



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 00759**

(22) Data de depozit: **28/09/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2019 BOPI nr. **12/2019**

(71) Solicitant:
• **CONCORDIA DENT S.R.L.**,
ȘOS.OLTENIȚEI NR.257N, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI,
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CRISTACHE CORINA MARILENA**,
ȘOS.OLTENIȚEI, NR. 257N, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **TOTU EUGENIA, STR.MĂGURICEA,
NR. 20, BL.7P, AP.13, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIDILESCU ANDREEA CRISTIANA,**
STR.IOVIȚA, NR.2, BL.P24, AP.32,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BUGA ROXANA-MĂDĂLINA,**
STR.CÂRCIUMĂRESELOR NR.1,
SAT ROȘU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO;
• **CRISTACHE GHEORGHE,**
ȘOS.OLTENIȚEI 257N, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **TRATAMENT TOPIC AL LEZIUNILOR PARODONTALE
BAZAT PE ASOCIEREA MELATONINĂ-ACID
HIALURONIC-TETRACICLINĂ ȘI METRONIDAZOL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un material sub formă de pastă biocompatibilă utilizată în tratamentul topic al parodontitei marginale cronice lent progresive. Materialul, conform invenției, este constituit în părți în greutate din 3 părți tetraciclină, 3 părți metronidazol, 0,18 părți melatonină, 3 părți acid hialuronic cu masa moleculară medie de 300 kDa și restul până la 100 părți vaselină

albă, fiind sub formă de matrice complexă în care principiile active au o acțiune sinergică în mediu biologic.

Revendicări: 4
Figuri: 11



DESCRIEREA INVENȚIEI

TRATAMENT TOPIC AL LEZIUNILOR PARODONTALE BAZAT PE ASOCIEREA MELATONINA - ACID HIALURONIC – TETRACICLINĂ ȘI METRONIDAZOL

Autori: Corina Marilena Cristache, Eugenia Totu, Andreea Cristiana Didilescu, Roxana Madalina Buga, Gheorghe Cristache

Boala parodontală reprezintă o afecțiune cu etiologie complexă, microbiană, la care contribuie o serie de factori predispozanți generali de origine exogenă și factori funcționali, cu evoluție lentă sau agresivă, care, morfologic, se caracterizează prin distrugerea elementelor de suport dentoparodontal, apariția pungilor parodontale și mobilității dentare [1]. Boala parodontală prezintă semne distructive ale gingiei și ale suportului dentoparodontal, care se dezvoltă prin procese inflamatorii, induse de biofilmul microbial, principiu enunțat de către Loe și colab. [2]. Inflamația nu se limitează doar la țesuturile parodontale, bacteriile și mediatorii inflamatori pot să pătrundă în circuitul sangvin și să disemineze sistemic, având un impact semnificativ asupra stării generale de sănătate [3].

Conform raportului Organizației Mondiale a Sănătății (WHO Fact Sheet N°318, April 2012), parodontopatia severă, se întâlnește la 15–20% din adulții de vârstă mijlocie.

Boala parodontală reprezintă cauza principală a pierderii dinților la nivel global, persoanele afectate prezentând crescut risc de pierdere a unui număr mare de unități masticatorii, cu instalarea edentațiilor întinse/totale, disfuncțiilor masticatorii, cu afectarea nutriției și a calității vieții în general, având un uriaș impact economic [4].

Tratamentul bolii parodontale este unul complex și se adresează: (1) reducerii condițiilor de dezvoltare și de virulență a complexului bacterian din placa bacteriană și punga parodontală, fiind local și general antimicrobial, prin antiseptice, antibiotice și igienizare, (2) susținerii apărării organismului constând în administrarea unei medicații trofice și a diferite medicamente cu efect imunomodulator și, nu în ultimul rând, (3) tratamentul afecțiunilor sistemice care influențează răspunsul imun, situație în care se apelează la consultul interdisciplinar și la colaborarea cu medicii de specialitate [5].

Tratamentul modern al parodontopatiei începe cu îndepărtarea biofilmului bacterian prin detartraj și planarea radiculară/surfasajul radicular (*scaling and root planning* - SRP), urmată de o terapie adjuvantă medicamentoasă care țintește controlului infecției și inflamației. Tratamentul medicamentos al parodontopatiei, administrat local și/sau sistemic, utilizează fie factori antiinfecțioși, fie agenți imunomodulatori care să întărească răspunsul imun al gazdei. Tratamentului topic este recomandat ca primă opțiune terapeutică [5], în fața celui sistemic.

Pasta TM, contribuție a Școlii moderne de Parodontologie din București [6] are următoarea compoziție: Tetracilină (3g), Metronidazol (3g) mixate cu vaselină albă (100g). Pasta TM reprezintă un tratament antimicrobial topic aplicat cu rezultate bune, cunoscut fiind faptul că Tetracilinele sunt considerate preparate ce manifestă efecte modulatorie asupra gazdei, adică realizează inhibiția activității colagenazei în țesutul gingival al pacienților cu parodontită cronică [7]. Metronidazolul este indicat în parodontita generalizată cu detecție pozitivă pentru *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*. Aplicarea locală a Tetracilinei sub formă de fibre, la pacienți parodontopatie cronică cu adâncime la sondare



(PD) > 5 a arătat o reducere semnificativă a pungilor parodontale cu 0.7 mm, comparativ cu grupul control (numai SRP) [8]. Un rezultat mult mai slab a fost obținut cu aplicarea topică a Metronidazolului și Clorhexidinei (<0.4 mm) [9].

Contribuția originală în cadrul acestei aplicații pentru brevet o constituie adaugarea de Melatonină 0.18g și Acid Hialuronic 3g în compoziția pastei TM.

Melatonina, hormon endogen sintetizat în principal în glanda pineală dar și în alte țesuturi (retină, măduva osoasă, tract gastro-intestinal, piele, etc.) pornind de la Tryptofan, într-un ritm circadian, are multiple roluri la nivelul cavității orale. Aceste roluri sunt în special bazate pe efectul antioxidant, antiinflamator și acțiunii sale de mediator în neoformația osoasă. Mecanismul de acțiune al melatoninei asupra osului alveolar constă în stimularea diferențierii osteoblastelor și mineralizarea matricei osoase nou formate și prin inhibarea activității osteoclastelor (responsabile de liza osoasă) prin creșterea osteoprotegerinei (OPG) și prin acțiunea asupra NF-κB ligand (RANKL) [10]. Mai mult, Montero și colaboratori au arătat că aplicarea topică a melatoniei (gel 1%) pe o perioadă de 20 zile la pacienți diabetici a determinat o îmbunătățire semnificativă a indexului gingival și o reducere a adâncimii pungilor parodontale statistic semnificativă, comparativ cu placebo. De asemenea s-a observat reducere statistic semnificativă a concentrației interleukinelor IL-1β și IL-6 și a prostaglandinei E2 în lichidul crevicular, evidențiind astfel efectul antiinflamator al melatoninei aplicate topic [11]. În plus, este cunoscut faptul că utilizarea melatoninei pe perioadă îndelungată produce efecte adverse minore (inducerea stării de somnolență), în administrare sistemică [12]. Cavalcante și colaboratori, într-un studiu clinic randomizat, au arătat reducerea stresului oxidativ la pacienți cu obstrucție pulmonară cronică după administrarea pe o perioadă de 3 luni a 3mg melatonină pe zi, cu eliberare rapidă, fără efecte adverse înregistrate [13].

