcare cu sarcină electrică de pe suprafața sticlei,
9 înainte și după adsorbția proteinei, potențialul zeta a fost măsurat în soluție apoasă. Având în
vedere că potențialul zeta al sticlei este în jur de -24 ± 3 mV, iar potențialul zeta al moleculei de
11 BSA este -17 mV, s-a calculat modificarea relativă a potențialului zeta al sticlei înainte și după
adsorbția albuminei, datele fiind prezentate în fig. 10a. Se poate vedea că, odată cu creșterea
13 conținutului de nanoparticule de aur în compoziția sticlei, crește diferența potențialului zeta care
se datorează cantității mai mari a albuminei adsorbite. În pasul următor a fost evaluată cantitativ
15 adsorbția de BSA prin spectroscopie de fluorescență. Intensitatea de fluorescență a soluției cu
BSA după separarea de probe scade odată cu creșterea conținutului de nanoparticule de aur
17 în probă. Folosind soluția inițială de BSA, care a fost păstrată în condiții asemănătoare, s-a
calculat masa BSA adsorbită pe suprafață, calcul efectuat prin scăderea cantității BSA măsurate
19 în supernatant din cantitatea de BSA măsurată din soluțiile inițiale. Rezultatul obținut este
prezentat în fig. 10b și este în concordanță cu cele obținute pentru evaluarea potențialului zeta
21 în ceea ce privește cantitatea de BSA adsorbită, care prezintă o creștere odată cu creșterea
conținutului de nanoparticule de aur.

23 Albumina adsorbită pe suprafața probelor a fost confirmată și prin spectroscopia FT-IR
prin apariția benzii caracteristice de absorbție pentru proteine: amida I (1650 cm^{-1}), amida II
25 (1550 cm^{-1}) și amida III ($\sim 1400\text{ cm}^{-1}$), după cum poate fi observat în fig. 11.

27 Exemplul 4

28 O primă evaluare a biocompatibilității *in vitro* a fost efectuată prin urmărirea eventualelor
schimbări conformaționale ale albuminei serice bovine după adsorbția pe suprafața probelor.
29 În fig. 13 sunt prezentate deconvoluțiile benzii de absorbție din spectrele FT-IR ale amidei I,
înainte și după atașare. Structura secundară a BSA este dominată de structura a helix ($1649-$
31 1657 cm^{-1}), cu cantitate mică de structură (3-sheet ($1618-1641$ și $1674-1695\text{ cm}^{-1}$) și structură
 β -turn ($1662-1686\text{ cm}^{-1}$), cum a fost descris de **A. Barth în Biochimica et Biophysica Acta**
33 **(2007)** și **S. Nafis, G. Bagheri Sadeghi, A. Panah Yab în Journal of Photocemistry and**
Photobiology B (2011). Benzile de absorbție între $1608...1618\text{ cm}^{-1}$ se pot asocia cu existența
35 reziduurilor de β -sheet, respectiv, lanțuri secundare de aminoacid. Se știe că atât structura de
 α -helix, cât și structura de β -sheet sunt stabilizate prin legături de hidrogen, însă structura de
37 α -helix este mult mai flexibilă și rezistentă la condiții de mediu înconjurător. Deci, când proteina
se atașează pe o suprafață, apar schimbări conformaționale și, de obicei, structura β -sheet
39 cedează și intră într-o formă mai flexibilă. Exact această situație apare și în cazul de față, cum
este prezentat în fig. 13, și anume, structura secundară a albuminei adsorbite se modifică ușor
41 prin scăderea structurii β -sheet, însă structura α -helix rămâne neschimbată. Acest rezultat
indică biocompatibilitatea materialelor. Următorul pas în evaluarea bioactivității a fost studiul *in*
43 *vitro* a viabilității celulare. S-au folosit cheratinocite umane, a căror viabilitate în prezența
sticlelor era foarte apropiată sau mai mare de 100%, indicând bună toleranță *in vitro*, așa cum
45 este prezentat în fig. 14.

47 Fig. 1 - spectre de absorbție electronică ale nanoparticulelor de aur sintetizate (linia
neagră) și nanoparticulelor de aur stabilizate cu Pluronic F127 (linia roșie).

