



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00769**

(22) Data de depozit: **28/09/2017**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. **3/2019**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA MATERIALELOR,
STR. ATOMIȘTILOR NR. 405A,
MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **PREDOI DANIELA, CALEA PLEVNEI
NR.94, BL.10D2, SC.1, ET.4, AP.12,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GHIȚĂ RODICA, STR.VIORELE NR.34,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ICONARU SIMONA-LILIANA, ȘOS. VIILOR
NR. 101, BL. 1, SC. 6, ET. 6, AP. 185,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **BEURAN MIRCEA,
ȘOSEAUA MIHAI BRAVU, NR.8, BL. P22 A,
SC.A, ET.5, AP.10, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PRODAN ALINA MIHAELA,
STRADA MINIS, NR.2, BL. X5, SC.1, ET.2,
AP.26, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO**

Data publicării raportului de documentare:
29/03/2019

*Această publicație include și modificările descrierii,
revendicărilor și desenelor, depuse conform art. 35,
alin. (20), din HG nr. 547/2008.*

(54) **BIOPANSAMENT PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ DOPATĂ
CU ARGINT ÎN MATRICE DE COLAGEN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biopansament pe bază de hidroxiapatită dopată cu argint într-o matrice de colagen, pentru tratamentul plăgilor suprainfectate. Procedeu conform invenției constă în prepararea gelurilor de hidroxiapatită dopată cu argint din precursori nitrat de calciu, fosfat acid de di-amoniu și nitrat de argint, dizolvate separat în etanol, care se amestecă, cu agitare, timp de 24 h, la temperatura de 40°C, rezultând un gel care este menținut la temperatura camerei timp de 72 h, după care este

dispersat în gel de colagen până la omogenizare, gelul rezultat este transferat într-o matrită de formare, și supus unui tratament termic la o temperatură sub 0°C, timp de 24 h, urmat de temperatura de 35...45°C, produsul rezultat fiind sterilizat și stocat.

Revendicări inițiale: 1
Revendicări amendate: 1
Figuri: 6



DESCRIEREA INVENȚIEI

Biopansament pe baza de Hidroxiapatita dopata cu Argint in matrice de Colagen

Prezenta invenție se referă la obținerea printr-o metodă simplă și cu costuri mici a unui pansament pe bază de hidroxiapatită dopată cu argint într-o matrice de colagen pentru aplicații biomedicale. Unul dintre riscurile majore asociate intervențiilor chirurgicale ortopedice și dentare este reprezentat de apariția infecțiilor postoperatorii [1-3]. În acest context, găsirea unui nou biomaterial cu proprietăți antimicrobiene îmbunătățite are un aspect important. Unul dintre biomaterialele des utilizate în domeniul biomedical este hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [4]. HAp a atras atenția cercetătorilor din întreaga lume, datorită faptului că este principalul component anorganic al țesutului osos și este utilizat în diverse aplicații, cum sunt implanturile, reconstrucția osoasă, transportor de medicamente, etc. [1, 5].

Mai mult, studii recente raportate în literatura de specialitate au arătat că HAp posedă proprietăți biologice deosebite cum ar fi biocompatibilitate, bioactivitate, non-toxicitate, osteoinductivitate, etc. [4]. Pe de altă parte, hidroxiapatita prezintă o structură unică care permite substituția cu diverși ioni metalici, cum ar fi: Ag, Zn, Cu, Eu, etc, elemente ce sunt de interes pentru aplicații medicale [1, 6].

Acest tip de substituții sunt, de asemenea, utile pentru îmbunătățirea proprietăților biologice (antimicrobiene) precum și a proprietăților fizico-chimice ale HAp [7]. Printre tulpinile cele mai des implicate în infecțiile postoperatorii se numără *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, tulpini care în general devin rezistente la tratamentul cu antibiotice [1, 3]. Așadar, este de preferat utilizarea argintului ca agent antimicrobian în locul antibioticelor, deoarece în general tulpinile bacteriene nu dezvoltă rezistență în acest caz [1, 3]. Pe de altă parte, principală componentă organică a țesutului osos este colagenul (tip I), un polimer natural, cu proprietăți biologice deosebite [8]. Datorită proprietăților sale, colagenul a fost folosit în cosmetica, farmacologie și în aplicații medicale [9-10].

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu



Compozitele de tip colagen/hidroxiapatita pot fi obtinute prin diferite metode, inclusiv prin liofilizare, separare de faza indusa termic, etc. [11-18].

Metoda cea mai utilizata este liofilizarea fibrelor de colagen impreuna cu pulberea de HAp [1, 19-20]. Pe de alta parte obtinerea de pansamente pe baza de nanoparticule bioceramice (hidroxiapatita dopata cu argint) inglobate intr-o matrice de colagen este de interes pentru domeniul biomedical in special pentru tratarea infectiilor postoperatorii [1].

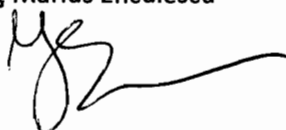
Scopul inventiei a fost de a realiza pansamente pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint inglobata intr-o matrice de colagen eficiente in tratarea infectiilor cutanate.

Problema pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unor pansamente cu eficienta ridicata in tratamentul plagilor suprainfectate la costuri reduse ce ar putea fi utilizate pe scara larga.