Acidul hialuronic, un glicozaminoglican produs în principal de celulele mezenchimale însă și de alte tipuri de celule [14], se găsește în cantități mari în corpul uman, fiind parte componentă a matricei extracelulare [15]. Este un biomaterial cu proprietăți atractive datorită participării în structura și funcționalitatea celulelor, intră în componența țesutului conjunctiv, epitelial, nervos. Prin proprietățile sale vâsco-elastice și prin marea capacitate de hidratare, acidul hialuronic joacă un rol important în controlul hidratării tisulare [16,17], și stimulează vindecarea tisulară. În plus, Sakay și colaboratori au raportat rolul acidului hialuronic extracelular în medierea activității antifungice (anti Candida) a celulelor epiteliale [18], această caracteristică fiind de mare interes pentru patologia cavității orale. Acidul hialuronic poate fi utilizat, după liofilizare sau esterificare într-o varietate de structuri sau configurații cum ar fi bureți sau membrane, cu rată variabilă de biodegradare pentru obținerea materialelor de regenerare osoasă utilizate în parodontologie [19]. Efectul bacteriostatic (în special pe *S. aureus* și *A. actinomycetemcomitans*) a ambelor forme de acid hialuronic (cu greutate moleculară mică și mare [19] cât și efectul fungistatic (pentru *C. albicans*) [36] a formei cu greutate moleculară mare, face din acidul hialuronic un produs atractiv pentru utilizarea topică în cazul tratamentului parodontitei marginale cronice. În plus studiile de toxicitate au arătat lipsa efectelor adverse ale acidului hialuronic în administrare locală (topică sau injectabilă) ori sistemică [20]. Forma pentru administrare topică disponibilă comercial este Gengigel® (Ricerfarma, Milano, Italia) și conține 0.2% hyaluronon gel (acid hialuronic cu greutate moleculară mare).

Deși, fiecare dintre cele două componente au fost utilizate separat, până acum, nu sunt studii asupra matricilor complexe în care melatonina și acidul hialuronic să se afle în amestec. Prin urmare, propunerea acestei aplicații de brevet de a folosi melatonina și



acidul hialuronic în amestec complex (împreună cu tetraciclina și metronidazol) este prima de acest fel în medicina dentară.

În contextul structurilor specifice ale fiecărei componente considerate pentru noul material de tratament, trebuie evidențiată menținerea activității specifice a fiecărei componente și acțiunea sinergică a acestora.

Metode de investigație aplicate

Pentru urmărirea individualității fiecărui component al materialului de tratament propus, s-au folosit ca metode de investigare metode spectrofotomerice de analiză, și anume: analiza FT-IR, analiza spectrofotometrică UV-Vis și derivata (I) a spectrofotometriei UV-Vis.

S-au efectuat analize FT-IR pentru fiecare componentă a materialului de tratament, urmând apoi combinații între acestea pentru a observa dacă cumva vreuna dintre componente se influențează reciproc. În final, s-a urmărit și spectrul FT-IR pentru toate componentele prezente în amestecul de tratament.

Analiza în UV-Vis a permis realizarea curbelor de calibrare specifice ca urmare a înregistrării spectrelor de absorbție. În cazul în care maximele de absorbție a componentelor, de exemplu, melatonină și acid hialuronic, se suprapun sau se află la distanță foarte mică astfel încât nu pot fi decelate cu precizie, s-a aplicat prima derivată a curbelor spectrofotometrice UV-Vis. În situația nici derivate întâi nu poate face diferențierea clară între maximele prezente, s-a aplicat și derivata a doua a curbei spectrofotometrice [21,22].

În aplicarea primei și celei de a doua derivate a spectrelor UV-Vis am folosit aparatul matematic bazat pe faptul că, absorbanța, A , exprimată în funcție de lungimea de undă, λ , se poate exprima prin:

Ordin zero de derivare:
$$A = f(\lambda) \quad (1)$$

Prima derivată:
$$\frac{dA}{d\lambda} = f'(\lambda) \quad (2)$$

A doua derivată:
$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = f''(\lambda) \quad (3)$$

Derivata de ordin unu reprezintă viteza de modificare a absorbanței față de lungimea de undă. O derivată de ordin unu începe și se termină la zero. De asemenea, ea trece prin zero la aceeași lungime de undă λ_{\max} a benzii de absorbție. Față de aceste puncte se pot înregistra variații pozitive sau negative având maxime sau minime la aceeași lungimi de undă cu punctele de inflexiune din benzile de absorbție. Acest funcție bipolară este caracteristică pentru toate derivatele de ordin impar [23]. Cea mai importantă caracteristică a derivatei de ordin doi este banda negativă cu minim la aceeași lungime de undă cu maximum benzii de ordin zero. De asemenea, apar în plus două benzi satelit pozitive de fiecare parte a benzii principale.

O bandă puternică negativă sau pozitivă cu minimul sau maximum la aceeași lungime de undă cu λ_{\max} a benzii de absorbție este caracteristică derivatelor de ordin par [24].

Dacă presupunem că spectrul de ordin zero respectă legea Lambert-Beer-Bouguer, atunci va exista o relație de liniaritate între concentrație și absorbanță (amplitudine) pentru derivatele de toate ordinele.

Pentru ordin zero:
$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$



Pentru derivate de ordin întâi:
$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \cdot l \cdot c \quad (5)$$

Pentru derivata de ordin doi:
$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2} \cdot l \cdot c \quad (6)$$

unde: λ - lungimea de undă, A – absorbanța, ε - absorbitivitatea molară medie, l – lungimea drumului optic parcurs, c – concentrația molară a probei.

În cazul sistemelor multicomponent, în care componente nu interacționează între ele, se aplică legea aditivității absorbanțelor astfel:

$$A_{am} = \sum_{n=1}^m \varepsilon_n \cdot l \cdot c_n = l \cdot \sum_{n=1}^m \varepsilon_n \cdot c_n \quad (7)$$

Pentru un amestec cu m componente independente între ele, derivata de ordin r a spectrului va fi dată de suma derivatelor de ordin r a spectrelor individuale:

$$\frac{d^r A}{d\lambda^r} = \sum_{n=1}^m \frac{d^r A_n}{d\lambda^r} \quad (8)$$

Spectrofotometria derivată oferă o creștere în sensibilitatea și selectivitatea metodei comparativ cu spectrofotometria clasică [25]. **Această metodă de investigație a fost aplicată și pentru amestecul complex conținând melatonină, acid hialuronic, tetraciclină și metronidazol.**

Studiul posibilelor interacții între melatonina și acid hialuronic prezente simultan într-o matrice compozită complexă.

Materiale și procedură

Melatonina, acidul hialuronic, tetraciclina și metronidazolul au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (Germania), iar solventul utilizat, alcoolul etilic de la Merck (Germania). Toate materialele au fost de înaltă puritate. Apa deionizată a fost purificată prin sistemul Milli-Q (Sartorius GMBH Gottingen, Germania). S-a folosit baie ultrasonică pentru amestecuri și triturare în moară (Retsch-PM 100) pentru omogenizarea probelor solide.

Chimicalele utilizate au fost folosite în stare pură. Pentru acidul hialuronic s-au folosit două seturi de soluții având concentrații între 1 - 4 mg/mL și între 30 – 90 μ g/mL pentru trasarea curbilor de calibrare. Soluțiile au fost realizate în apă deionizată (conductivitate de 128 μ S/cm²), iar după preparare soluțiile au fost menținute la întuneric și maxim 8°C. Probele de melatonină au fost obținute în alcool metilic, realizându-se un stoc de soluție de concentrație 3mg/mL. Curbele de calibrare pentru melatonină au fost de asemenea realizate pentru soluții cu concentrații între 30 – 90 μ g/mL. Amestecul acid hialuronic – melatonină s-a preparat dizolvând inițial melatonina și apoi adăugând acidul hialuronic. Pentru omogenizare amestecul a fost menținut 20 min în baie ultrasonică termostată (40°C).

Pentru efectuarea studiilor de analiză în UV-Vis, s-a utilizat un spectrofotometru Varian Cary 50 UV-Vis, având următoarele caracteristici: dublu fascicol, lungimea de undă baleiată, $\lambda \in$ (200 – 800 nm), la o rezoluție de 1 nm, lățimea fantelor 1 nm, viteză de scanare 400 nm/s. Pentru determinări s-au folosit cuve de cuarț având grosimea de 1 cm. Temperatura de lucru a fost 25°C. Spectrul a fost înregistrat pentru $\lambda \in$ (200 – 450 nm).