RO 132343 B1

Fig. 2 - imaginea TEM a nanoparticulelor de aur stabilizate cu Pluronic F127.	1
Fig. 3 - spectre de absorbție electronică ale probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$.	3
Fig. 4 - imaginea TEM a probei de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot 31,85\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 0,15\text{Au}_2\text{O}$.	
Fig. 5, difractograme de raze X ale probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$.	5
<i>Difractograma aurului ca și referință</i>	7
Fig. 6 - spectre FT-IR ale probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$.	
Fig. 7 - difractograme de raze X ale probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ după imersie în fluidul biologic simulat timp de 7 zile. Difractograma aurului și a hidroxiapatitei au fost incluse ca referințe.	9 11
Fig. 8 - spectre FT-IR ale probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ după imersie în fluidul biologic simulat timp de 7 zile. Spectrul FT-IR al hidroxiapatitei a fost inclus ca și referință.	13
Fig. 9 - imaginile SEM ale probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ înainte și după imersie în fluid biologic simulat (SBF).	15
Fig. 10 - diferența potențialului zeta obținută pentru probele investigate înainte și după adsorbția albuminei serice bovine (BSA) (a). Masa de BSA adsorbită pe 1 mg de sticlă a fost obținută prin spectre de fluorescență (b).	17 19
Fig. 11 - spectre FT-IR ale probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ după adsorbția albuminei serice bovine (BSA).	21
Fig. 12 - deconvoluția spectrului de absorbție a amidei I ($1720\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) a albuminei serice bovine (BSA) liofilizată înainte și după adsorbția pe suprafața probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$.	23
Fig. 13 - distribuția elementelor de structură secundară în albumina serică bovină (BSA) liofilizată înainte și după adsorbția pe suprafața probelor de sticlă $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$.	25 27
Fig. 14 - viabilitatea celulelor cherationocite umane după interacția timp de 24 h cu diferite concentrații de sticle $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$.	29

RO 132343 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu pentru obținerea de sticle bioactive de tip $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ dopate cu diferite cantități de Au, **caracterizat prin aceea că** în prepararea acestor sticle au fost utilizate următoarele etape:

5

a) obținerea nanoparticulelor de aur și învelirea acestora în copolimer bloc de tip Pluronic;

7

b) obținerea sticlelor dopate cu nanoparticule de aur prin metoda sol-gel;

9

c) maturarea gelului obținut în etapa b) timp de 1...9 zile;

d) uscarea gelului maturat la temperatura de 50...140°C;

11

e) tratarea termică la o temperatură de 300...800°C.

13

2. Utilizarea sticlelor bioactive dopate cu nanoparticule de aur, de la revendicarea 1, ca materiale bioactive, biocompatibile, cu viabilitatea celulară îmbunătățită.