Noul pansament a fost obtinut in doua etape. In prima etapa, pentru obtinerea gelurilor de hidroxiapatita dopata cu argint ($\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $x_{\text{Ag}} = 0.1 ; 0.2$) s-au utilizat ca precursori nitratul de calciu (Aldrich, USA), diamoniu hidrogen fosfat (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) si nitratul de argint (Alpha Aesare, Germany). Cantitati potrivite de diamoniu hidrogen fosfat si nitrat de argint au fost dizolvate in etanol. Solutia astfel obtinuta a fost agitata puternic timp de 24 h la 40°C . Separat, o cantitate stoichiometrica de nitrat de calciu a fost dizolvata in etanol si agitata puternic timp de 24 h la 40°C . Ulterior, dupa amestecarea celor doua solutii a fost obtinut un gel care a fost lasat la imbatranit la temperatura camerei timp de 72h [21]. In cea de-a doua etapa, gelul final rezultat dupa imbatranire la temperatura camerei timp de 72h a fost dispersat in gel de colagen pana la omogenizare. Dupa omogenizare gelul a fost transferat intr-o matrita termorezistenta si racit sub temperatura de 0°C timp de 24 de ore. Tratamentul la temperatura scazuta a fost urmat de un tratament termic la temperatura $40\pm 5^\circ\text{C}$ in conditii de laborator. Dimensiunile finale ale produsului rezultat au fost $100\times 100\times 25$ mm. Produsul rezultat (10AgHApColl ($x_{\text{Ag}} = 0.1$) si 20AgHApColl ($x_{\text{Ag}} = 0.2$))a fost sterilizat si stocat in conditii sterile.

Morfologia pansamentelor pe baza de nanoparticule bioceramice inglobate intr-o matrice de colagen a fost studiata cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj.

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu



Micrografiile MEB obtinute pe pansamentele 10AgHApColl si 20AgHApColl sunt prezentate in Figura 1 (A-B). Imaginile MEB obtinute pe pansamentele 10AgHApColl si 20AgHApColl pun in evidenta atat prezenta pulberii de hidroxiapatita dopata cu argint cat si a fibrelor de colagen. De asemenea, se poate observa ca fibrele de colagen sunt inglobate in pulberea de hidroxiapatita dopata cu argint. Tot in Figura 1 (C) este prezentat spectrul EDAX obtinut pe pansamentul 20AgHApColl. Spectrul EDAX evidentiaza prezenta C, Ca, N, P, O si Ag, elementele constituinte ale pansamentului 20AgHApColl. Prezenta Au in spectrul EDAX se datoreaza acoperirii cu aur a suprafetei pansamentului inainte de studiile MEB si EDAX.

Avand in vedere rezistenta crescuta a microbilor fata de terapiile existente la ora actuala s-a dorit dezvoltarea unor noi agenti antimicrobieni eficienti, dar care sa nu prezinte efectele adverse ale terapiilor clasice. S-a incercat dezvoltarea unor biomateriale compozite pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint intr-o matrice de colagen. Pansamentul astfel obtinut a fost testat pentru a-i putea evalua efectul antimicrobian impotriva tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae*. In Figura 2 este prezentata evaluarea *in vitro* a proprietatilor antimicrobiene a pansamentelor pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen asupra celor doua tulpini bacteriene studiate. Rezultatele au evidentiat proprietatile antimicrobiene ale pansamentelor utilizate asupra celor doua tulpini de bacterii gram negative utilizate.

Pentru experimentele *in vivo* a fost necesara realizarea unor plagi in regiunea dorsala a șobolanilor albi de sex feminin din rasa Wistar. Aceste plagi au fost contaminate cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae* (Figura 3). Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae* au fost obținute din plagile postoperatorii infectate ale pacientilor din cadrul Spitalului Clinic de Urgenta Bucuresti. In Tabelul 1 sunt prezentate rezultatele antibiogramei tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae*. Testarea la antibiotice a fost facuta si interpretata conform ghidului CLSI varianta din 2016. Pentru inocularea șobolanilor s-au folosit doua tipuri de tulpini microbiene. Cele doua tulpini folosite în acest studiu sunt considerate ca fiind reprezentative pentru infectiile nozocomiale. Bacteriile prelevate au fost cultivate pe

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu



mediile geloza sange, CLED si mediu cromogen (CHROMagar Orientation) si au fost incubate la 37 °C timp de 24 de ore. Identificarea a fost facuta cu teste biochimice clasice si pe aparatul Microscan (producator Siemens) de identificare si testare la antibiotice. Pentru testarea la antibiotice fost utilizat mediul Mueller Hinton si metoda de testare a antibioticelor Kirby–Bauer, iar interpretarea a fost facuta folosind ghidul CLSI Ed. 2016.

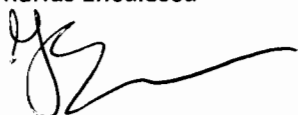
Infectiile de plaga reprezinta o patologie des intalnita in spitalele din Romania. Acestea sunt cauzate de agenti microbieni ce prezinta rezistenta mare fata de terapiile existente la ora actuala pe piata. Infectiile de plaga reprezinta complicatii redutabile, ele crescand atat morbiditatea cat si mortalitatea in randul pacientilor care prezinta aceste complicatii, fapt ce duce la cresterea cheltuielilor de spitalizare si la scaderea calitatii vietii pacientilor. Hidroxiapatita dopata cu argint elibereaza in mod continuu argintul din pansament astfel incat concentrația ionilor de argint este menținută timp de cateva zile la nivelul plagii.

Studiul *in vivo* al efectului pansamentelor pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen a fost realizat la diferite intervale de timp (24 si 48 h) după ce plagile produse in regiunea cervicala a sobolanilor Wistar au fost infectate cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae*. Plaga infectata a fost pansata la 24 de ore si respectiv 48 ore. La fiecare analiza au fost prelevate probe, respectand conditiile de aseptie. In Figurile 4 si 5 sunt prezentate plagile infectate cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae* tratate cu pansamentele pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen dupa 24 si 48 h de tratament.

În urma acestor experimente, au supravietuit toate animalele de laborator carora le-au fost aplicate pansamente cu hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen. De asemenea, pe întreaga durată a desfășurării experimentului, șobolanii nu au prezentat efecte secundare cum ar fi letargie, vărsături sau diaree. Prin aceste studii s-a demonstrat ca incorporarea ionilor de Ag în structura hidroxiapatitei imbunatateste proprietățile chimice și biologice ale acesteia.

Prin incorporarea ionilor de argint in structura hidroxiapatitei prin substitutia ionilor de Ca^{2+} se obtine un nou material ce combina proprietatile biologice ale

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu



hidroxiapatitei cu cele antimicrobiene ale argintului fara efecte secundare ce ar putea aparea din cauza excesului de argint. Pe de alta parte, ionii de argint legati in retea hidroxiapatitei devin mult mai stabili iar efectul antimicrobian se observa pe intervale mai lungi de timp ca urmare a eliberarii constante in timp.

