



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00633

(22) Data de depozit: 12/10/2020

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. 3/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA
MATERIALELOR (INCDFM),
STR.ATOMIȘTILOR, NR. 405A, CP.MG-7,
MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• STAN GEORGE, CALEA 13 SEPTEMBRIE
NR. 216, SC.1, BL. V46, ET. 2, AP. 12,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPA ADRIAN-CLAUDIU,
BD. IULIU MANIU NR. 79, BL. 1, SC. 1,
AP. 3, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• BEȘLEAGĂ STAN CRISTINA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE, NR.216, BL.V46,
SC.1, AP.12, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE REALIZARE A UNUI IMPLANT ENDOOSOS
CU ACTIVITATE ANTIMICROBIANĂ EXTINSĂ,
CONDIȚIONATĂ CA INTENSITATE ȘI DURATĂ PRIN
GROSIMEA STRATULUI BIORESORBABIL DE ACOPERIRE
DIN STICLĂ FOSFATICĂ COSUBSTITUITĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de realizare a unui implant endoosos metalic, ortopedic sau dentar, acoperit cu un strat subțire de sticlă fosfatică, depus prin tehnologia pulverizării în câmp magnetron în regim de radio - frecvență, cu activitate antimicrobiană extinsă, care poate fi condiționată ca intensitate și durată prin grosimea stratului bioresorbabil de sticlă bio - activă fosfatică. Procedul conform invenției constă în bio - funcționalizarea suprafeței exterioare a unui implant endoosos metalic prin metoda pulverizării în câmp magnetron în regim de radiofrecvență dintr-o țintă pulbere de sticlă bioactivă fosfatică cu compoziție predefinită, la o presiune a gazului de lucru, respectiv argon de puritate 6.0, situată în domeniul 0.8...1.0 Pa, distanță de separare țintă - substrat de 35 mm și temperatură de depunere < 100°C, straturile subțiri depuse fiind continue, poroase și uniforme și au grosimea minimă de 100 nm de sticlă bio - activă fosfatică din sistemul compozițional P_2O_5 - CaO - Na_2O - Fe_2O_3 cu aditivi de CuO și Ga_2O_3 2...4 mol%, obținându-se astfel un strat de sticlă bio - activă fosfatică cu o adeziune mecanică excelentă la suprafața substratului metalic care este citocompatibil și are o activitate puternic antibacteriană.

Revendicări: 1
Figuri: 5

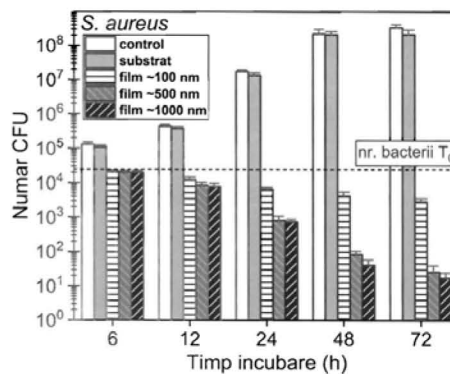


Fig. 5



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2020 633
Data depozit	12 - 10 - 2020

1

14

**PROCEDEU DE REALIZARE A UNUI IMPLANT ENDOOSOOS CU ACTIVITATE
ANTIBACTERIANĂ EXTINSĂ, CONDIȚIONATĂ CA INTENSITATE ȘI DURATĂ PRIN
GROSIMEA STRATULUI BIORESORBABIL DE ACOPERIRE DIN STICLĂ FOSFATICĂ
COSUBSTITUITĂ**

elaborată de:

George Stan, Adrian-Claudiu Popa, Cristina Beșleagă Stan

Descrierea invenției:

Prezenta invenție se referă la o metodă de realizare a unor implanturi endoosoase cu suprafața exterioară bio-funcționalizată prin metoda pulverizării în câmp magnetron în regim de radiofrecvență cu straturi subțiri antimicrobiene și citocompatibile de sticlă bio-activă fosfatică care încorporează agenți terapeutici cuplați.

Din punct de vedere medical am intrat „era post-antibiotică” [<https://www.nature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-1.15135>], deoarece au fost deja identificate primele tulpini bacteriene rezistente la toate antibioticele din domeniul medicinei umane și veterinare [A.J. Alanis, **Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?** Arch. Med. Res. 36 (2005) 697–705]. Situația actuală a fost provocată de tratamente insuficiente care au permis tulpinilor bacteriene să dobândească rezistență la antibiotice prin intermediul de mutații ale genomului lor [N. Woodford, M.J. Ellington, **The emergence of antibiotic resistance by mutation**, Clin. Microbiol. Infect. 13 (2007) 5–18), U. Ndagi, A.A. Falaki, M. Abdullahi, M.M. Lawal, M.E. Soliman, **Antibiotic resistance: bioinformatics-based understanding as a functional strategy for drug design**, RSC Adv. 10 (2020) 18451–18468]. Rezistența la tratament are însă mai puține șanse să apară atunci când sunt utilizate combinații de agenți antimicrobieni cu efecte sinergice ce prezintă mecanisme de acțiune diferite.

Soluții alternative sunt căutate cu precădere în domeniul implantologiei osoase deoarece traumatismele temporare asociate procedurilor chirurgicale pot slăbi răspunsul imun local al corpului uman și permite bacteriilor să adere și să prolifereze la situl implantării. De exemplu, UK National Joint Registry a raportat ca infecțiile la situl de implantare au reprezentat cauza de eșec pentru ~14.8% dintre protezele endoosoase de șold care au necesitat operații de revizie [<https://reports.njrcentre.org.uk/Portals/0/PDFdownloads/NJR%2017th%20Annual%20Report%202020.pdf>], în pofida realizării de tratamente post-chirurgicale locale cu antibiotice convenționale.

Proprietățile antimicrobiene devin și mai stringente în cazul implanturilor dentare, spre deosebire de cele ortopedice, deoarece în cadrul procedurilor chirurgicale stomatologice nu se pot

DIRECTOR GENERAL INCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU

Semnătura:



obține condiții aseptice. Sterilitatea sitului chirurgical, aflat în cavitatea bucală, care conține în mod normal până la 700 de tulpini de bacterii [P.N. Deo, R. Deshmukh, **Oral microbiome: Unveiling the fundamentals, J. Oral. Maxillofac. Pathol.** 23 (2019) 122–128], este împiedicată de infiltrarea salivei, conducând la contaminarea locală în zona de implantare.