Spectroscopia IR cu Transformata Fourier (FTIR) permite detectarea componentelor unor amestecuri complexe de compuși cu activitate biologică. Astfel, probele pot fi diferențiate prin identificarea compozițiilor chimice ale moleculelor sau macromoleculelor din probele biologice complexe sub observație [26]. Pentru efectuarea determinărilor FT-IR nu a mai fost necesară pregătirea/pastilarea lor în KCl datorită utilizării echipamentului cu sferă (diamant)



de atenuare a reflexiei (ATR). Determinările FT-IR pentru probele solide au fost realizate pe un echipament Brucker Tensor 27 (ATR) pe un domeniu spectral între 4000-500 cm^{-1} . Rezoluția spectrală a fost de 4 cm^{-1} . La fiecare scanare s-a efectuat spectrul background. Spectrele înregistrate au urmărit absorbanta în funcție de numărul de undă (cm^{-1}) permițând identificarea principalelor benzi de absorbție. Datele obținute au fost prelucrate cu ajutorul softului OPUS NT 7.0 (Brucker Optics, Germany).

Cantitățile luate spre analiză în amestecul substanțelor solide considerate pentru realizarea materailului de tratament, au fost: melatonină (MEL) – 3 mg, acid hialuronic (HA) – 100 mg, tetraciclina (T) – 3 mg, metronidazol (MZ) - 3 mg. Cantitățile au fost considerate normalizate la 109 mg amestec total. Se intenționează folosirea acidului hialuronic ca și vehicul pentru celelate componente active (MEL, T, MZ).

Motivare calcul cantități substanțe

Pasta magistrală, TM, utilizată în mod curent în practica stomatologică de tratare a plăgilor parodontale a fost considerată ca și referință, având compoziția: 125 mL vaselina alba, 3 g tetraciclina și 3 g metronidazol. Densitatea vaselinei albe folosită ca vehicul este de 0,8 $\text{g}/\text{cm}^3 = 0,8 \text{ g}/\text{mL}$. Astfel, dacă densitatea = masa/volum, vom avea: $0,8 \text{ g}/\text{mL} = \text{masa} / 125 \text{ mL}$ și prin urmare: masa vaselinei va fi de 100 g. Dacă la 100 g vaselină se folosesc 3 g tetraciclina, atunci la 100 mg (cât se consideră masa vehicolului acid hialuronic) se vor folosi 3 mg tetraciclina. Similar se aplică raționamentul și pentru metronidazol.

În acord cu datele din literatură/farmacopee, dozajul MEL trebuie să fie cuprins între 3-10 mg/zi, astfel încât cantitatea adăugată de MEL a fost de 3 mg/zi pentru a preîntâmpina orice posibile efecte secundare.

Acidul hialuronic se poate administra între 100 - 300 mg/zi, iar masa sa moleculară poate varia între 2 kDa și 750 kDa. Date din literatură au arătat că admiterea acidului hialuronic de masă moleculară mai redusă prezintă abilități de penetrare îmbunătățite, în timp ce acidul hialuronic de masă moleculară mai mare are acțiune mai eficace asupra regenerării țesuturilor. Astfel, acidul hialuronic folosit are o masă moleculară medie, de 300 kDa, care să prezinte atât avantajul unei pătrunderi mai ușoare în țesut precum și cel al acțiunii de refacere a țesutului.

Rezultate și discuții

Analiza spectrală FT-IR

Cu ajutorul analizei FT-IR au fost studiate atât spectrele individuale ale fiecărei componente cât și pentru matricea complexă obținută.

Melatonina este o substanță având un coeficient ridicat de partiție, log P de 1,2 [27], și se localizează preferențial la interfețele hidrofilice/hidrofobice conducând astfel la dezordonarea fosfolipidelor la nivelul întinderii asimetrice a legăturilor din $-\text{CH}_2$ și a legăturilor de hidrogen realizate între legăturile întinse de carbonil și gruparea PO^2 [28,29].

Spectrul FT-IR al melatoninei – Fig.1, prezintă benzile majore pentru grupările funcționale la 3306 și 3260 cm^{-1} (vibrații de îndoire pentru N-H și întinderea C-N), 1492 și 1550 cm^{-1} (vibrația pentru C= aromatic), 1630 cm^{-1} (vibrația legăturii C=O), 1180 și 1217 cm^{-1} (vibrația legăturii -C-O). Aceste date experimentale sunt în acord cu studii anterioare [30,31].

Spectrul FT-IR prezintă, de asemenea, benzi de absorbție la 1650 și 1550 cm^{-1} , respectiv, reprezentând vibrații pentru cele două grupări amidice I și II, iar la 1750 cm^{-1} apare întinderea legăturii carbonil. La numerele de undă 2870 și 2960 cm^{-1} , apar benzile de vibrație corespunzătoare întinderii simetrice a legăturii CH_3 . Prezența benzilor de absorbție de la 1477, 3217, 1431 cm^{-1} confirmă manifestarea vibrațiilor de întindere pentru legăturile C-N, N-H, C-H, și C-C.

Acidul hialuronic are un spectru FT-IR cu benzi distinctive de absorbție.



Spectrul FT-IR pentru acidul hialuronic, Fig.2, evidențiază numerele de undă la care apar benzile de absorbție caracteristice și care sunt prezentate în Tabelul 1.

Din spectrul FT-IR al acidului hialuronic se evidențiază banda de întindere N-H din gruparea amidică pe regiunea între 3200-3600 cm^{-1} ; mai apare o bandă amidică la 1595-1710 cm^{-1} ce ar putea fi atribuită întinderii C=O și îndoirii N-H. De asemenea, este și o bandă specifică pentru îndoirea C-H în regiunea 1350-1480 cm^{-1} , iar întinderea C-O din ciclul de proteoglican apare între 985-1140 cm^{-1} .

Tabel 1. Principalele benzi de absorbție FT-IR caracteristice pentru acidul hialuronic

| Nr de undă (cm^{-1}) | Grupare funcțională | Tip vibrație |
|---------------------------------|---------------------|----------------------|
| 3422 | O-H | Întindere simetrică |
| | N-H | Întindere amidă |
| 3016 | C-H aromatic | Întindere simetrică |
| 2918 | CH_3 | Întindere asimetrică |
| 1654 | CONH(C=O) | Întindere |
| 1473 | CH_2 | Îndoire |
| 1397 | C=C | Întinere simetrică |
| 1303 | C-O | Îndoire asimetrică |
| 1245 | C-O | Întindere simetrică |
| 1161 | C-O (alcool) | Întindere simetrică |
| 1078 | C-O (alcool) | Întindere asimetrică |
| 962 | C-C-H | Îndoire simetrică |
| 937 | C-C-C | Îndoire asimetrică |

Tetraciclina - Spectrul FT-IR al tetraciclinei, permite urmărirea principalelor grupe funcționale ce o alcătuiesc [32].

În Tabelul 2 sunt prezentate principalele benzi de vibrație ale căror semnale pot fi identificate în spectrul FT-IR al tetraciclinei – Fig. 3. Dintre compușii utilizați, tetraciclina prezintă cel mai bogat spectru FT-IR.