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

5



BIBLIOGRAFIE

1. D. Predoi, S. L. Iconaru, M. Albu, C. C. Petre, G. Jiga, *Polym. Eng. Sci.* 57(6):537-545 (2017).
2. J.F. Agassant, A. Fortin, and Y. Demay, *Polym. Eng. Sci.*, **34**,110 (1994).
3. M. Sygnatowicz, K. Keyshar, and A. Tiwari, *JOM - J. Min. Met. Mat. S.* , **62**, 65 (2010).
4. A. Ewald, D. Hösel, S. Patel, L.M. Grover, J.E. Barralet, and U. Gbureck, *Acta Biomater.* ,7(11), 4064 (2011).
5. S.V. Dorozhkin, *J. Funct. Biomater.* , **6**, 708 (2015).
6. D. Gopia, N. Bhuvaneshwari, L. Kavitha, and S. Ramya, *Ceram. Int.* , **41**, 3116 (2015).
7. M. Supova, *Ceram. Int.*, **41**, 9203 (2015). 18.
8. T.N. Kim, Q.L. Feng, J.O. Kim, J. Wu, H. Wang, G.C. Chen, and F.Z. Cui, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* , **9**, 129 (1998).
9. Md. Shariful Islam, and T. Mitsugu, *Mater. Lett.* , **173**, 231 (2016).
10. H. W. Kim, H. E. Kim and V. Salih, *Biomaterials*, **26**, 5221 (2005).
11. D.I. Zeugolis, S.T. Khew, E.S.Y. Yew, A.K. Ekaputra, Y.W. Tong, L.Y.L. Yung, D.W. Hutmacher, C. Sheppard, and M. Raghunath, *Biomaterials.* , **29**, 2293 (2008).
12. S.C. Rodrigues, C.L. Salgado, A. Sahu, M.P. Garcia, M.H. Fernandes, and F.J. Monteiro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **101A**, 1080 (2013).
13. M.S. Chapekar, *J. Biomed. Mater. Res.*, **53**, 617 (2000).
14. A.G.A. Coombes, E.Verderio, B. Shaw, X. Li, M. Griffin, and S. Downes, *Biomaterials.* , **23**, 2113 (2002).
15. Q.P. Hou, D.W. Grijpma, and J. Feijen, *Biomaterials.* , **24**, 1937 (2003).
16. D.W. Hutmacher, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* , **12**, 107 (2001).
17. E. Piskin, N. Bolgen, S. Egri, and I. Isoglu, *Nanomedicine.* , **2**, 441 (2007).

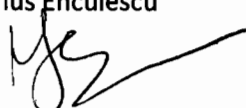
Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu



18. A. Senkoylu, E. Ural, K. Kesenci, A. Simsek, S. Ruacan, L. Fambri, C. Migliaresi, and E. Piskin, *Int. J. Artif. Organs.* , **25**, 1174 (2002).
19. K. Tuzlakoglu, N. Bolgen, A.J. Salgado, M.E. Gomes, E. Piskin, and R.L. Reis, *J.Mater. Sci. Mater.Med.* ,**16**, 1099 (2005).
20. G.M. Cunniffe, G.R. Dickson, S.Partap, K.T. Stanton, and F.J. O'Brien, *J. Mater. Sci. – Mater.Med.* ,**21**, 2293 (2010).
21. S. L. Iconaru, P. Chapon, P. Le Coustumer, D. Predoi, *Scientific World Journal*. 2014; 2014: 165351.

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

7



REVENDICĂRI

- 1- Obținerea printr-o metodă simplă și ieftină a unui pansament cu proprietati antimicrobiene pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen, care testat *in vitro* si *in vivo* si-a dovedit eficienta.

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

8



FIGURI:

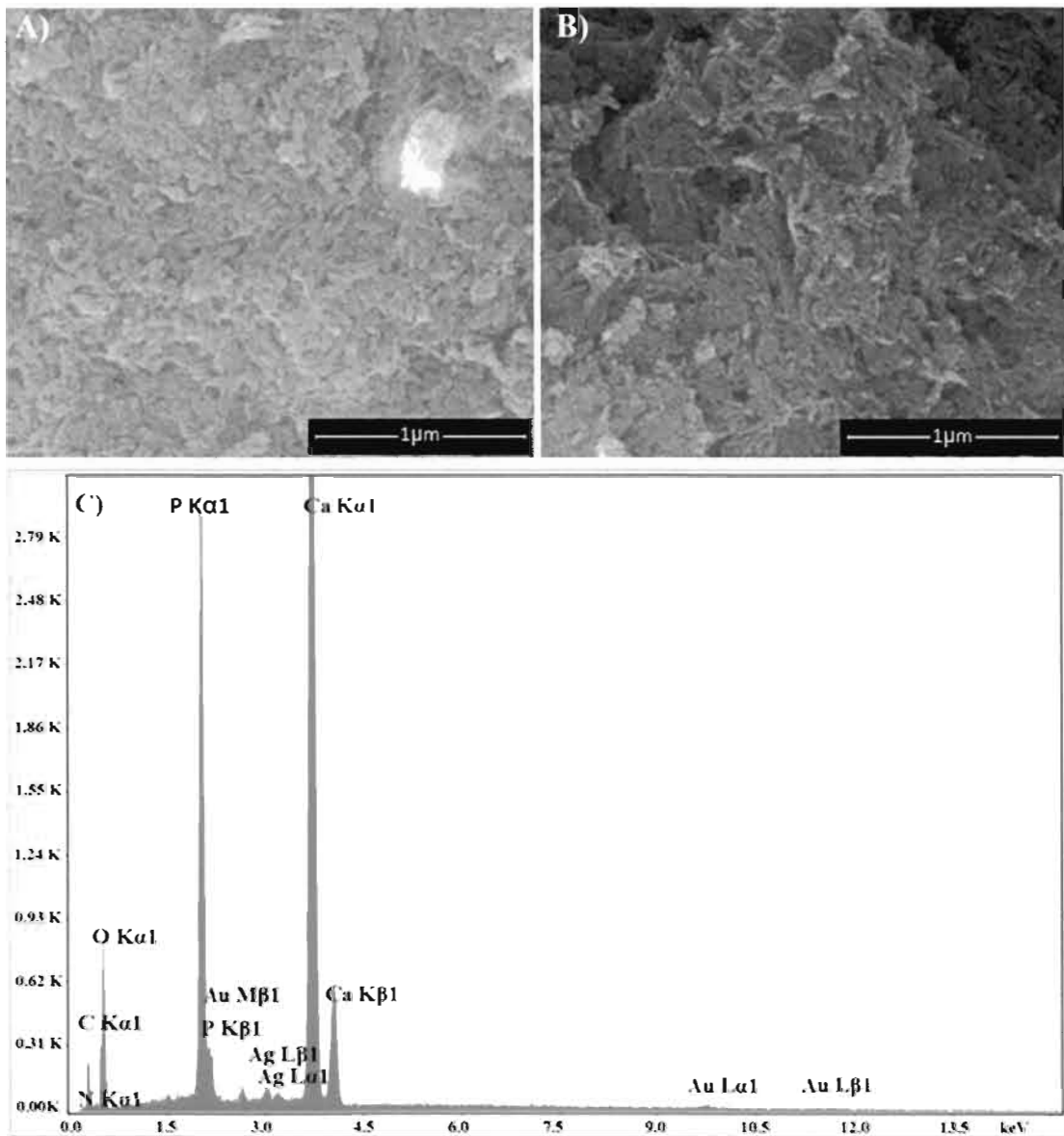


Figura 1: Micrografii MEB ale pansamentelor 10AgHApColl (A) si 20AgHApColl (B) si spectru EDAX obtinut pentru pansamentele 20AgHApColl (C) .

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

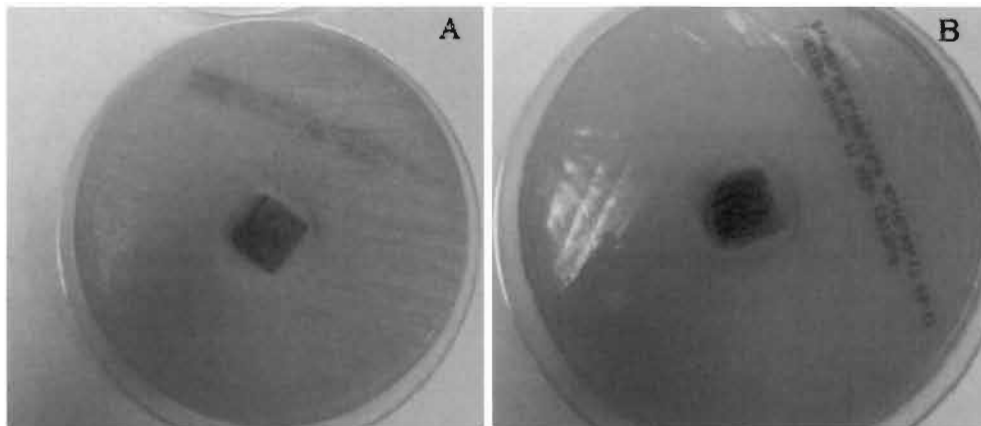


Figura 2 : Efectul antimicrobian al pansamentelor pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen (10AgHApColl) asupra *Pseudomonas aeruginosa* (A) si *Klebsiella pneumoniae* (B).

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

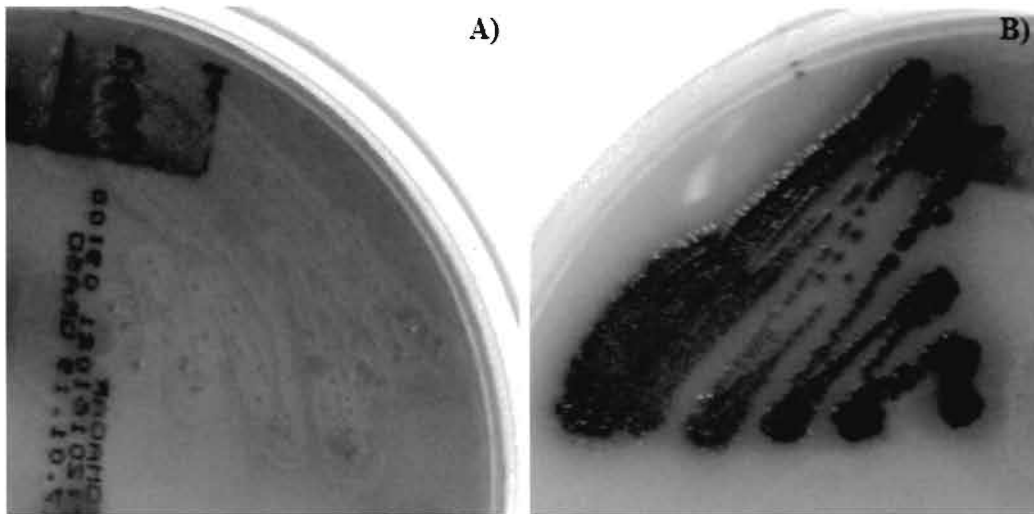


Figura 3: Culturile de *Pseudomonas aeruginosa* (A) si *Klebsiella pneumoniae* (B) din care s-a realizat contaminarea plagilor sobolanilor Wistar.

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

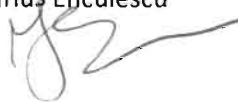




Figura 4 : Plaga infectata cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* (A); plaga infectata cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* cu pansament 10AgHApColl aplicat (B); plaga infectata cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* dupa 24 de h de la aplicarea pansamenului 10AgHApColl (C); plaga infectata cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* dupa 48 de h de la aplicarea pansamenului 10AgHApColl (D).