Se impune astfel în implantologia orală necesitatea de limitare sau chiar de inhibare totală a atașării/colonizării bacteriilor comensale și prin aceasta, asigurarea în primele etape post-implantare, a unui mediu fără agenți patogeni, aspect decisiv pentru performanța ulterioară a implanturilor endosoase. Acest fapt va conduce la mai puține evenimente de infecție și prin aceasta riscul de respingere a implantului și necesitatea operațiilor de revizie sau chiar de înlocuire vor fi mult diminuate.

În prezent sunt cercetate la nivel mondial cu precădere acoperirile pentru implanturi pe bază de hidroxiapatită [J. Cisek, V. Brozek, T. Chraska, F. Lukac, J. Medricky, R. Musalek, et al., **Silver-doped hydroxyapatite coatings deposited by suspension plasma spraying, J. Therm. Spray Technol** 27 (2018) 1333–1343), D. Predoi, S.L. Iconaru, M.V. Predoi, N. Buton, M. Motelica-Heino, **Zinc doped hydroxyapatite thin films prepared by sol-gel spin coating procedure, Coatings** 9 (2019) 156), Y. Huang, X. Zhang, H. Mao, T. Li, R. Zhao, Y. Yan, X. Pang, **Osteoblastic cell responses and antibacterial efficacy of Cu/Zn co-substituted hydroxyapatite coatings on pure titanium using electrodeposition method, RSC Adv.** 5 (2015) 17076–17086] sau de sticlă bio-activă silicatică [J.V. Rau, M. Curcio, M.G. Raucci, K. Barbaro, I. Fasolino, R. Teghil, L. Ambrosio, A. De Bonis, A.R. Boccaccini, **Cu-releasing bioactive glass coatings and their in vitro properties, ACS Appl. Mater. Interfaces** 11 (2019) 5812–5820] aditivate cu diferiți agenți antimicrobieni (în special Ag, Zn și Cu). Însă, în cazul hidroxiapatitei există limite ale nivelului de substituție ionică care poate fi acceptat de rețeaua sa cristalină, dincolo de care pot fi generate fenomene de segregare și/sau formare de faze secundare cu comportament biologic impredictibil.

De asemenea, diverse metode de obținere de acoperiri pentru implanturi au fost propuse în brevete. Astfel, **US4234972A** descrie o metodă de realizare a acoperirilor implantologice de sticlă bio-activă silicatică din sistemul compozițional $\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--CaO--P}_2\text{O}_5\text{--CaF}_2\text{--B}_2\text{O}_3$ pe substraturi din aliaj Co-Cr prin tehnologia emailării-glazurării (realizată prin imersia substratului metalic în sticla topită). **US20110045052A1** propune formulații de sticle bio-activă silicatică din sistemul compozițional $\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--CaO--MgO--K}_2\text{O--ZnO--B}_2\text{O}_3\text{--P}_2\text{O}_5$ cu coeficient de dilatare termic adaptat aliajelor metalice de Ti6Al4V și Co-Cr, destinate realizării de acoperiri prin tehnologii chimice, prin depunere electroforetică sau depunere prin pulverizare termică în flacără sau

DIRECTOR GENERAL NCDFM, Dr. IONUȚ ENCULESCU

Semnătura:



plasmă, fără însă a le fabrica la nivel demonstrativ și evalua. **RO130068B1** descrie o metodă de realizare a unui implant dentar acoperit cu straturi subțiri de sticlă bio-activă silicatică, fără elemente alcaline, din sistemul compozițional $\text{SiO}_2\text{--CaO--MgO--P}_2\text{O}_5\text{--ZnO--SrO}$, sintetizat prin tehnologia pulverizării în câmp magnetron în regim de radio-frecvență, pe suprafața implanturilor dentare, conferindu-le o rată de osteointegrare rapidă necesară procesului de restaurație dentară. **RO132595B1** descrie o metodă inovativă de realizare de acoperiri pentru implanturi de sticlă bio-activă silicatică, obținute prin sinteza în plasmă magnetron, direct din reactivi sub formă de pulberi, și nu dintr-o sticlă deja fabricată printr-o metodologie clasică (răcirea topiturii sau sol-gel).

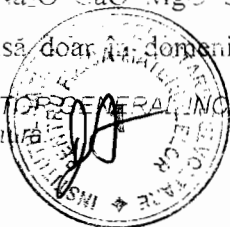
Dacă în cazul sticlelor bio-actice silicaticice nivelul de „toleranță” structurală este mai mare, ca și în cazul hidroxiapatitei, dificultatea este constituită de viteza de solubilizare redusă a acestei clase de biomateriale în mediile intercelulare, ceea ce va împiedica eliberarea rapidă și eficientă din structura lor a ionilor terapeutici cu acțiune antimicrobiană. Atât hidroxiapatita, cât și sticlele bio-actice silicaticice, sunt materiale capabile să joace un dublu rol în strat subțire: (i) strat barieră de difuzie pentru protejarea implantului metalic și (ii) acoperire biofuncțională cu efect de biomineralizare pentru augmentarea refacerii osoase.

Primele ore/zile după implantare sunt considerate critice pentru prevenirea infecțiilor, deoarece patogenii sunt încă într-o stare dormitivă și deci metabolic inactivi [K.A. Poelstra, N.A. Barezki, A.M. Rediske, A.G. Felts, J.B. Slunt, D.W. Grainger, **Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies**, J. Biomed. Mater. Res. 60 (2020) 206–215].

Sticlele bio-actice fosfatice ar putea îndeplini un astfel de deziderat deoarece prezintă proprietatea de a se dizolva complet în corpul uman, fiind deci capabile la nivel ideatic, datorită ratei lor mai mari de degradare comparativ cu sticlele silicate, să elibereze într-o manieră mai eficientă ionii terapeutici incluși în compoziția sa, în vederea prevenirii infecției, stimulării regenerării osoase și vindecării tisulare [J.C. Knowles, **Phosphate based glasses for biomedical application**, J. Mater. Chem 13 (2003) 2395–2401]. Producții de degradare a multor sisteme de sticle fosfatice sunt ușor metabolizate, fără inducerea de complicații, așa cum au arătat studii *in vivo* pe model animal [E.A. Abou Neel, V. Salih, J.C. Knowles, **Phosphate-based glasses**, in: Compr. Biomater., Elsevier, 2011: pp. 285–297].