Cei mai mulți compuși aromatici polinucleari, cum este și tetraciclina, prezintă în general 3-4 benzi de absorbție în regiunea 3000-3100 cm^{-1} . Aceasta se datorează vibrațiilor de întindere ale legăturilor C-H ale nucleului aromatic și prezintă intensitate medie către puternică. Astfel, benzile de la 3000 și 3049 cm^{-1} sunt asociate cu vibrațiile C-H ale nucleului fenilic. O serie de deformări în cadrul planului ale legăturii C-H se manifestă în regiunea 1300-1000 cm^{-1} , fiind benzi ascuțite și cu intensitate medie spre slabă. Cum sunt posibile o serie de interacții, este necesară o atenție sporită în interpretarea benzilor de absorbție-vibrație din zona substituenților polari la nucleul benzenic, ceea ce ar putea duce la creșterea intensității acestor benzi. Vibrațiile de întindere ale legăturii C-C din nucleul benzenic apar în regiunea 1625-1530 cm^{-1} , manifestându-se vibrația scheletului benzenic, de intensitate mare, în jur de 1500 cm^{-1} . În spectrul tetraciclinei s-au observat vibrații ale nucleului aromatic la 1452, 1527, 1552, 1618 și 1666 cm^{-1} . Mai mult, la 567 cm^{-1} este prezentă banda de absorbție pentru deformarea în afara planului a inelului aromatic. Grupările metil prezintă două tipuri de vibrații de întindere: contracția sau expansiunea simetrică și contracția sau expansiunea asimetrică pentru legăturile C-H. De asemenea, banda de absorbție de la 1358 cm^{-1} a fost atribuită vibrației de îndoire a grupărilor dimetil terminale geminale. Frecvența întinderii legăturii N-H este micșorată datorită formării legăturilor de hidrogen. În zona specifică pentru întinderea legăturilor N-H și O-H au loc suprapuneri ale acestora, de aceea au fost menționate împreună în tabelul asociat spectrului FT-IR al tetraciclinei. Grupările amidice manifestă două benzi de vibrație de intensitate medie corespunzător vibrațiilor de întindere



simetrice și asimetrice ale N-H. Datorită legăturilor de hidrogen formate, aceste benzi de absorbție apar la 3108 și 3049 cm^{-1} .

Tabelul 2. Atribuirea benzilor de vibrație caracteristice spectrului FT-IR al tetraciclinei

| Nr. de undă (cm^{-1}) | Grupare / legătură | Tip vibrație |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| 3383 | O-H | Legături hidroxil asociate (leg. H) |
| 3312 | O-H | Grupare hidroxil asociată |
| 3108 | N-H | Întindere asimetrică |
| 3049 | N-H | Întindere simetrică |
| | C-H | Întindere C-H aromatic |
| 3000 | C-H | Întindere C-H aromatic |
| 2916 | CH_3 | Întindere asimetrică |
| 2866 | CH_3 | Întindere simetrică |
| 2776 | C-H | Întindere în cadrul grupării metil |
| 2674 | | |
| 1666 | Inel aromatic | Întindere |
| 1618 | C=O | |
| 1584 | | |
| 1552 | Inel aromatic | Întindere |
| 1452 | Inel aromatic | Întindere |
| | CH_3 | Îndoire asimetrică |
| 1358 | C-O | Întindere |
| | CH_3 | Îndoire simetrică |
| | Dimetil terminal geminal | Îndoire |
| 1234 | C-N | Întindere |
| 1178 | C-C | Întindere |
| 1137 | C-C | Întindere |
| 1112 | C-H | Îndoire în plan |
| 1037 | C-N | Întindere |
| 1002 | C-O | Întindere |
| 950 | C-N | Întindere |
| 839 | | |
| 771 | C-H aromatic | Îndoire în afara planului |
| 744 | | |
| 678 | | |
| 641 | C-C | Îndoire în plan |
| | C-H | Îndoire în afara planului |
| 567 | C-C | Îndoire în afara planului |

Metronidazol are formula chimică 2 -metil-5-nitroimidazole -1-etanol ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$).

Grupurile funcționale prezente în structura chimică a analitului, metronidazol, conferă aspectul benzilor vibraționale caracteristice (întindere, îndoire etc.) pentru spectrul FT-IR, care este unic în funcție de grupările funcționale particulare [33,34]. Aceste benzi vibraționale sunt interpretate pentru caracterizarea structurală a compusului metronidazol analizat.

Spectrul FT-IR ale metronidazolului de control (care nu se află în matricea complexă) este prezentat în Fig.4. Eșantionul de control al metronidazolului prezintă o bandă vibrațională caracteristică pentru întinderea C-H la 3095 cm^{-1} . Valorile benzilor IR înregistrate la 1638 și 1475 cm^{-1} pot fi atribuite întinderii legăturii C = C și, respectiv, a legăturii C = N. Întinderea asimetrică a legăturii N = O a fost atribuită benzii de la 1538 cm^{-1} , iar banda vibrațiilor de îndoire CH_2 a fost atribuită benzii de la 1474 cm^{-1} . Vibrației de întindere pentru legătura C-C i-a fost asociată banda de la 1426 cm^{-1} . Benzile de absorbție de la 1423 și 1369 cm^{-1} au fost atribuite vibrației de îndoire a CH_3 și, respectiv, vibrației de întindere asimetrică N = O. În



spectru apar și benzile de absorbție de la 1075 și 1267, 827 și 745 cm^{-1} ce pot fi atribuite întinderii legăturii C-OH, întinderii legăturii C-N și, respectiv, îndoirea legăturii C-H.

Matricea complexă melatonină, acid hialuronic, metronidazol și tetraciclină

Analiza calitativă a spectrelor FT-IR individuale pentru fiecare component: melatonină, acid hialuronic, metronidazol și tetraciclină permite identificarea benzilor de absorbție caracteristice. Spectrul FT-IR al amestecului fizic: melatonina și acid hialuronic este prezentat în Fig. 5. Spectrul FT-IR al amestecului fizic: acid hialuronic, melatonină și tetraciclină ilustrat grafic în Fig. 6 a. prezintă benzi de absorbție în aceleași regiuni în acord cu grupările funcționale identificate în spectrele individuale (Fig 1, 2, 3 și 4).

Detalierea pe zone ale spectrului FT-IR pentru matricea complex (Fig. 6 b-g, pun în evidență clar prezența benzilor de absorbție caracteristice pentru fiecare medicament utilizat.

Matricea complexă conținând HA, MEL, MZ, T a fost obținută prin omogenizarea amestecului cu compoziția: melatonină – 3 mg, acid hialuronic – 100 mg, tetraciclina – 3 mg, metronidazol - 3 mg. În ansamblu, rezultatul analizei structurale FT-IR sugerează că stabilitatea chimică a legăturilor respective în metronidazol, HA, MEL și tetraciclină se menține în comparație cu probele de control (individuale).

Este evident că prin realizarea unei matrici complexe a celor patru compuși se obține un spectru unic care, practic, combină benzile de absorbție proeminente pentru fiecare component individual în parte. **Astfel, se confirmă faptul că nu au loc interacții între produsele medicamentoase utilizate pentru obținerea matricii complexe.**

Analiza spectrofotometrică UV-Vis

Spectrele UV-Vis înregistrate sunt incluse în Fig. 7-11

Spectroscopia în domeniul Ultraviolet și Vizibil (UV-Vis) este o metodă de analiză aplicabilă compusilor organici în a căror structură există legături multiple în conjugare (compusi nesaturați și aromatici). Această metoda prezintă avantajul selectivității absorbției radiației UV-Vis de către sistemele polienice, fapt care permite identificarea cu ușurință a prezenței acestor sisteme în structuri moleculare complexe.

Atât pentru fiecare componentă considerată cât și pentru matricea complexă a acestora, au fost înregistrate spectrele UV-Vis. Spectrele UV-Vis înregistrate au fost ulterior derivate pentru decelarea corectă a componentelor matricii complexe și pentru a urmări dacă apar posibile interacții între componente (Fig. 7-11).

Analizele structurale întreprinse asupra matricii complexe au arătat fără echivoc că melatonina (MEL), metronidazolul (MZ), acidul hialuronic (HA) și tetraciclina (T) prezente simultan într-o matrice biocompatibilă își păstrează individualitatea, nu reacționează între ele, putând astfel să își manifeste proprietățile specifice.