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

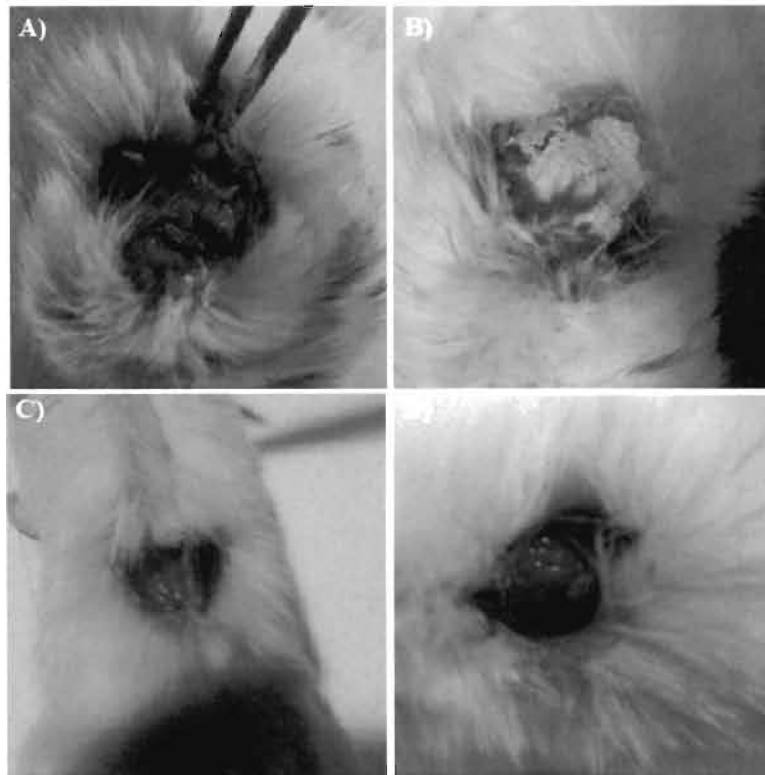


Figura 5: Plaga infectata cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae*(A); plaga infectata cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae* cu pansament 10AgHApColl aplicat (B); plaga infectata cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae* dupa 24 de h de la aplicarea pansamenului 10AgHApColl (C); plaga infectata cu tulpini de *Klebsiella pneumoniae* dupa 48 de h de la aplicarea pansamenului 10AgHApColl (D).

Director General INCD FM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu

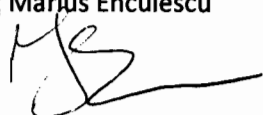
13

TABELE:

Tabelul 1. Antibiograma tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiotic	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Trimethoprim/Sulphametoxazol	rezistent	rezistent
Chloramphenicol	sensibil	sensibil
Doxiciclina	sensibil	sensibil
Ciprofloxacin	rezistent	sensibil
Levofloxacin	sensibil	sensibil
Rifampicina	sensibil	sensibil
Gentamicina	sensibil	sensibil
Eritromicina	rezistent	rezistent
Clindamicina	rezistent	sensibil
Cefoxitin	rezistent	sensibil
Tetraciclina	rezistent	rezistent

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Enculescu



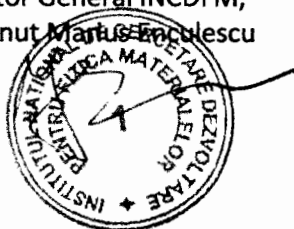
DESCRIEREA INVENȚIEI**Biopansament pe baza de Hidroxiapatita dopata cu Argint in matrice de Colagen**

Prezenta invenție se referă la obținerea printr-o metodă simplă și cu costuri mici a unui pansament pe bază de hidroxiapatită dopată cu argint într-o matrice de colagen pentru aplicații biomedicale. Unul dintre riscurile majore asociate intervențiilor chirurgicale ortopedice și dentare este reprezentat de apariția infecțiilor postoperatorii [1-3]. În acest context, găsirea unui nou biomaterial cu proprietăți antimicrobiene îmbunătățite are un aspect important. Unul dintre biomaterialele des utilizate în domeniul biomedical este hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [4]. HAp a atras atenția cercetătorilor din întreaga lume, datorită faptului că este principalul component anorganic al țesutului osos și este utilizat în diverse aplicații, cum sunt implanturile, reconstrucția osoasă, transportor de medicamente, etc. [1, 5].

Mai mult, studii recente raportate în literatura de specialitate au arătat că HAp posedă proprietăți biologice deosebite cum ar fi biocompatibilitate, bioactivitate, non-toxicitate, osteoinductivitate, etc. [4]. Pe de altă parte, hidroxiapatita prezintă o structură unică care permite substituția cu diverși ioni metalici, cum ar fi: Ag, Zn, Cu, Eu, etc, elemente ce sunt de interes pentru aplicații medicale [1, 6].

Acest tip de substituții sunt, de asemenea, utile pentru îmbunătățirea proprietăților biologice (antimicrobiene) precum și a proprietăților fizico-chimice a HAp [7]. Printre tulpinile cele mai des implicate în infecțiile postoperatorii se numără *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, tulpini care în general devin rezistente la tratamentul cu antibiotice [1, 3]. Așadar, este de preferat utilizarea argintului ca agent antimicrobian în locul antibioticelor, deoarece în general tulpinile bacteriene nu dezvoltă rezistență în acest caz [1, 3]. Pe de altă parte, principală componentă organică a țesutului osos este colagenul (tip I), un polimer natural, cu proprietăți biologice deosebite [8]. Datorită proprietăților sale, colagenul a fost folosit în cosmetica, farmacologie și în aplicații medicale [9-10].

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Mariuș Enculescu



Compozitele de tip colagen/hidroxiapatita pot fi obtinute prin diferite metode, inclusiv prin liofilizare, separare de faza indusa termic, etc. [11-18].

Metoda cea mai utilizata este liofilizarea fibrelor de colagen impreuna cu pulberea de HAp [1, 19-20]. Pe de alta parte obtinerea de pansamente pe baza de nanoparticule bioceramice (hidroxiapatita dopata cu argint) inglobate intr-o matrice de colagen este de interes pentru domeniul biomedical in special pentru tratarea infectiilor postoperatorii [1].