Un brevet a fost identificat în literatura de specialitate. **US8080490B2** descrie realizarea unui sistem compozițional de sticlă fosfatică din sistemul compozițional $\text{P}_2\text{O}_5\text{--SO}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--CaO--MgO--SrO--BaO--ZnO--Ag}_2\text{O--CuO--GeO}_2\text{--TeO}_2\text{--Cr}_2\text{O}_3$, însă cu aplicabilitate restrânsă doar în domeniul tratamentului de uz extern al rănilor deschise – plasture imbibat cu

DIRECȚIA GENERALĂ ÎNCDPM, Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnătură



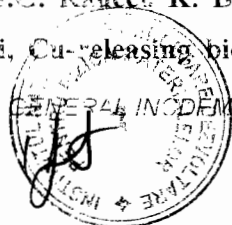
pulbere de sticlă care eliberează ioni cu efect antibacterian.

Acoperiri pentru implanturi pe bază de sticlă bio-activă fosfatică au fost realizate până în prezent doar prin tehnologia pulverizării în câmp magnetron în regim de radio-frecvență din sistemele compoziționale P_2O_5 -MgO-CaO- Na_2O [B. Stuart, M. Gimeno-Fabra, J. Segal, I. Ahmed, D.M. Grant, **Preferential sputtering in phosphate glass systems for the processing of bioactive coatings, Thin Solid Films 589 (2015) 549–542**], P_2O_5 -MgO-CaO- Na_2O - Fe_2O_3 [B. Stuart, M. Gimeno-Fabra, J. Segal, I. Ahmed, D.M. Grant, **Preferential sputtering in phosphate glass systems for the processing of bioactive coatings, Thin Solid Films 589 (2015) 549– 542**], B.W. Stuart, M. Gimeno-Fabra, J. Segal, I. Ahmed, D.M. Grant, **Mechanical, structural and dissolution properties of heat treated thin-film phosphate based glasses, Appl. Surf. Sci. 416 (2017) 605–617**] și P_2O_5 -MgO-CaO- Na_2O - Ga_2O_3 [B.W. Stuart, C.A. Grant, G.E. Stan, A.C. Popa, J.J. Titman, D.M. Grant, **Gallium incorporation into phosphate based glasses: Bulk and thin film properties, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 82 (2018) 317–382**]. Proprietățile bio-funcționale ale acestor acoperiri nu au fost însă demonstrate până în prezent.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea elementelor tehnice de obținere de straturi sacrificiale pe bază sticlă bio-activă fosfatică cu efect antimicrobian, cu morfologie, compoziție și structură controlată, care pot fi depuse direct pe suprafața implanturilor metalice sau peste straturile osteogenice de hidroxiapatită sau sticlă bio-activă silicatică.

Extinderea plajei de acțiune antimicrobiană a sticlelor bio-actice fosfatice, și implicit a acoperirilor pentru implanturi derivate din acestea, poate fi asigurată prin incorporarea simultană a doi agenți oxidici antimicrobieni cu acțiune singergică: CuO și Ga_2O_3 în concentrații de 2–4 mol%. Ionii de cupru sunt capabili să combată dezvoltarea tulpinilor bacteriene *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis* [C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, **Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, Biomaterials 34 (2013) 422–433**]. M. Micla, E. Verné, **Bioactive and Antibacterial Glass Powders Doped with Copper by Ion-Exchange in Aqueous Solutions, Materials 9 (2016) 405**], A. Bari, N. Bloise, S. Fiorilli, G. Novajra, M. Vallet-Regí, G. Bruni, A. Torres-Pardo, J.M. González-Calbet, L. Visai, C. Vitale-Brovarone, C. **Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration, Acta Biomater. 55 (2017) 493–504**], J.V. Rau, M. Curcio, M.G. Rucci, K. Barbaro, I. Fasolino, R. Teghil, L. Ambrosio, A. De Bonis, A.R. Boccaccini, **Cu-releasing bioactive glass coatings and their in vitro properties, ACS Appl.**

DIRECTOR GENERAL INCDERM, Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnătura:



Mater. Interfaces 11 (2019) 5812–5820), T.M. Gross, J. Lahiri, A. Golas, J. Luo, F. Verrier, J.L. Kurzejewski, D.E. Baker, J. Wang, P.F. Novak, M.J. Snyder, **Copper-containing glass ceramic with high antimicrobial efficacy**, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1979], în timp ce ionii de galiu pe cea a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* meticilino-rezistent dar și a *Clostridium difficile* și [S.P. Valappil, D. Ready, E.A. Abou Neel, D.M. Pickup, W. Chrzanowski, L.A. O'Dell, R.J. Newport, M.E. Smith, M. Wilson, J.C. Knowles, **Antimicrobial gallium-doped phosphate-based glasses**, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 732–741), S. Pourshahrestani, E. Zeimaran, N.A. Kadri, N. Gargiulo, S. Samuel, S.V. Naveen, T. Kamarul, M.R. Towler, **Gallium-containing mesoporous bioactive glass with potent hemostatic activity and antibacterial efficacy**, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 71–86), S. Sanchez-Salcedo, G. Malvasi, A.J. Salinas, G. Lusvardi, L. Rigamonti, L. Menabue, M. Vallet-Regi, **Highly-bioreactive silica-based mesoporous bioactive glasses enriched with gallium(III)**, *Materials* 11 (2018) 367].

Ca metodă de depunere a acoperirilor pentru implanturi în cadrul invenției este preferată tehnologia pulverizării în câmp magnetron în regim de radio-frecvență deoarece permite atât obținerea de filme uniforme compozițional și structural pe substraturi de arie mare, cât și scalarea la nivel de producție industrială, așa cum a fost demonstrat în industria semiconductorilor și cea a acoperirilor decorative.