Au fost realizate și studiate structural matrici complexe care să conțină doar MEL și HA, sau MEL, HA și T, sau MEL, HA, T și MZ pentru a putea urmări dacă apar modificări și interacții între componente. Pentru toate aceste matrici au fost obținute atât derivatele de ordin unu cât și derivatele de ordin 2, astfel încât, acolo unde derivatele de ordin unu nu pot decela clar prezența componentelor cu maxime de absorbție suprapuse să fie posibilă identificarea acestora aplicând derivata a doua a curbelor spectrofotometrice – Fig.9 c, 10 b, 11 c, 11 d. Rezultatele analizei spectrofotometrice UV-Vis directe și derivate (ordin unu și doi) coroborate cu cele ale investigației FT-IR detaliată – Fig. 1-6, susțin afirmația că **elementele componente ale matricii biocompatibile conținând acid hialuronic, melatonină, metronidazol și tetraciclină nu interacționează între ele oferind astfel posibilitatea de a avea o acțiune sinergică a acestora în mediu biologic.**



Compoziția pastei Tetraciclină, Metronidazol, Melatonină și Acid hialuronic (TM-MHa), propusă de noi spre brevetare, pentru uz uman, și anume în tratamentul topic al parodontitei marginale cronice lent progresive este următoarea: Tetraciclină 3g, Metronidazol 3g, Melatonină 0.18g, Acid Hialuronic 3g, Vasealină alba 100g.

Avantajele anticipate ale utilizării pastei TM-MHa în tratamentul parodontopatiei marginale cronice lent progresive sunt:

- Obținerea unui tratament topic eficient pentru utilizarea în formele moderate de parodontită marginală cronică profundă lent progresivă.
- Eficientizarea modalității de administrare a combinațiilor de principii active în scopul simplificării metodei de aplicare care să fie accesibilă oricărui pacient și clinician.
- Reducerea costurilor tratamentului bolii parodontale.

Bibliografie

1. Lindhe J., Karring T., Lang N.. Clinical periodontology and implant dentistry. Vol. 1. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008, 371 p.
2. Loe H., Silness J. Periodontal disease in pregnancy: prevalence and severity. In: Acta Odontol. Scand., 1963, vol. 21, p. 32–51.
3. Saffi M. et al. The effect of periodontal therapy on C-reactive protein, endothelial function, lipids and proinflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: study protocol for a randomized controlled trial. In: Trials, 2013, vol. 14(1), p. 283.
4. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. J Clin Periodontol 2017;44:456–62. doi:10.1111/jcpe.12732.
5. Ghid de practică în parodontologie 2010 - <http://cmdr.ro/ghiduri.php?id=40>
6. Dumitriu H, 2009 Parodontologie, Editura Viața Medicală Românească
7. Feres M, Figueiredo LC, Soares GMS, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. Periodontol 2000 2015;67:131–86. doi:10.1111/prd.12075.
8. Matesanz-Pérez P, Garcia-Gargallo M, Figuero E, Bascones-Martínez A, Sanz M, Herrera D. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2013;40:227–41. doi:10.1111/jcpe.12026.
9. Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: Systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. Periodontol 2000 2016;71:82–112. doi:10.1111/prd.12121.
10. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KHW. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. J Bone Miner Res 2002;17:1219–29. doi:10.1359/jbmr.2002.17.7.1219.



11. Montero J, López-Valverde N, Ferrera MJ, López-Valverde A. Changes in crevicular cytokines after application of melatonin in patients with periodontal disease. *J Clin Exp Dent* 2017;9:e1081–7. doi:10.4317/jced.53934.
12. Andersen LPH, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig* 2016;36:169–75. doi:10.1007/s40261-015-0368-5.
13. De Matos Cavalcante AG, De Bruin PFC, De Bruin VMS, Nunes DM, Pereira EDB, Cavalcante MM, et al. Melatonin reduces lung oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pineal Res* 2012;53:238–44. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.00992.x.
14. Toole BP. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004;4:528–39. doi:10.1038/nrc1391.
15. Almond A. Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1591–6. doi:10.1007/s00018-007-7032-z.
16. Robert L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications. *Pathol Biol* 2015;63:32–4. doi:10.1016/j.patbio.2014.05.019.
17. Diker N, Gulsever S, Koroglu T, Yilmaz Akcay E, Oguz Y. Effects of Hyaluronic Acid and Hydroxyapatite/Beta-tricalcium Phosphate in Combination on Bone Regeneration of a Critical-size Defect in an Experimental Model. *J Craniofac Surg* 2018;29:1087–93. doi:10.1097/scs.0000000000004338.
18. Sakai A, Akifusa S, Itano N, Kimata K, Kawamura T, Koseki T, et al. Potential role of high molecular weight hyaluronan in the anti-Candida activity oral epithelial cells. *Med Mycol* 2007;45. doi:10.1080/13693780601039607.
19. Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Piloni A, Bernard GW. Bacteriostatic Effects of Hyaluronic Acid. *J Periodontol* 1999;70:370–4. doi:10.1902/jop.1999.70.4.370.
20. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito D V., Klaassen CD, Marks JG, Shank RC, et al. Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. *Int J Toxicol* 2009;28:5–67. doi:10.1177/1091581809337738.
21. Gerhard Talsky, “Derivative Spectrophotometry: Low and Higher Order”, *Verlagsgesellschaft*, March 2004
22. Aastha Dutta, „Chapter 4 – Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, vol. 2, pp. 73–93, May 2017
23. Uslu, B.; Ozkan, S.A., “Determination of Binary Mixtures of Levodopa and Benserazide in Pharmaceuticals by Ratio-Spectra Derivative Spectrophotometry”, *Anal. Lett.* 2002, 5, 303–314.
24. Uslu, B.; Ozkan, S.A., “Determination of Lamivudine and Zidovudine in Binary Mixture Using First Derivative Spectrophotometric, First Derivative of the Ratio Spectra, and HPLC UV Methods”, *Anal. Chim. Acta* 2002, 466, 175–185.
25. Bebawy, L.I. Application of TLC-Densitometry, “First Derivative UV Spectrophotometry and Ratio Derivative Spectrophotometry for the Determination of Dorzolamide Hydrochloride and Timolol Maleate”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 737–746.
26. El-Gindy, A.; El Walily, A.F.M.; Bedair, M.F. “First-Derivative Spectrophotometric and LC Determination of Cefuroxime and Cefadroxil in Urine”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 23, 341–352.
27. Kikwai L, Kanikkannan N, Babu RJ, Singh M (2002) Effect of vehicle on the transdermal delivery of melatonin across porcine skin in vitro. *J Control Release* 83: 307-311.



28. Brzezinski A (1997) Melatonin in human. *N Engl J Med* 336: 186-195.
29. Jayachandra Babu R, Dayal PP, Pawar K, Singh M (2011) Nose to brain transport of melatonin from polymer gel suspension: a microdialysis study in rats. *J Drug Target* 19: 731-740.38.
30. Arendt J (1998) Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* 3: 13-22.
31. Szmuszkowicz J, Anthony WC, Heinzelman RV (1960) Synthesis of N-Acetyl-5-methoxytryptamine. *J Org Chem.* 25: 857-859.
32. Chopra, I., Roberts, M., "Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance", *Microbiology and Molecular Biology*, vol. 65, no. 2, pp. 232 – 260, June 2001
33. Crupi V, Majolino D, Migliardo P, Mondello MR, Pergolizzi S, et al. (2004) FTIR spectroscopy for the detection of liver damage. *Spectroscopy* 18: 67-73.
34. Lide, D.R., G.W.A. Milne (eds.), " Handbook of Data on Organic Compounds. Volume I.", 3rd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton ,FL. 1994., p. V4: 3207



REVEDICĂRI

1. Obținerea unei matrici complexe: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină, metronidazol propusă pentru tratamentul topic al leziunilor parodonale.
2. Materialul obținut a fost caracterizat fiind efectuate studii experimentale precum: analiza structurală FT-IR; analiza spectrofotometrică UV-Vis direct și derivată arătându-se menținerea individualității fiecărui component în parte.
3. S-a putut proba experimental faptul că elementele componente ale matricii biocompatibile conținând acid hialuronic, melatonină, metronidazol și tetraciclină nu interacționează între ele, oferind astfel posibilitatea de a avea o acțiune sinergică a acestora în mediu biologic.
4. S-a stabilit compoziția exactă a pastei care va fi utilizată în tratamentul topic al parodontitei marginale cronice lent progresive și anume: **Tetraciclină 3g, Metronidazol 3g, Melatonină 0.18g, Acid Hialuronic 3g, Vaselină alba 100g.**

DESENE EXPLICATIVE

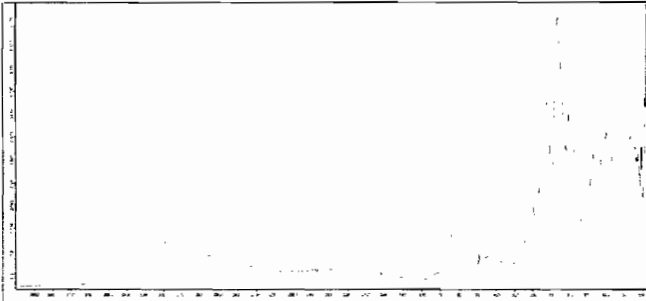


Figura 1. Spectrul FT-IR al melatoninei

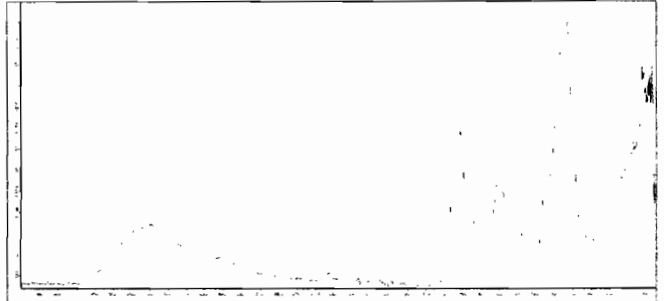


Figura 2. Spectrul FT-IR pentru acidul hialuronic.

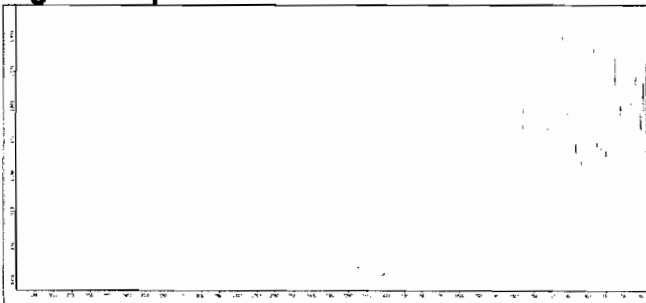


Figura 3. Spectrul FT-IR al tetraciclinei

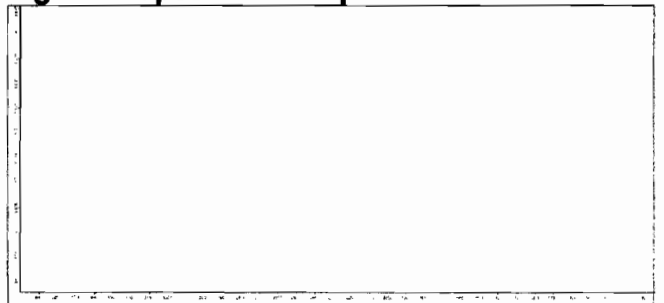


Figura 4. Spectrul FT-IR al metronidazolului

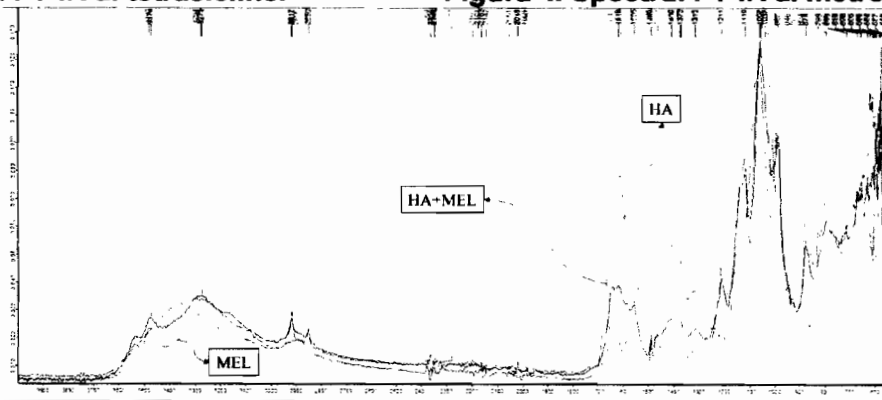


Figura 5 Spectrul FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic și melatonină.

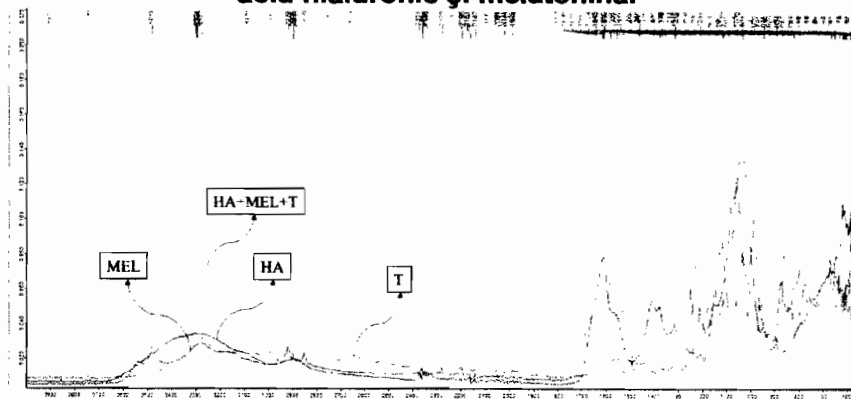


Figura 6 a. Spectrul FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic, melatonină, și tetraciclină.

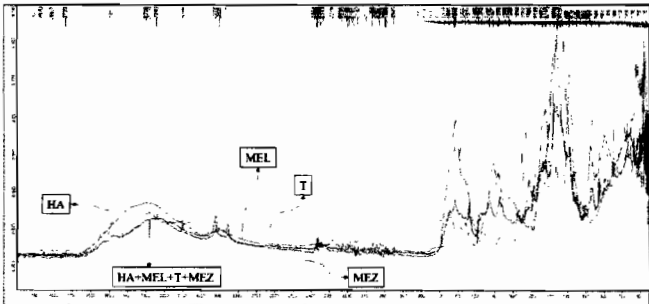


Figura 6 b. Detaliu pe domeniul 4000-500 cm^{-1} al spectrului FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

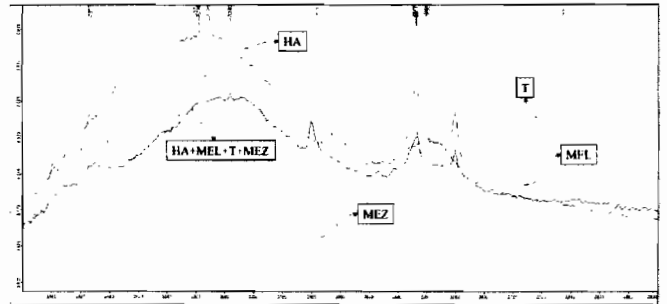


Figura 6 c. Detaliu pe domeniul 3600-2500 cm^{-1} al spectrului FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

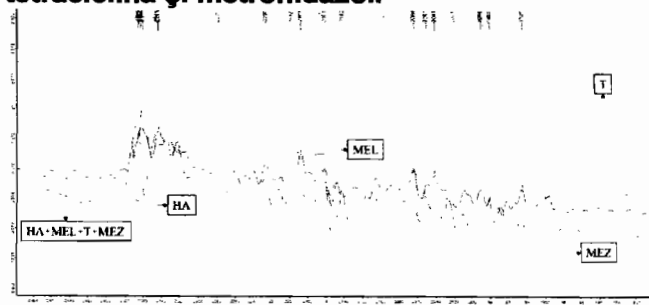


Figura 6 d. Detaliu pe domeniul 2500-1820 cm^{-1} al spectrului FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

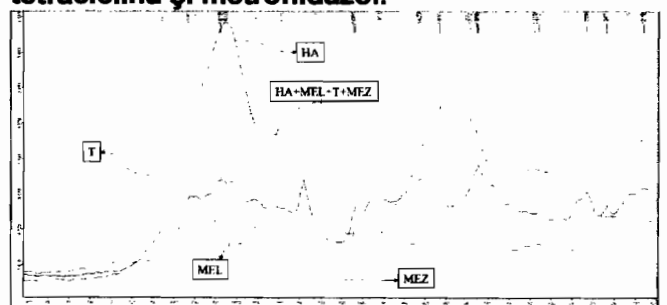


Figura 6 e. Detaliu pe domeniul 1800-1200 cm^{-1} al spectrului FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

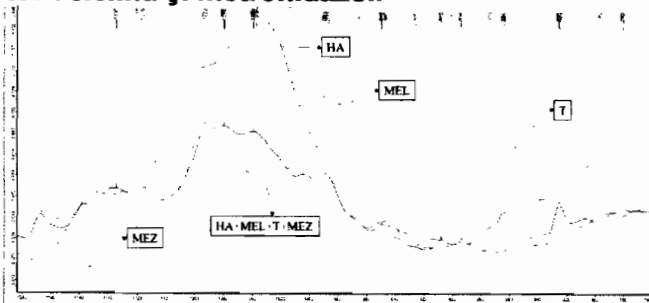


Figura 6 f. Detaliu pe domeniul 1200-760 cm^{-1} al spectrului FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

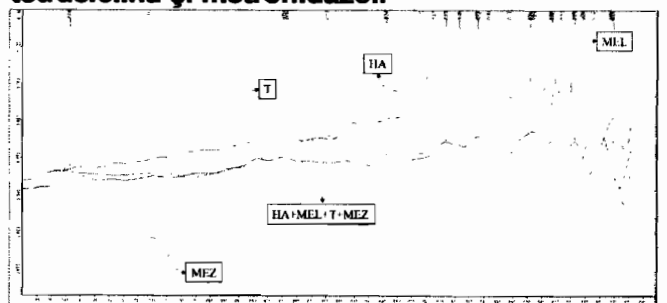


Figura 6 g. Detaliu pe domeniul 760-540 cm^{-1} al spectrului FT-IR pentru matricea complexă conținând: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

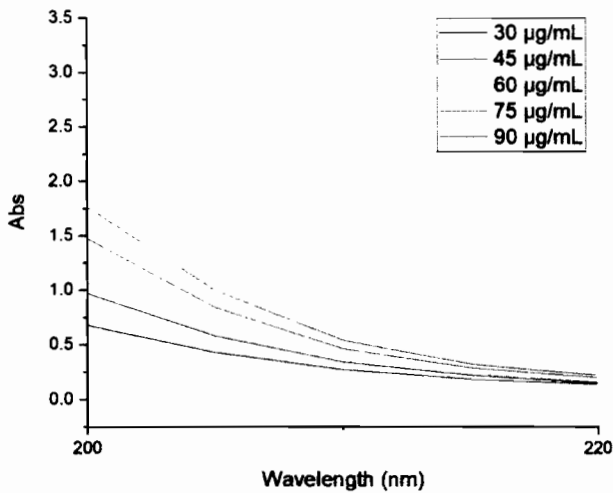


Figura 7 a. Spectrele UV-Vis (ordin zero) înregistrate pentru acidul hialuronic.

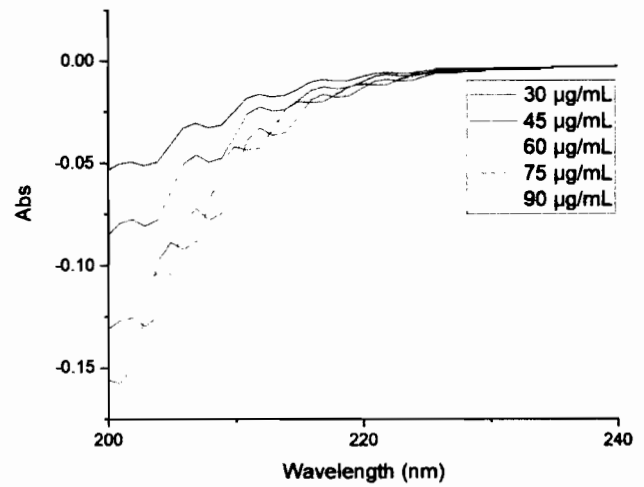


Figura 7 b. Spectrele UV-Vis derivate (ordin unu) înregistrate pentru acidul hialuronic.

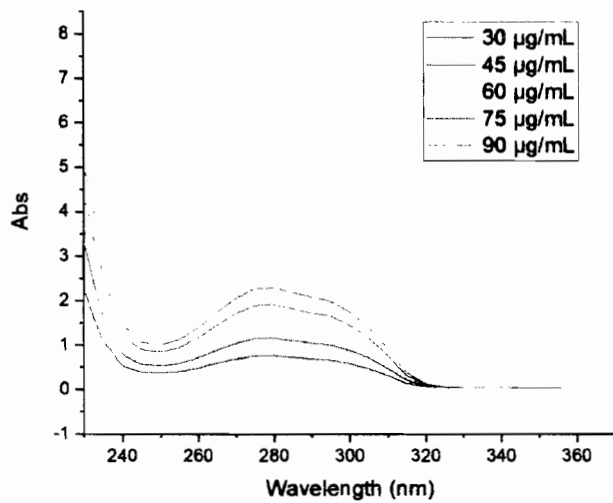


Figura 8 a. Spectrele UV-Vis (ordin zero) înregistrate pentru melatonină.

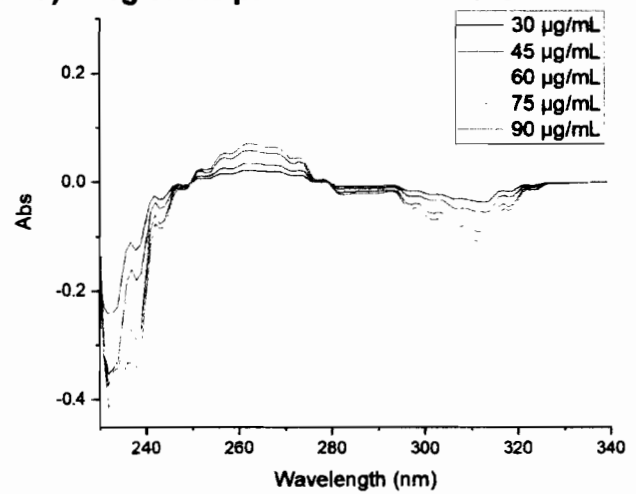


Figura 8 b. Spectrele UV-Vis derivate (ordin unu) înregistrate pentru melatonină.

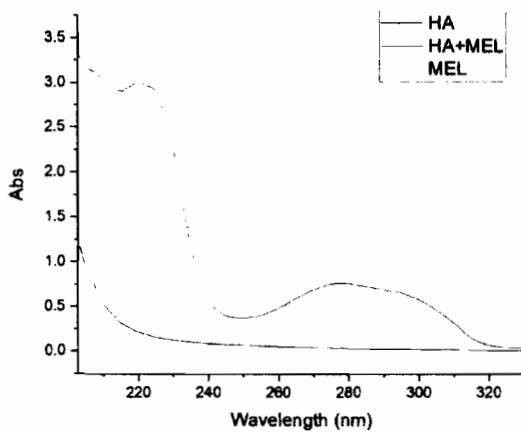


Figura 9 a. Spectrele UV-Vis (ordin zero) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic și melatonină.

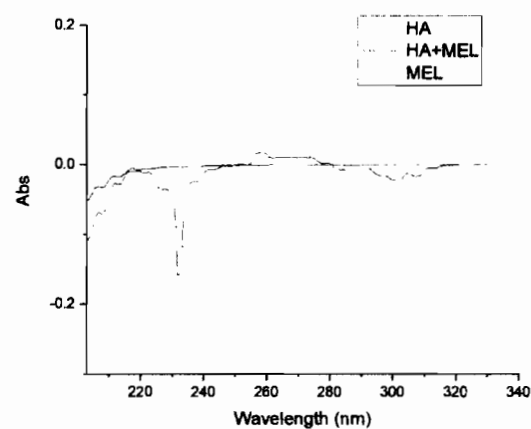


Figura 9 b. Spectrele UV-Vis derivate (ordin unu) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic și melatonină.

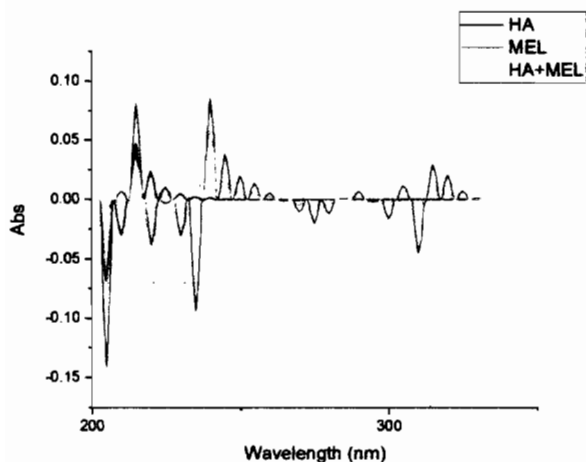


Figura 9 c. Spectrele UV-Vis derivate (ordin doi) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic și melatonină.

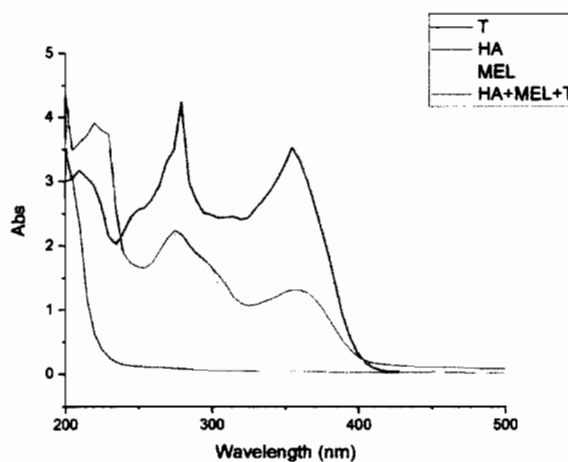


Figura 9 d. Spectrele UV-Vis (ordin zero) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic, melatonină și tetraciclină.

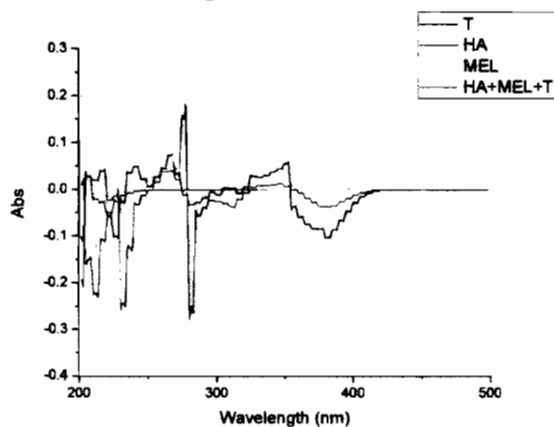


Figura 10 a. Spectrele UV-Vis derivate (ordin unu) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic, melatonină și tetraciclină.

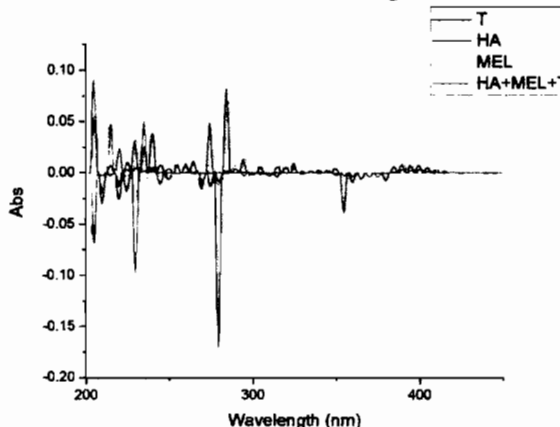


Figura 10 b. Spectrele UV-Vis derivate (ordin doi) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic, melatonină și tetraciclină.

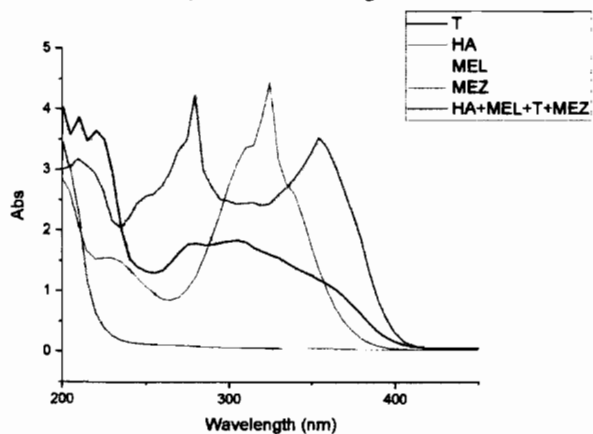


Figura 11 a. Spectrele UV-Vis (ordin zero) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

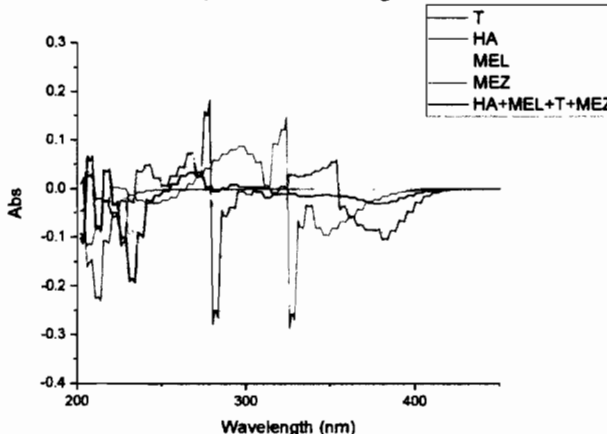


Figura 11 b. Spectrele UV-Vis derivate (ordin unu) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

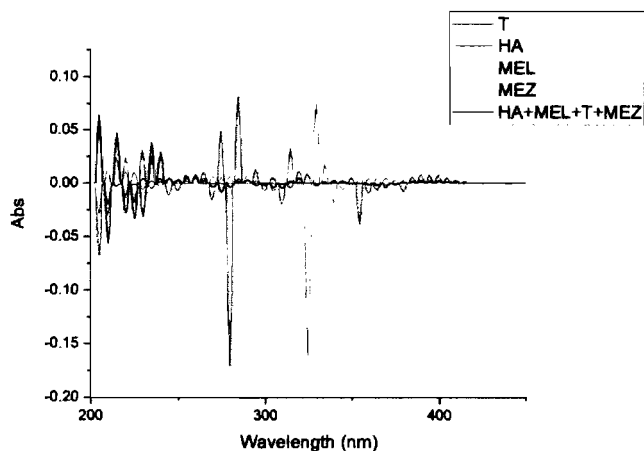


Figura 11 c. Spectrele UV-Vis derivate (ordin doi) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.

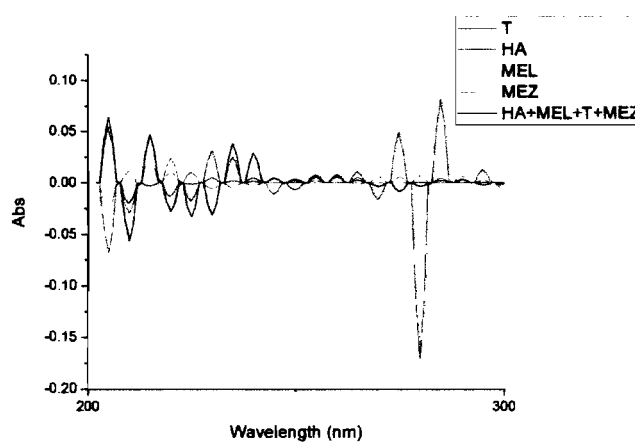


Figura 11 d. Detaliu 200-300 nm pentru spectrele UV-Vis derivate (ordin doi) înregistrate pentru matrice: acid hialuronic, melatonină, tetraciclină și metronidazol.