Scopul inventiei a fost de a realiza pansamente pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint inglobata intr-o matrice de colagen eficiente in tratarea infectiilor cutanate.

Problema pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unor pansamente cu eficienta ridicata in tratamentul plagilor suprainfectate la costuri reduse ce ar putea fi utilizate pe scara larga.

Procedeul de obtinere al biopansamentului pe baza de Hidroxiapatita dopata cu Argint in matrice de Colagen este caracterizat prin aceea ca se desfasoara in doua etape. :

-In prima etapa este definita de obtinerea gelurilor de hidroxiapatita dopata cu argint ($Ca_{10-x}Ag_x(PO_4)_6(OH)_2$, cu concentratii $x_{Ag} = 0.1 ; 0.2$). Ordinea de desfasurare este urmatoarea : 1-Se porneste de la urmatorii precursori : nitratul de calciu- calitate comerciala (Aldrich, USA), fosfatul acid de diamoniu-calitate comerciala (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) si nitratul de argint-calitate comerciala. (Alpha Aesare, Germany). 2.- Cantitati potrivite de diamoniu hidrogen fosfat (astfel incat raportul Ca/P=1.67) si nitrat de argint, sunt dizolvate in etanol (calitate p.a) in conditii de laborator si la temperatura camerei. iar solutia astfel obtinuta este agitata puternic timp de 24 h la 40°C. 3.- Separat, o cantitate stoichiometrica de nitrat de calciu este dizolvata in etanol (p.a) la temperatura camerei si apoi este agitata puternic timp de 24 h la 40°C. 4.- Amestecul rezultat din solutiile obtinute la punctele 2 si 3 conduce la obtinerea unui gel care se supune unui proces de imbatranire la temperatura camerei, in conditii de laborator timp de 72h [21].

- In cea de-a doua etapa care este caracterizata de obtinerea biopansamentului, exista urmatoarea ordine de desfasurare :1- Gelul de hidroxiapatita rezultat in prima etapa dupa procesul final de imbatranire la temperatura camerei timp de 72h este dispersat in gel de

Director General INCDFM,
Dr. Ionut Marius Ene



176

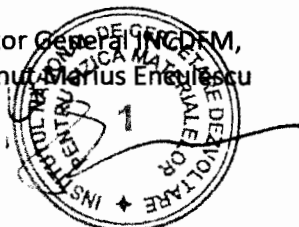
colagen pana la omogenizare. 2.- Dupa omogenizare gelul a fost transferat intr-o matrita termorezistenta si racit sub temperatura de 0 °C timp de 24 de ore. 3.- Tratamentul la temperatura scazuta este urmat de un tratament termic la temperatura 40 ± 5 °C in conditii de laborator. 4.- Dimensiunile finale ale produsului rezultat sunt ; (100mm×100mm×25 mm). 5- Caracteristicile produsului rezultat la cele doua concentratii (10AgHApColl ($x_{Ag} = 0.1$) si 20AgHApColl ($x_{Ag} = 0.2$)) este apoi sterilizat si stocat in conditii sterile.

Morfologia pansamentelor pe baza de nanoparticule bioceramice inglobate intr-o matrice de colagen a fost studiata cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj. Micrografiile MEB obtinute pe pansamentele 10AgHApColl si 20AgHApColl sunt prezentate in Figura 1 (A-B). Imaginile MEB obtinute pe pansamentele 10AgHApColl si 20AgHApColl pun in evidenta atat prezenta pulberii de hidroxiapatita dopata cu argint cat si a fibrelor de colagen. De asemenea, se poate observa ca fibrele de colagen sunt inglobate in pulberea de hidroxiapatita dopata cu argint. Tot in Figura 1 (C) este prezentat spectrul EDAX obtinut pe pansamentul 20AgHApColl. Spectrul EDAX evidentiaza prezenta C, Ca, N, P, O si Ag, elementele constituinte ale pansamentului 20AgHApColl. Prezenta Au in spectrul EDAX se datoreaza acoperirii cu aur a suprafetei pansamentului inainte de studiile MEB si EDAX.

Avand in vedere rezistenta crescuta a microbilor fata de terapiile existente la ora actuala s-a dorit dezvoltarea unor noi agenti antimicrobieni eficienti, dar care sa nu prezinte efectele adverse ale terapiilor clasice. S-a incercat dezvoltarea unor biomateriale compozite pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint intr-o matrice de colagen. Pansamentul astfel obtinut a fost testat pentru a-i putea evalua efectul antimicrobian impotriva tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae*. In Figura 2 este prezentata evaluarea *in vitro* a proprietatilor antimicrobiene a pansamentelor pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen asupra celor doua tulpini bacteriene studiate. Rezultatele au evidentiat proprietatile antimicrobiene ale pansamentelor utilizate asupra celor doua tulpini de bacterii gram negative utilizate.

Pentru experimentele *in vivo* a fost necesara realizarea unor plagi in regiunea dorsala a șobolanilor albi de sex feminin din rasa Wistar. Aceste plagi au fost contaminate

Director General NGDFM,
Dr. Ionuț Claudiu Enăscu



108

cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae* (Figura 3). Tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae* au fost obținute din plagile postoperatorii infectate ale pacienților din cadrul Spitalului Clinic de Urgenta Bucuresti. In Tabelul 1 sunt prezentate rezultatele antibiogrammei tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae*. Testarea la antibiotice a fost facuta si interpretata conform ghidului CLSI varianta din 2016. Pentru inocularea sobolanilor s-au folosit doua tipuri de tulpini microbiene. Cele doua tulpini folosite în acest studiu sunt considerate ca fiind reprezentative pentru infectiile nozocomiale. Bacteriile prelevate au fost cultivate pe mediile geloza sange, CLED si mediu cromogen (CHROMagar Orientation) si au fost incubate la 37 °C timp de 24 de ore. Identificarea a fost facuta cu teste biochimice clasice si pe aparatul Microscan (producator Siemens) de identificare si testare la antibiotice. Pentru testarea la antibiotice fost utilizat mediul Mueller Hinton si metoda de testare a antibioticelor Kirby–Bauer, iar interpretarea a fost facuta folosind ghidul CLSI Ed. 2016.

Infectiile de plaga reprezinta o patologie des intalnita in spitalele din Romania. Acestea sunt cauzate de agenti microbieni ce prezinta rezistenta mare fata de terapiile existente la ora actuala pe piata. Infectiile de plaga reprezinta complicatii redutabile, ele crescand atat morbiditatea cat si mortalitatea in randul pacienților care prezinta aceste complicatii, fapt ce duce la cresterea cheltuielilor de spitalizare si la scaderea calitatii vietii pacienților. Hidroxiapatita dopata cu argint elibereaza in mod continuu argintul din pansament astfel incat concentrația ionilor de argint este menținută timp de cateva zile la nivelul plagii.

Studiul *in vivo* al efectului pansamentelor pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen a fost realizat la diferite intervale de timp (24 si 48 h) după ce plagile produse in regiunea cervicala a sobolanilor Wistar au fost infectate cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae*. Plaga infectata a fost pansata la 24 de ore si respectiv 48 ore. La fiecare analiza au fost prelevate probe, respectand conditiile de asepsie. In Figurile 4 si 5 sunt prezentate plagile infectate cu tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* si *Klebsiella pneumoniae* tratate cu pansamentele pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint in matrice de colagen dupa 24 si 48 h de tratament.

Director General INCDFM,
Dr. Ionut Marius Enculescu

4



174

În urma acestor experimente, au supraviețuit toate animalele de laborator carora le-au fost aplicate pansamente cu hidroxiapatita dopată cu argint în matrice de colagen. De asemenea, pe întreaga durată a desfășurării experimentului, șobolanii nu au prezentat efecte secundare cum ar fi letargie, vărsături sau diaree. Prin aceste studii s-a demonstrat că incorporarea ionilor de Ag în structura hidroxiapatitei îmbunătățește proprietățile chimice și biologice ale acesteia.

Prin incorporarea ionilor de argint în structura hidroxiapatitei prin substituția ionilor de Ca^{2+} se obține un nou material ce combină proprietățile biologice ale hidroxiapatitei cu cele antimicrobiene ale argintului fără efecte secundare ce ar putea apărea din cauza excesului de argint. Pe de altă parte, ionii de argint legați în rețeaua hidroxiapatitei devin mult mai stabili iar efectul antimicrobian se observă pe intervale mai lungi de timp ca urmare a eliberării constante în timp.

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Mihai Șenculescu

5



BIBLIOGRAFIE

1. D. Predoi, S. L. Iconaru, M. Albu, C. C. Petre, G. Jiga, *Polym. Eng. Sci.* 57(6):537-545 (2017).
2. J.F. Agassant, A. Fortin, and Y. Demay, *Polym. Eng. Sci.*, **34**,110 (1994).
3. M. Sygnatowicz, K. Keyshar, and A. Tiwari, *JOM - J. Min. Met. Mat. S.* , **62**, 65 (2010).
4. A. Ewald, D. Hösel, S. Patel, L.M. Grover, J.E. Barralet, and U. Gbureck, *Acta Biomater.* ,7(11), 4064 (2011).
5. S.V. Dorozhkin, *J. Funct. Biomater.* , **6**, 708 (2015).
6. D. Gopia, N. Bhuvaneshwari, L. Kavitha, and S. Ramya, *Ceram. Int.* , **41**, 3116 (2015).
7. M. Supova, *Ceram. Int.* , **41**, 9203 (2015). 18.
8. T.N. Kim, Q.L. Feng, J.O. Kim, J. Wu, H. Wang, G.C. Chen, and F.Z. Cui, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* , **9**, 129 (1998).
9. Md. Shariful Islam, and T. Mitsugu, *Mater. Lett.* , **173**, 231 (2016).
10. H. W. Kim, H. E. Kim and V. Salih, *Biomaterials*, **26**, 5221 (2005).
11. D.I. Zeugolis, S.T. Khew, E.S.Y. Yew, A.K. Ekaputra, Y.W. Tong, L.Y.L. Yung, D.W. Hutmacher, C. Sheppard, and M. Raghunath, *Biomaterials.* , **29**, 2293 (2008).
12. S.C. Rodrigues, C.L. Salgado, A. Sahu, M.P. Garcia, M.H. Fernandes, and F.J. Monteiro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **101A**, 1080 (2013).

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Mihail Căciulescu



13. M.S. Chapekar, *J. Biomed. Mater. Res.*, **53**, 617 (2000).
14. A.G.A. Coombes, E. Verderio, B. Shaw, X. Li, M. Griffin, and S. Downes, *Biomaterials.*, **23**, 2113 (2002).
15. Q.P. Hou, D.W. Grijpma, and J. Feijen, *Biomaterials.*, **24**, 1937 (2003).
16. D.W. Hutmacher, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **12**, 107 (2001).
17. E. Piskin, N. Bolgen, S. Egri, and I. Isoglu, *Nanomedicine.*, **2**, 441 (2007).
18. A. Senkoylu, E. Ural, K. Kesenci, A. Simsek, S. Ruacan, L. Fambri, C. Migliaresi, and E. Piskin, *Int. J. Artif. Organs.*, **25**, 1174 (2002).
19. K. Tuzlakoglu, N. Bolgen, A.J. Salgado, M.E. Gomes, E. Piskin, and R.L. Reis, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **16**, 1099 (2005).
20. G.M. Cunniffe, G.R. Dickson, S. Partap, K.T. Stanton, and F.J. O'Brien, *J. Mater. Sci. – Mater. Med.*, **21**, 2293 (2010).
21. S. L. Iconaru, P. Chapon, P. Le Coustumer, D. Predoi, *Scientific World Journal*. 2014; 2014: 165351.

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marius Iordănescu

7



REVENDICĂRI

1. *Procedeu de obtinere al biopansamentului pe baza de Hidroxiapatita dopata cu Argint in matrice de Colagen caracterizat prin aceea ca se desfasoara in doua etape. si anume - In prima etapa caracterizata de obtinerea gelurilor de hidroxiapatita dopata cu argint ($Ca_{10-x}Ag_x(PO_4)_6(OH)_2$, cu concentratii $x_{Ag} = 0.1$; 0.2. exista urmatoare ordine de desfasurare a proceselor : 1-Se porneste de la precursori, care sunt : nitratul de calciu-calitate comerciala, fosfatul acid de diamoniu-calitate comerciala si nitratul de argint-calitate comerciala., 2.- Cantitati potrivite de diamoniu hidrogen fosfat (astfel incat raportul Ca/P=1.67) si nitrati de argint sunt dizolvate in etanol (calitate p.a) in conditii de laborator si la temperatura camerei. iar solutia astfel obtinuta este agitata puternic timp de 24 h la 40°C. 3.- Separat, o cantitate stoichiometrica de nitrati de calciu este dizolvata in etanol (p.a) la temperatura camerei si apoi este agitata puternic timp de 24 h la 40°C. 4.- Amestecul rezultat din solutiile obtinute la punctele 2 si 3 conduce la obtinerea unui gel care se supune unui proces de imbatranire la temperatura camerei, in conditii de laborator timp de 72h ; - In cea de-a doua etapa care este caracterizata de obtinerea biopansamentului, exista urmatoarea ordine de desfasurare : 1- Gelul de hidroxiapatita rezultat in prima etapa dupa procesul final de imbatranire la temperatura camerei timp de 72h este dispersat in gel de colagen pana la omogenizare. 2.- Dupa omogenizare gelul a fost transferat intr-o matrila termorezistenta si racit sub temperatura de 0°C timp de 24 de ore. 3.- Tratamentul la temperatura scazuta este urmat de un tratament termic la temperatura 40 ± 5 °C in conditii de laborator. 4.- Dimensiunile finale ale produsului rezultat sunt ; (100mm×100mm×25 mm). 5- Caracteristicile produsului rezultat la cele doua concentratii (10AgHApColl ($x_{Ag} = 0.1$) si 20AgHApColl ($x_{Ag} = 0.2$)) este apoi sterilizat si stocat in conditii sterile.*

Director General INCDFM,
Dr. Ionuț Marin Enculescu





OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI



romania2019.eu

Președinția României la Consiliul Uniunii Europene

Serviciul Examinare de Fond: Chimie Farmacie

Cont IBAN: RO05 TREZ 7032 0F33 5000 XXXX
Trezoreria Sector 3, București
Cod fiscal: 4266081

RAPORT DE DOCUMENTARE

CBI nr. a 2017 00769	Data de depozit: 28/09/2017	Data de prioritate
----------------------	-----------------------------	--------------------

Titlul invenției	BIOPANSAMENT PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ DOPATĂ CU ARGINT ÎN MATRICE DE COLAGEN
------------------	---

Solicitant	INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU FIZICA MATERIALELOR, STR. ATOMIȘTILOR NR. 405A,, MĂGURELE, RO
------------	--

Clasificarea cererii (Int.Cl.)	A61L 15/18 [2006.01]; A61L 15/32 [2006.01]
--------------------------------	--

Domenii tehnice cercetate (Int.Cl.)	A61L
-------------------------------------	------

Colecții de documente de brevet cercetate	RoPatentSearch Epoquenet (Epodoc, NPL)
Baze de date electronice cercetate	
Literatură non-brevet cercetată	Google

Documente considerate a fi relevante

Categoria	Date de identificare a documentelor citate și, unde este cazul, indicarea pasajelor relevante	Relevant față de revendicarea nr.
A	RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ <i>Etapa 3 Studii complexe privind tratamentul plăgilor cutanate utilizând biomateriale</i> (29.11.2016) Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru Fizica Materialelor RA și colab., întreg documentul	1
A	CN106540331 (A) (04.11.2016) Wang Shufang întreg documentul	1

Strada Ion Ghica nr. 5, Sector 3, Cod 030044 București, România

Telefon centrală: +40 21 316 08 00 / 021 312 82 29

Fax: +40 21 312 58 19

E-mail: office@osim.ro

www.osim.ro



Documente considerate a fi relevante - continuare		
Categoria	Date de identificare a documentelor și, unde este cazul, indicarea pasajelor relevante	Relevant față de revendicarea nr.
Unitatea invenției (art.18)		
Observații:		

Data redactării: 28.01.2019

Examinator,
EREMIA LAURA



Litere sau semne, conform ST.14, asociate categoriilor de documente citate	
<p>A - Document care definește stadiul general al tehnicii și care nu este considerat de relevanță particulară;</p> <p>D - Document menționat deja în descrierea cererii de brevet de invenție pentru care este efectuată cercetarea documentară;</p> <p>E - Document de brevet de invenție având o dată de depozit sau de prioritate anterioară datei de depozit a cererii în curs de documentare, dar care a fost publicat la sau după data de depozit a acestei cereri, document al cărui conținut ar constitui un stadiu al tehnicii relevant;</p> <p>L - Document care poate pune în discuție data priorității/lor invocată/e sau care este citat pentru stabilirea datei de publicare a altui document citat sau pentru un motiv special (se va indica motivul);</p> <p>O - Document care se referă la o dezvoltare orală, utilizare, expunere, etc,</p>	<p>P - Document publicat la o dată aflată între data de depozit a cererii și data de prioritate invocată;</p> <p>T - Document publicat ulterior datei de depozit sau datei de prioritate a cererii și care nu este în contradicție cu aceasta, citat pentru mai bună înțelegere a principiului sau teoriei care fundamentează invenția;</p> <p>X - document de relevanță particulară; invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau nu poate fi considerată ca implicând o activitate inventivă. când documentul este luat în considerare singur;</p> <p>Y - document de relevanță particulară; invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând o activitate inventivă când documentul este combinat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași categorie, o astfel de combinație fiind evidentă unei persoane de specialitate;</p> <p>& - document care face parte din aceeași familie de brevete de invenție.</p>