Procedeul propus, de realizare de acoperiri cu straturi sacrificiale pe bază de sticlă bio-activă fosfatică, continue, uniforme și poroase și efect antimicrobian, presupune utilizarea ca țintă catod a unei pulberi din sistemul compozițional $P_2O_5-CaO-Na_2O-Fe_2O_3$ cu co-substituție dublă de CuO și Ga_2O_3 (în concentrații de 2–4 mol%) în locul CaO și respectiv Fe_2O_3 , presată într-un suport port-țintă metalic, pentru depunerea de filme subțiri (cu grosime minimă de 100 nm) cu o bună replicare compozițională și structurală a biomaterialului-sursă printr-un proces de pulverizare în câmp magnetron în regim de radio-frecvență în atmosferă inertă de argon, operat la o presiune a gazului de lucru cuprinsă în intervalul 0,8–1.0 Pa, distanță ținta-substrat de 35 mm și temperatură de depunere menținută sub 100°C.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- permite obținerea de implanturi endoosoase acoperite cu straturi sacrificiale bioresorbabile de sticlă fosfatică cu aderență bună la substrat, continue, uniforme și cu porozitate superficială, cu deviații minime de compoziție și structură față de biomaterialul-sursă;
- prezenta în compoziția acoperirilor de sticla bio-activă fosfatică atât a CuO cât și a Ga_2O_3 este așteptat să determine o plajă extinsă de acțiune antimicrobiană, în timp ce

DIRECTOR GENERAL CNDP/DFM. Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnătura



producții de degradare ai sticlelor fosfatice să fie metabolizați fără efecte adverse;

- viteza de degradare mare a sticlei fosfatice poate fi asigurată din preparare prin creșterea concentrației de Na_2O în domeniul (5–15 mol%) și în cazul acoperirilor pentru implanturi și prin inducerea suplimentar a unei porozități superficiale;
- durata și intensitatea efectului antibacterian va fi controlată prin grosimea stratului sacrificial bioresorbabil de sticlă bio-activă fosfatică.

Invenția este prezentată pe larg în continuare cu referire și la Figurile 1–5, care reprezintă:

- fig. 1, morfologia suprafeței unei acoperiri de sticlă bio-activă fosfatică evidențiată prin microscopie de forță atomică pe arii pe arii de (a) $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ și (b) $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. (c) Profilul topografic pe înălțime corespunzător liniei marcate în imaginea (b).

- fig. 2, compoziția oxidică comparativă a biomaterialului-sursă (țintă catod) și straturilor de sticlă bio-activă fosfatică (determinate pe bază măsurărilor realizate prin spectroscopie de raze X cu dispersie de energie).

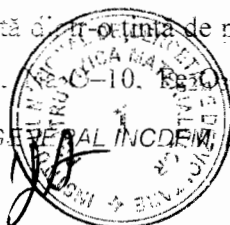
- fig. 3, spectrele de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier comparative ale (a) biomaterialului-sursă (țintă catod) și (b) filmului de sticlă bio-activă fosfatică depus prin pulverizare în câmp magnetron.

- fig. 4, diagramele (a) MTS ale viabilității/proliferării celulare și (b) LDH ale citotoxicității la 24 h. (1) număr celule fibroblaste umane (Hs27, ATCC® CRL-1634™) însămânțate; (2) control biologic – policarbonat; (3) substrat nefuncționalizat și funcționalizat cu strat sacrificial de sticlă bio-activă fosfatică cu grosime de (4) $\sim 500 \text{ nm}$ și (5) $\sim 1000 \text{ nm}$. Morfologia celulelor Hs27 cultivate substratul funcționalizat cu strat sacrificial de sticlă bio-activă fosfatică. Filamentele de actină sunt marcate cu roșu (phalloidin Alexafluor 596), iar nucleii contracolorați cu albastru (DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole). Obiectiv microscop: $40\times$.

- fig. 5, diagrama activității antibacteriene a straturilor sacrificiale de sticlă bio-activă fosfatică (cu grosimi diferite, *i.e.*, ~ 100 , ~ 500 și $\sim 1000 \text{ nm}$) împotriva tulpinei bacteriene Gram-pozitive *Staphylococcus aureus*, comparativ cu controlul (mediul nutritiv fără probă) și substratul nefuncționalizat.

Fără a limita în vreun fel aria invenției, este prezentat în continuare un exemplu de realizare a invenției. Însoțit de demonstrația (i) fabricării de straturi sacrificiale de sticlă bio-activă fosfatică continue, uniforme și poroase prin metoda pulverizării în câmp magnetron în regim de radiofrecvență a unei cantități de pulbere de sticlă bio-activă fosfatică cu compoziția (în mol%) P_2O_5 –50, CaO –35, SiO_2 –10, Fe_2O_3 –2, CuO_2 , Ga_2O_3 –3, și (ii) probării controlului asupra duratei și

DIRECTOR GENERAL INCDEIM: Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnătura:



intensității efectului antimicrobian prin grosimea de strat depus.

Obiectul invenției, constând în obținerea de straturi subțiri de sticlă bio-activă, s-a efectuat cu sistemul de depunere prin pulverizare în câmp magnetron în regim de radio-frecvență (1,78 MHz) Vacma, model UVN-75R1.

Ținta catod, constituită de pulberea de sticlă fosfatică cu compoziția (în mol%) P_2O_5 –50, CaO –33, Na_2O –10, Fe_2O_3 –2, CuO –2, Ga_2O_3 –3, a fost realizată prin presare într-o port-țintă metalică (similar cu soluția din **RO130068B1**). Sticla a fost fabricată prin tehnologia răcirii topiturii. Reactivi de P_2O_5 , $CaHPO_4$, NaH_2PO_4 , $FePO_4 \cdot 2H_2O$, CuO și Ga_2O_3 (Sigma Aldrich) au fost amestecați în proporții definite pentru obținerea compoziției dorite. Amestecul omogen de reactivi a fost preîncălzit la $400^\circ C$ timp de 30 minute pentru deshidratare, și apoi topit în condiții ambientale într-un creuzet de Pt-Rh (90:10%) la $1200^\circ C$ timp de 2 ore. Sticla fosfatică a fost obținută prin răcirea bruscă pe o placă de oțel inoxidabil. Pentru a obține pulberi fine (dimensiune medie de particulă ~ 30 – $50 \mu m$), pretabile presării, sticla a fost măcinată cu ajutorul unei mori cu bile de agat la o viteză de 600 rotații/minut, timp de 15 minute.

Substraturile metalice pe bază de titan, sub formă de cupoane pătrate, au fost curățate atât *ex situ* (chimic, prin ultrasonicare în acetonă și apoi alcool etilic), cât și *in situ* (prin degazare în vid și corodare în plasmă de argon) (similar cu soluția din **RO128190B1**), și apoi fixate paralel cu ținta catod magnetron la o distanță de 35 mm, pentru a împiedica încălzirea substratului la temperaturi mai mari de $100^\circ C$, și deci pentru a induce o condensare rapidă a speciilor gazoase pulverizate.