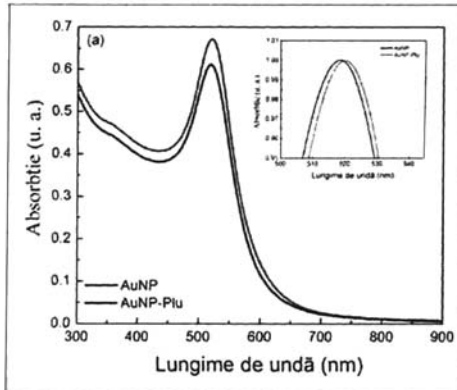


Fig. 1

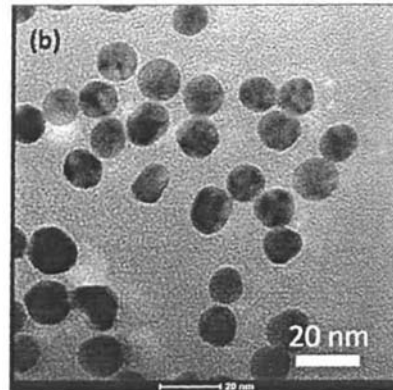


Fig. 2

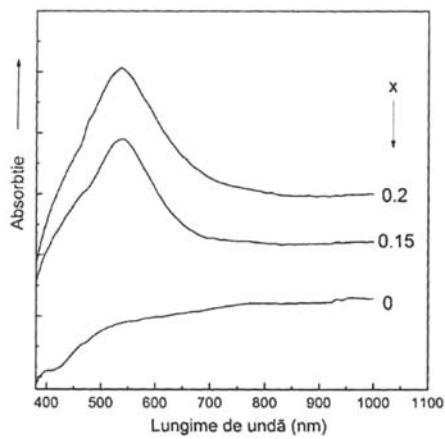


Fig. 3

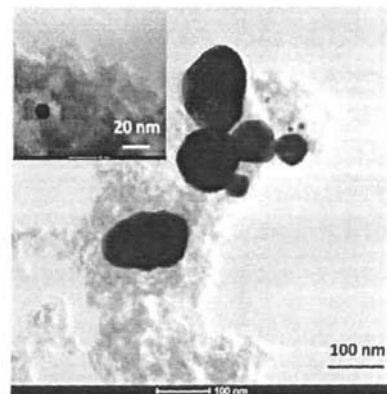


Fig. 4

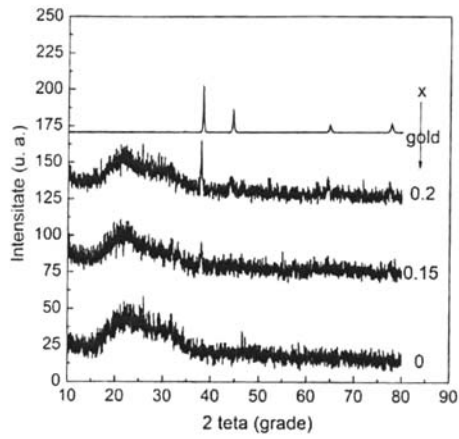


Fig. 5

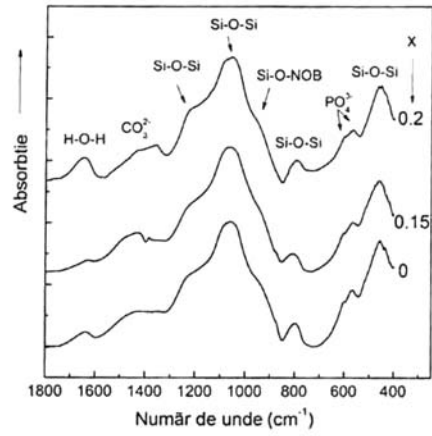


Fig. 6

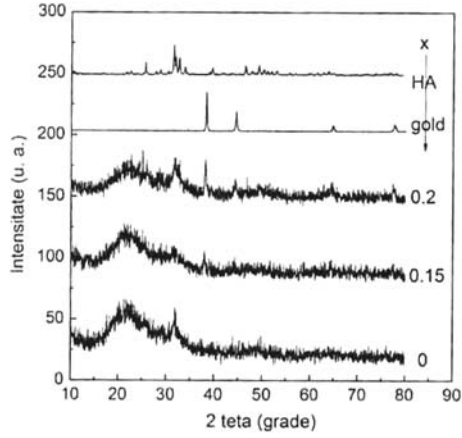


Fig. 7

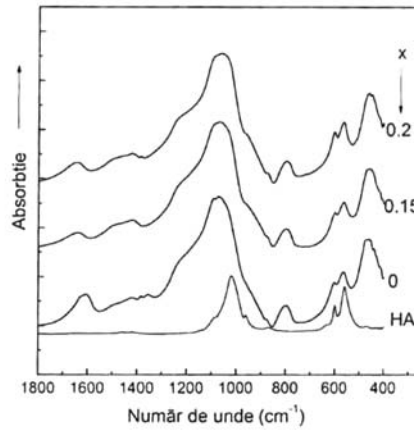


Fig. 8

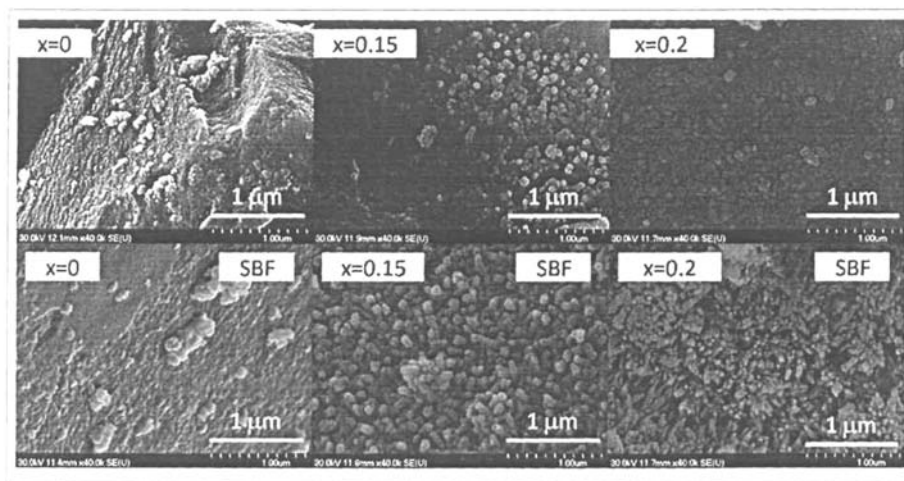


Fig. 9

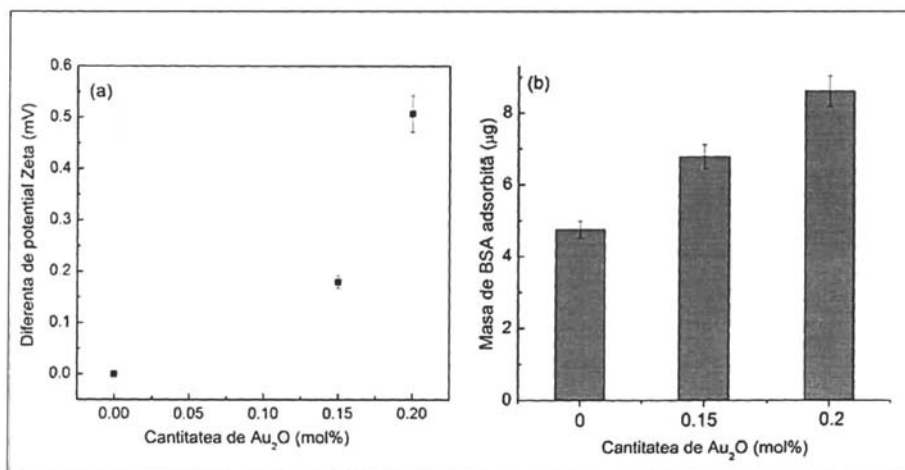


Fig. 10

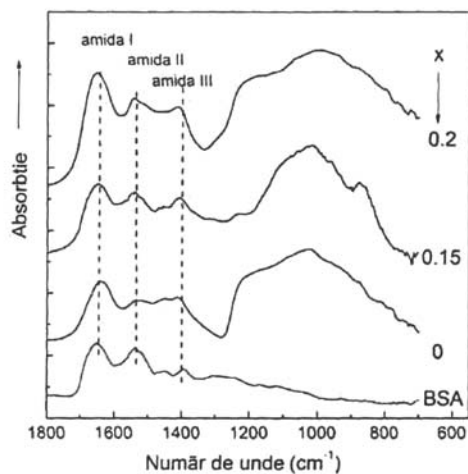


Fig. 11

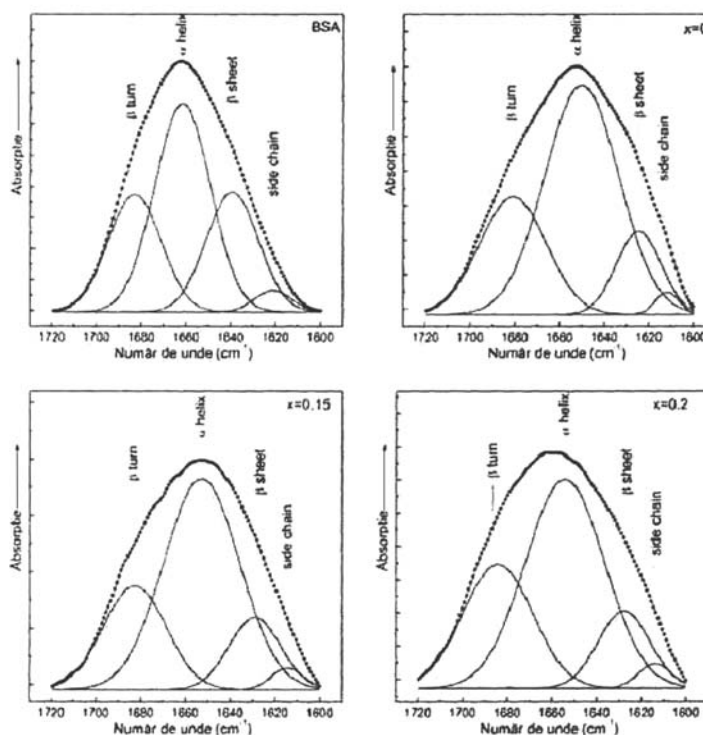


Fig. 12

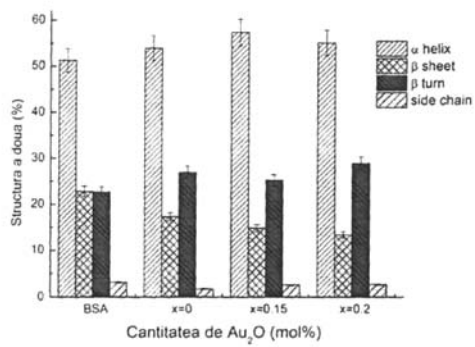


Fig. 13

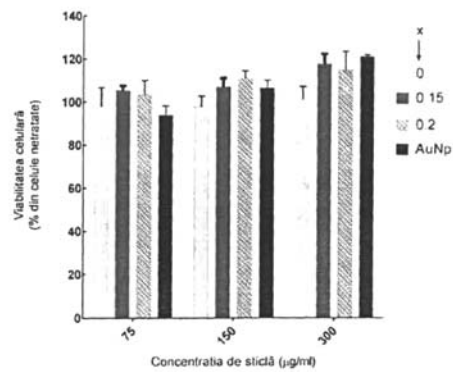


Fig. 14