Filmele de sticlă bio-activă fosfatică au fost preparate la o presiune a gazului de lucru de $\sim 0,9 Pa$ în atmosferă inertă de argon de înaltă puritate (6.0).

Investigațiile microscopice AFM (fig. 1), efectuate cu ajutorul unui echipament sistem NT-MDT NTEGRA Probe NanoLaboratory (cantilever NT-MDT NSG01 cu tip de 10 nm) în modul non-contact, au relevat că filmele de sticlă fosfatică sunt netede (rugozitate $R_{rms} \approx 1$ – $2 nm$), uniforme și prezintă, datorită condițiilor de depunere selectate în cadrul procedurii, porozitate superficială (diametru por ≈ 250 – $600 nm$, adâncime por ≈ 3 – $5 nm$), determinată de (i) reducerea energiei cinetice a *ad*-atomilor ajunși pe suprafața substratului în cazul presiunilor mari de depunere și (ii) desorbției parțiale a P_2O_5 cauzate de căldura de latentă de sublimare mai redusă a acestui oxid, comparativ cu celelalte componente oxidice ale sistemului compozițional de sticlă fosfatică (dacă la presiune atmosferică, aceasta se situează în intervalul 340 – $360^\circ C$, în condiții de neechilibru termodinamic și presiune scăzute este de așteptat ca valoarea căldurii latente de sublimare să fie mult mai redusă).

Compoziția chimică elementală a biomaterialului-sursă și a stratului depus prin pulverizare

DIRECTOR GENERAL INCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU

Semnătură:



în câmp magnetron au fost determinată prin spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDXS), cu ajutorul unei micro-sonde EDAX Inc. atașate unui microscop electronic de baleiaj, operată la o tensiune de accelerare de 15 kV. Măsurătorile au fost realizate pe (cel puțin patru) zone cu o arie de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$, alese aleatoriu pe suprafața probelor analizate. Concentrațiile elementale determinate prin EDXS au fost apoi utilizate pentru calcularea compoziției oxidice a sticlelor. Acestea sunt prezentate ca medie aritmetică \pm abatere medie pătratică în fig. 2. Rezultatele EDXS au pus în evidență bun transfer compozițional a biomaterialului-sursă sub formă de strat depus prin pulverizare în câmp magnetron (în limitele de sensibilitate ale tehnicii de analiză EDXS în cazul filmelor subțiri).

Structura biomaterialului-sursă și a stratului depus prin pulverizare în câmp magnetron a fost evaluată prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR), utilizând un spectrometru Perkin Elmer Spectrum BX II. Spectrele de absorbție IR au fost achiziționate în domeniul de numere de undă $1450 - 660 \text{ cm}^{-1}$, la o rezoluție de 0.4 cm^{-1} . Pulberea utilizată ca țintă catod (fabricată prin metoda răcirii topiturii) și straturile subțiri depuse prin pulverizare în câmp magnetron au prezentat spectre FTIR cu grad înalt de similitudine (fig. 3), care confirmă buna reproducere structurală a biomaterialului-sursă. Spectrele FTIR ale ambelor structuri sunt caracterizate de prezența unor maxime de absorbție IR specifice sticlelor fosfatice, poziționate la următoarele numere de undă: (i) $\sim 1280-1278$, (ii) $\sim 1095-1087$, (iii) $\sim 928-921$ și (v) $\sim 770-750 \text{ cm}^{-1}$, aparținând modurilor de (i) întindere asimetrică (ν_{as}) a legăturilor P-NBO în unitățile structurale $(\text{PO}_2)^-$ intermediare Q^2 , (ii) întindere asimetrică (ν_{as}) a legăturilor P-NBO în unitățile structurale $(\text{PO}_3)^{2-}$ terminale Q^1 , (iv) întindere asimetrică (ν_s) a legăturilor P-O-P în unitățile Q^2 și (v) întindere simetrică (ν_s) a legăturilor P-O-P în unitățile Q^1 și Q^2 [G. Le Saout, P. Simon, F. Fayion, A. Blin, Y. Vailis, Raman and infrared study of $(\text{PbO})_x(\text{P}_2\text{O}_5)_{(1-x)}$ glasses, *J. Raman Spectrosc.* **33** (2002) 740–746). R. Ciceo Lucacel, A.O. Hulpus, V. Simon, I. Ardelean, Structural characterization of phosphate glasses doped with silver, *J. Non-Crystal. Solids* **355** (2009) 425–429].

Testarea aderenței filmelor de sticlă bio-activă fosfatică la substratul metalic a fost realizată prin metoda *pull-off* cu ajutorul unei echipament PATHandy produs de DFD® Instruments, conform metodologiei cuprinse în standardele ASTM-D4541 și ISO4624). Fracturarea a avut loc de fiecare dată la valori de $78.1 \pm 4.7 \text{ MPa}$ în volumul adezivului utilizat pentru fixarea elementelor de testare pe suprafața stratului de sticlă bio-activă fosfatică. Valoarea se situează în zona limitei de rezistență mecanică la tragere a adezivului, declarată de producător [<https://dfdinstruments.com/e900s-heat-curing-epoxy-adhesive/>]. Astfel, putem deduce că aderența stratului de sticlă bio-activă fosfatică

DIRECTOR GENERAL NCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU

Semnătură:



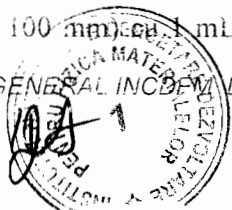
depus pe substratul de titan prin pulverizare în câmp magnetron este mai mare de 78 MPa, valoare care este situată cu mult peste valorile minime de 15 MPa și 50.8 MPa, impuse pentru acoperiri pentru implanturi de cele două norme existente la nivel mondial: ISO13779-2:2018 și respectiv FDA – STP1196 [T.J. Callahan, J.B. Gantenberg, B.E. Sand, 1994. **Calcium phosphate (Ca-P coating) draft guidance for preparation of food and drug administration (FDA) submissions for orthopaedic and dental endosseous implants A.S. 1196, Editor, American Society for Testing and Materials: Philadelphia**].

Testele de citocompatibilitate s-au desfășurat în conformitate cu standardul ISO 10993-5/2009: „*Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*”. Evaluarea citocompatibilității straturilor sacrificiale de sticlă fosfatică s-a realizat prin testarea atât a viabilității (test MTS) și morții celulare (test LDH), cât și a morfologiei celulare (prin marcarea nucleilor și a filamentelor de actină) cu ajutorul microscopiei de fluorescență, utilizând o linie de celule fibroblaste umane (Hs27, ATCC® CRL-1634™).

Testele *in vitro* în culturi de celule fibroblaste umane (Hs27) au arătat că toate straturile de sticlă fosfatică sunt citocompatibile, promovând proliferarea celulară la nivele ușor inferioare controlului biologic, dar superioare substratului nefuncționalizat (fig. 4a). Din punctul de vedere al citotoxicității (fig. 4b), straturile de sticlă fosfatică prezintă nivele de citotoxicitate reduse, similare celor obținute pe controlul biologic. Morfologia celulelor a fost normală în cazul stratului sacrificial de sticlă fosfatică (fig. 4c), celulele fiind bine etalate, prezentând o așezare caracteristică a microfilamentelor de actină și având nucleii celulari de dimensiune normală, fără condensări patologice de cromatină. Se observă numeroase diviziuni celulare (marcate cu săgeți galbene în fig. 4c), o dovadă suplimentară a bunei interacții dintre celulele și filmul de sticlă fosfatică cu Cu și Ga.

Testarea activității antimicrobiene a fost realizată în conformitate cu standardul ISO 22196/2011: „*Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*”, utilizând o tulpină bacteriană Gram-pozitivă *S. aureus* (ATCC® 6538). Suspensii de *S. aureus* în bulion nutritiv (Sanimed) au fost preparate la o concentrație de 10^6 CFU/mL. 25 μ L de bulion nutritiv, conținând 2.5×10^3 CFU viabile au fost depuse pe filmele de bisticlă fosfatică și control. Peste probe a fost așezat un film de plastic inert, steril. Plăcile au fost apoi introduse în incubator. După 6, 12, 24, 48 și 72 de ore, 3 mL de bulion nutritiv au fost adăugați în fiecare godeu și probele au fost raclate complet cu un scrubber de cauciuc steril dedicat pentru a detașa toate celulele bacteriene care ar putea fi încapsulate în biofilm. S-au preparat diluții seriate de 10 pentru fiecare situație studiată, iar din fiecare diluție de probă s-au însămânțat în plăci simple de agar (Sanimed, diametru de 100 mm) cu 1 mL de inocul. După 24 de ore de menținere în incubator coloniile pe

DIRECTOR GENERAL INCDEEM Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnătură:



plăci au fost numărate. Numărul de CFU viabile dezvoltate după 6, 12, 24, 48 și 72 de ore în prezența straturilor sacrificiale de sticlă fosfatică și a controlului au fost calculate cu formula: $3 \times \text{diluția} \times (\text{numărul mediu de colonii din placă})$.

Rezultatele testelor antibacteriene sunt sumarizate în fig. 5. S-a constatat că la 6 ore de la însămânțare numărul bacteriilor rămase viabile este același cu cel inițial pentru toate straturile sacrificiale indiferent de grosimea acestora, în timp ce în mediul nutritiv și pe substratul nefuncționalizat, bacteriile intră în faza exponențială de proliferare. Începând cu 12 ore, numărul bacteriilor viabile începe să scadă (de 2 – 3 ori), fiind sugerată depășirea capacității de adaptare a bacteriilor la acțiunea ionilor terapeutici eliberați. Începând cu 24 de ore se constată o diferență marcantă privind supraviețuirea bacteriană pe stratul sacrificial de ~100 nm față de cele de ~500 – 1000 nm, procesul morții bacteriene fiind accelerat ca urmare a eliberării unei cantități mai mari de ioni prin dizolvarea straturilor mai groase. Efectul se amplifică la 48 de ore, menținându-se și la 72 de ore. În mediul nutritiv (proba control) și pe substratul nefuncționalizat, proliferarea bacteriană prezintă o evoluție exponențială până la 48 de ore, la 72 de ore atingându-se un platou. În cazul straturilor sacrificiale de sticlă fosfatică cu grosime de ~100 și ~500 – 1000 nm reducerea dezvoltării bacteriene la 48 de ore este față de însămânțare cu de unul și respectiv două ordine de mărime, iar față de mediul nutritiv și substratul nefuncționalizate cu patru și respectiv șase ordine de mărime. Rezultatele demonstrează că durata și intensitatea efectului antimicrobian poate fi controlată prin grosimea de strat sacrificial depus pe suprafața implantului.

Astfel, invenția arată că straturi subțiri sacrificiale bioresorbabile de sticlă bio-activă fosfatică cu porozitate superficială și compoziție și structură similară biomaterialului-sursă, aderență excelentă la substrat, citocompatibile și cu eficacitate antimicrobiană, pot fi fabricate cu succes prin pulverizare în câmp magnetron în regim de radio-frecvență. Aceste acoperiri pentru implanturi endosoase vor reduce riscul infecțiilor post-chirurgicale la situl de implantare. Durata și intensitatea efectului antimicrobian poate fi controlată facil din grosimea de strat subțire depus pe suprafața implantului.

DIRECTOR GENERAL INGDEM, Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnătura:



Revendicare:

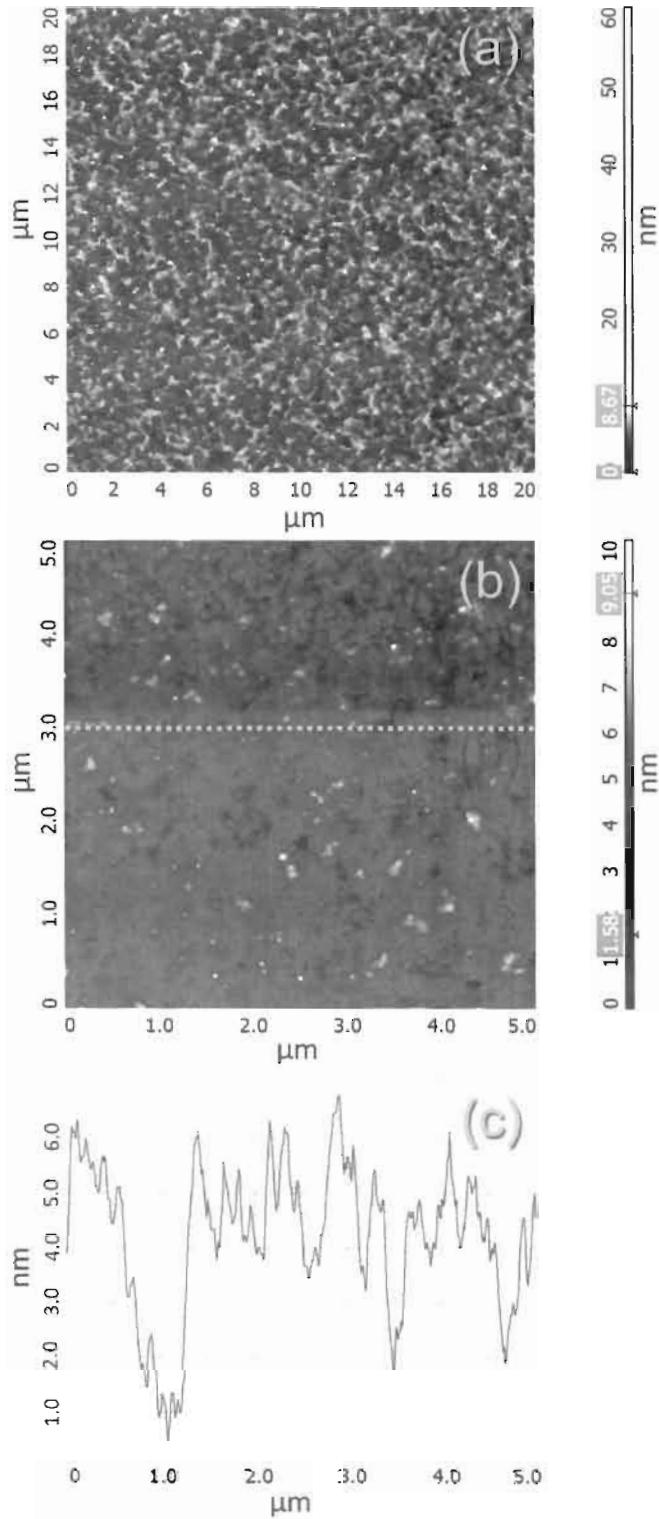
Procedeu de realizare a unui implant endoosos cu acoperire sacrificială din sticlă bio-activă fosfatică resorbabilă și antimicrobiană, care constă în depunerea unor straturi vitroase pe suprafață implantului, prin pulverizare în câmp magnetron în regim de radio-frecvență, sub formă de filme subțiri cu grosime minimă de 100 nm, continue, poroase, uniforme, aderente, și cu compoziția și structura unui biomaterial-sursă ales din familia compozițională $P_2O_5-CaO-Na_2O-Fe_2O_3$, **caracterizat prin aceea că**, pentru degradarea eficace concentrația de Na_2O poate fi variată în intervalul 5–15 mol.%, și pentru efectul antimicrobian mai conține CuO și Ga_2O_3 (2–4 mol%), iar depunerea straturilor subțiri are loc la o presiune de argon de înaltă puritate situată în domeniul 0,8–1,0 Pa, distanță de separare țintă–substrat de 35 mm și temperatură de depunere mai mică de 100°C, și intensitatea și durata efectului antibacterian poate fi controlată prin grosimea de strat depus.

DIRECTOR GENERAL INCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnatura



Figuri:

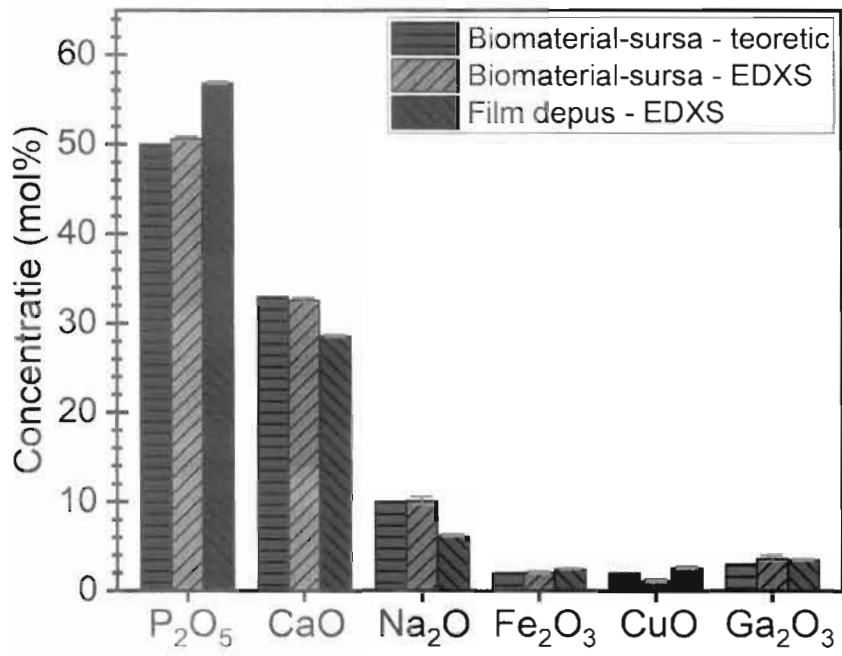
Fig. 1



DIRECȚIA GENERALĂ A GDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnă



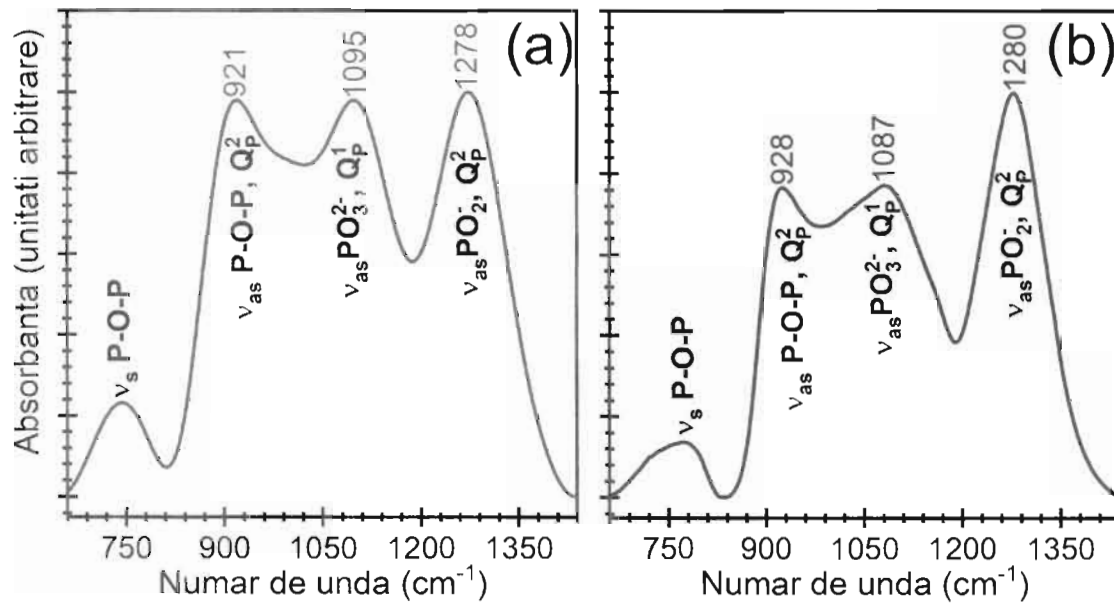
Fig. 2



DIRECTOR GENERAL INCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnatura: 



Fig. 3



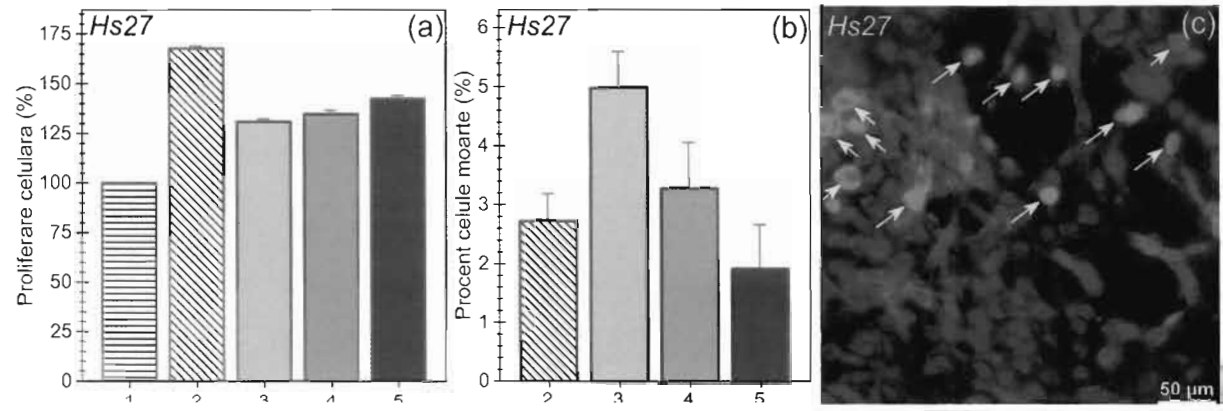
DIRECTOR GENERAL INCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU

Semnătura:



15

Fig. 4

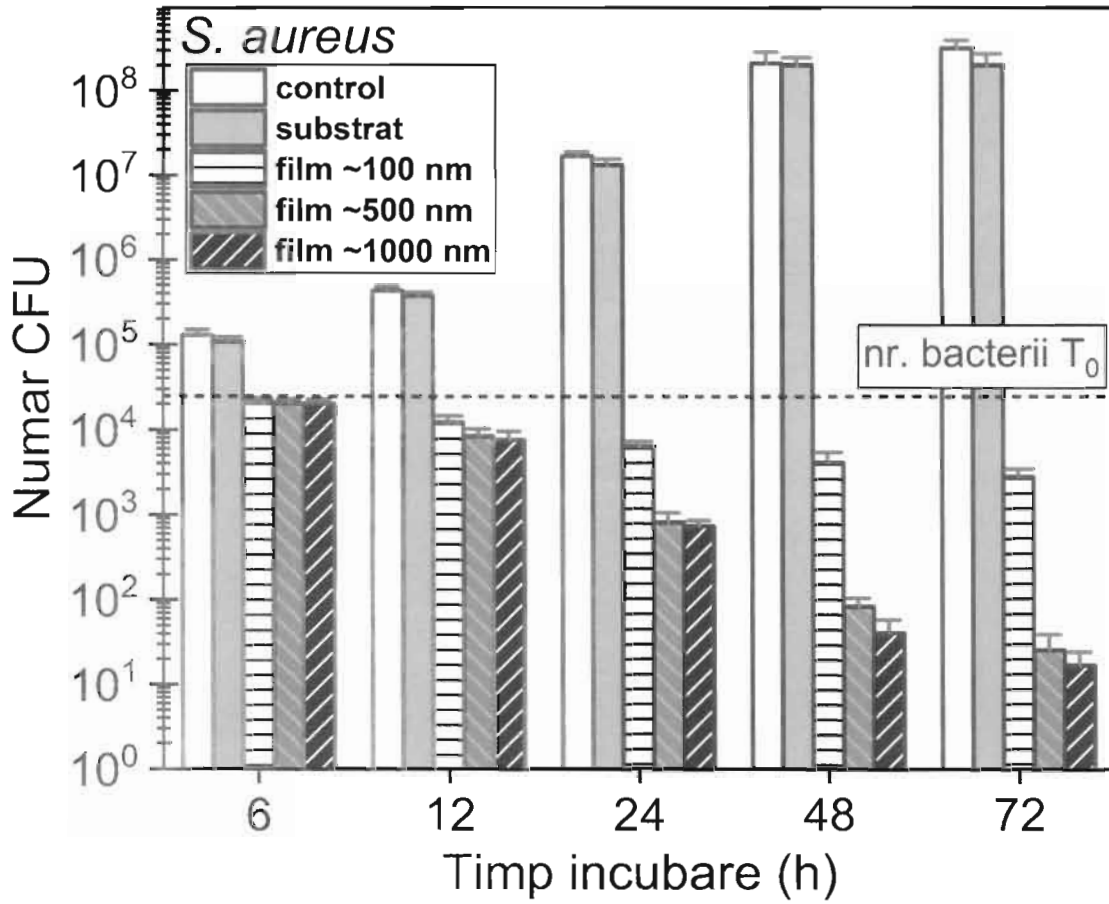


DIRECTOR GENERAL INCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU

Semnătura:



Fig. 5



DIRECTOR GENERAL INCDFM, Dr. Ionuț ENCULESCU
Semnătura:

