



A61L 27/10 (2006.01);
A61F 2/28 (2006.01);
C23C 14/10 (2006.01);
C23C 14/35 (2006.01);
C03C 8/08 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00633**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2022** BOPI nr. **9/2022**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**DE 4006379 A1; B. SRUART, G. STAN, C.
GRANT, D. GRANT, "GALLIUM
INCORPORATION INTO PHOSPHATE
BASED GLASSES: BULK AND THIN FILM
PROPERTIES", JOURNAL OF THE
MECHANICAL BEHAVIOR OF MEDICAL
MATERIALS, 2018**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI IMPLANT ENDOOSOS
CU ACOPERIRE DIN STRATURI DE STICLĂ BIO-ACTIVĂ
FOSFATICĂ CONTINUE, POROASE, RESORBABILE
ȘI CU EFECT ANTIMICROBIAN**



RO 134819 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui implant endoosos cu
2 acoperire sacrificială din straturi de sticlă bio-activă fosfatică, poroase, resorbabile și cu efect
3 antimicrobian.

4 Din punct de vedere medical am intrat „era post-antibiotică”
5 [<https://www.mature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-l.15135>],
6 deoarece au fost deja identificate primele tulpini bacteriene rezistente la toate antibioticele
7 din domeniul medicinei umane și veterinare [**A. J. Alanis, Resistance to antibiotics: are
8 we in the post-aetibiotic era Arch. Med. Res. 36 (2005) 697-705**]. Situația actuală a fost
9 provocată de tratamente insuficiente care au permis tulpinilor bacteriene să dobândească
10 rezistență la antibiotice prin intermediul de mutații ale genomului lor [**N. Woodford, M.J.
11 EUington, The emergence of antibiotic resistance by mutation, Clin. Microbiol. Infect.
12 13 (2007) 5-18**], **U. Ndagi, A.A. Faiaki, M. Abdullahi, M.M. Lawal, M.E. Soliman,
13 Antibiotic resistance: bioinformatics-based understanding as a funcțional strategy for
14 drug design, RSC Adv. 10 (2020) 18451-18468**]. Rezistența la tratament are însă mai
15 puține șanse să apară atunci când sunt utilizate combinații de agenți antimicrobieni
16 cu efecte sinergice ce prezintă mecanisme de acțiune diferite.

17 Soluții alternative sunt căutate cu precădere în domeniul implantologiei osoase
18 deoarece traumatismele temporare asociate procedurilor chirurgicale pot slăbi răspunsul
19 imun local al corpului uman și permite bacteriilor să adere și să prolifereze la situl implantării.
20 De exemplu, UK National Joint Registry a raportat ca infecțiile la situl de implantare au
21 reprezentat cauza de eșec pentru ~14,8% dintre protezele endoosoase de șold care au
22 necesitat operații de revizie [[https:// reports.urcentre.org.Uk/ Portals/0/ PDFdownloads/
23 NJR%2017th%20Annual%20Rep ort%202020.pdf](https://reports.urcentre.org.Uk/Portals/0/PDFdownloads/NJR%2017th%20Annual%20Report%202020.pdf)], în pofida realizării de tratamente post-
24 chirurgicale locale cu antibiotice convenționale.

25 Proprietățile antimicrobiene devin și mai stringente în cazul implanturilor dentare, spre
26 deosebire de cele ortopedice, deoarece în cadrul procedurile chirurgicale stomatologice nu
27 se pot obține condiții aseptice. Sterilitatea sitului chirurgical, aflat în cavitatea bucală, care
28 conține în mod normal până la 700 de tulpini de bacterii [**P.N. Deo, R. Deshmukh, Oral
29 microbiome: Unveiling the fundamentals, J. Oral. Maxillofac. Pathol. 23 (2019)
30 122-128**], este împiedicată de infiltrarea salivei, conducând la contaminarea locală în zona
31 de implantare.

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

38 În prezent sunt cercetate la nivel mondial cu precădere acoperirile pentru implanturi
39 pe bază de hidroxiapatită [**J. Cisek, V. Brozek, T. Chraska, F. Lukac, J. Medricky, R.
40 Musalek, et al., Silver-doped hydroxyapatite coatings deposited by suspension plasma
41 spraying, J. Therm. Spray Tecfamol 27 (2018) 1333-1343**], **D. Predoi, S.L. Iconaru, M.V.
42 Predoi, N. Buton, M. Moteliea-Heino, Zinc doped hydroxyapatite thin films prepared by
43 sol-gel spin coating procedure, Coatings 9 (2019) 156**], **Y. Huang, X. Zhang, H. Mao, T.
44 Li, R. Zhao, Y. Yan, X. Pang, OsteoMastie cell responses and antibacterial efficacy of
45 Cu/Zn co-substituted hydroxyapatite coatings on pure titanium using
46 electrodeposition method, RSC Adv. 5 (2015) 17076-17086**] sau de sticlă bio-activă
47 silicatică [**J.V. Rau, M. Curcio, M.G. Raucchi, K. Barbaro, I. Fasolino, R. Teghil, L.**

Ambrosio, A. De Bonis, A.R. Boccaccini, <i>Cu-releasing bioactive glass coatings and their in vitro properties</i>, ACS Appl. Mater. Interfaces 11 (2019) 5812-5820] aditivare 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.	1 3 5
De asemenea, diverse metode de obținere de acoperiri pentru implanturi au fost propuse în brevete. Astfel, US 4234972 A 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). US 20110045052 A1 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 umede depunere electroforetică sau depunere prin pulverizare termică în flacără sau plasmă, fără însă a le fabrica la nivel demonstrativ și evalua. RO 130068 B1 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. RO 132595 B1 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).	7 9 11 13 15 17 19 21 23
Dacă în cazul sticlelor bio-active silicatică 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-active silicatică, 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.	25 27 29
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. Icdiske, A.G. Felts, J.B. Slunt, D.W. Grainger, <i>Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies</i>, J. Biomed. Mater. Res. 60, (2020), 206-215].	31 33 35
Sticlele bio-activă 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, <i>Phosphate based glasses for biomedical applicu.ion</i>, J. Mater. Chem 13 (2003) 2395-2401]. Producții de degradare a multor sisteme de sticle fosfatice sunt ușor metabolizați, fără inducerea de complicații, așa cum au arătat studii <i>in vivo</i> pe model animal [E.A. Abou Neei, V. Salih, J.C. Knowles, <i>Phosphate-based glasses</i>, in: Compr. Biomater., Elsevrrar, 2011: pp. 285-297].	37 39 41 43
Un brevet a fost identificat în literatura de specialitate. US 8080490 B2 descrie realizarea unui sistem compozițional de sticlă fosfatică din sistemul compozițional $\text{P}_2\text{O}_5\text{-SO}_3\text{-B}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-N}_2\text{O-CaO-MgO-SrO-BaO-ZnO-Ag}_2\text{O-CuO-GeO}_2\text{-TeO}_2\text{-Cr}_2\text{O}_3$, însă cu aplicabilitate restrânsă doar în domeniul tratamentului de uz extern al rănilor deschise - plasture imbibat cu pulbere de sticlă care eliberează ioni cu efect antibacterian.	45 47 49

1 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
3 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*
5 *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,
7 *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,
9 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-
11 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.
13 *Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 82, (2018), 317-382]. Proprietățile bio-funcționale ale
acestor acoperiri nu au fost însă demonstrate până în prezent.

15 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția, o reprezintă obținerea de straturi
sacrificiale pe bază de sticlă bio-activă fosfatică cu efect antimicrobian extins.

17 Procedeu de realizare a unui implant endoosos cu acoperire sacrificială din sticlă bio-
activă fosfatică resorbabilă și antimicrobiană înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea
19 că are loc are loc 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
21 CaO și respectiv Fe_2O_3 , presată într-un suport port-țintă metalic, pentru depunerea de filme
subțiri cu grosime minimă de 100 nm, pentru degradarea eficace concentrația de Na_2O poate
23 fi variată în intervalul 5...15 mol.%, cu o bună replicare compozițională și structurală a bioma-
terialului-sursă printr-un proces de pulverizare în câmp magnetron în regim de radio-
25 frecvență în atmosferă inertă de argon, operat la o presiune a gazului de lucru cuprinsă în
intervalul 0,8...1,0 Pa, distanță țintă-substrat de 35 mm și temperatură de depunere menți-
27 nută sub 100°C.

Extinderea plajei de acțiune antimicrobiană a sticlelor bio-active fosfatice, și implicit
29 a acoperirilor pentru implanturi derivate din acestea, poate fi asigurată prin încorporarea
simultană a doi agenți oxidici antimicrobieni cu acțiune singergică: CuO și Ga_2O_3 în con-
31 concentrații de 2...4 mol%. Ionii de cupru sunt capabili să combată dezvoltarea tulpinilor bacte-
riene *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella enterica*,
33 *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*
35 *multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and*
antibacterial activity, Biomaterials 34, (2013), 422-433), M. Miola, E. Verné, *Bioactive*
37 *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-
39 Regí, G. Bruni, A. Torres-Pardo, J.M. González-Calbet, L. Visai, C. Vitale-Brovaroni, C,
Cooper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent
41 *for bone regeneration*, Acta Biomater. 55 (2017) 493-504), J.V. Rau, M. Curcio, M. G.
Raucci. K. Barbaro, I. Fasolino, R. Teghil, L. Ambrosio, A. De Bonis, A.R. Boccaccini,
43 *Cu-releasing bioactive glass coatings and their in vitro properties*, ACS Appl. Mater.
Interfaces 11 (2019) 5812-5820), T.M. Gross, J. Lahiri, A. Golaș, J. Luo, F. Verrier, J.L.
45 Kurzejewski, D.E. Baker, J. Wang, P.F. Novak, M.J. Snyder, *Copper-containing glass*
ceramic with faigfa antimicrobial efficacy, Nat. Commun. 10 (2019) 1979], în timp ce ionii
47 de galiu pe cea a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* metilino-rezistent dar și a

Clostridium difficile și [S.P. Valappil, D. Ready, E.A. Abou Neel, D.M. Pickup, W. Chrzanowski, L.A. O'Delí, 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 țintă-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;

- prezența în compoziția acoperirilor de sticlă bio-activă fosfatică atât a CuO cât și a Ga_2O_3 așteptat să determine o plajă extinsă de acțiune antimicrobiană, în timp ce produșii 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 fig. 1...5, care reprezintă:

- fig. 1, morfologia suprafeței unei acoperiri de sticlă bio-activă fosfatică evidențiată prin microscopie de forță atomică pe arii de: (a) 20 x 20 μm^2 și (b) 5 x 5 μm^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 baza 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;

RO 134819 B1

1 - 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;
3 (2) control biologic - policarbonat; (3) substrat nefuncționalizat și funcționalizat cu strat sacrificial de sticlă bio-activă fosfatică cu grosime de (4) ~ 500 nm și (5) ~ 1000 nm.
5 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
7 nucleii contracolorați cu albastru (DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole). Obiectiv microscop: 40x;

9 - fig. 5, diagrama activității antibacteriene a straturilor sacrificiale de sticlă bio-activă fosfatică (cu grosimi diferite, ie., ~ 100, ~ 500 și ~ 1000 nm) împotriva tulpinei bacteriene
11 Gram-pozitive *Staphylococcus aureus*, comparativ cu controlul (mediul nutritiv fără probă) și substratul nefuncționalizat.

13 Fără a limita în vreun fel aria invenției, este prezentat în continuare un exemplu de realizare a invenției, însoțit de:

15 - (i) demonstrația fabricării de straturi sacrificiale de sticlă bio-activă fosfatică continue, uniforme și poroase prin metoda pulverizării în câmp magnetron în regim de
17 radiofrecvență dintr-o țintă de pulbere de sticlă bio-activă fosfatică cu compoziția (în mol%) P_2O_5 -50, CaO-33, Na_2O -10, Fe_2O_3 -2, CuO_2 , Ga_2O_3 -3, și

19 - (ii) probării controlului asupra duratei și intensității efectului antimicrobian prin grosimea de strat depus.

21 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 radiofrecvență (1,78 MHz) Vacma, model UVN-75R1.

23 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 **RO 130068 B1**). 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°C timp de 30 min pentru deshidratare, și apoi topit în condiții ambientale într-un creuzet de Pt-Rh 90:10% la 1200°C timp de 2 h. 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 μm), pretabile presării, sticla a fost măcinată cu ajutorul unei mori cu bile de agat la o viteză de 600 rot/min, timp de 15 min.

35 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 **RO 128190 B1**), 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°C, și deci pentru a induce o condensare rapidă a speciilor gazoase pulverizate.

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

41 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°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 în câmp magnetron au fost determinate 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 x 150 μm², alese aleatoriu pe suprafața probeelor analizate. Concentrațiile elementale determinate prin EDXS au fost apoi utilizate pentru calcularea compoziției oxidice a sticlelor. Acestea sunt prezentate ca medie aritmetică ± 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 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) ~ 1280-1278, (ii) ~ 1095-1087, (iii) ~ 928-921 și (v) ~ 770-750 cm⁻¹, aparținând modurilor de (i) întindere asimetrică (ν_{as}) a legăturilor P-NBO în unitățile structurale (PO₂)⁻ intermediare Q², (ii) întindere asimetrică (ν_{as}) a legăturilor P-NBO în unitățile structurale (PO₃)²⁻ terminale Q¹, (iv) întindere asimetrică (ν_s) a legăturilor P-O-P în unitățile Q² și (v) întindere simetrică (ν_s) a legăturilor P-O-P în unitățile Q¹ și Q² [G. Le Saout, P. Simon, F. Fayion, A. Blin, Y. Vaills, *Raman and infrared study of (PbO)_x(P2O₅)_(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 ± 4,7 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 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].

RO 134819 B1

1 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*
3 *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
5 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™).

7 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
9 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
11 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,
13 prezentând o așezare caracteristică a microfilamentelor de actină și având nucleii celulari
de dimensiune normală, fără condensări patologice de cromatină. Se observă numeroase
15 diviziuni celulare (marcate cu săgeți galbene în fig. 4c), o dovadă suplimentară a bune
interacții dintre celulele și filmul de sticlă fosfatică cu Cu și Ga.

17 Testarea activității antimicrobiene a fost realizată în conformitate cu standardul ISO
22196/2011: “*Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous*
19 *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.
21 25 μ L de bulion nutritiv, conținând $2,5 \times 10^3$ CFU viabile au fost depuse pe filmele de bio-
sticlă fosfatică și de control. Peste probe a fost așezat un film de plastic inert, steril. Plăcile
23 au fost apoi introduse în incubator. După 6, 12, 24, 48 și 72 h, 3 ml de bulion nutritiv au fost
adăugați în fiecare godeu și probele au fost raclate complet cu un scrubler de cauciuc steril
25 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
27 s-au însămânțat în plăci simple de agar (Sanimed, diametru de 100 mm) cu 1 ml de inocul.
După 24 h de menținere în incubator, coloniile pe plăci au fost numărate. Numărul de CFU
29 viabile dezvoltate după 6, 12, 24, 48 și 72 h în prezența straturilor sacrificiale de sticlă
fosfatică și a controlului au fost calculate cu formula: $3 \times \text{diluția} \times (\text{numărul mediu de colonii}$
31 $\text{din placă})$.

Rezultatele testelor antibacteriene sunt sumarizate în fig. 5. S-a constatat că la 6 h
33 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
35 substratul nefuncționalizat, bacteriile intră în faza exponențială de proliferare. Începând cu
12 h, numărul bacteriilor viabile începe să scadă (de 2-3 ori), fiind sugerată depășirea
37 capacității de adaptare a bacteriilor la acțiunea ionilor terapeutici eliberați. Începând cu 24 h
se constată o diferență marcantă privind supraviețuirea bacteriană pe stratul sacrificial de
39 ~ 100 nm față de cele de $\sim 500-1000$ nm, procesul morții bacteriene fiind accelerat ca
urmare a eliberării unei cantități mai mari de ioni prin dizolvarea straturilor mai groase.
41 Efectul se amplifică la 48 h, menținându-se și la 72 h. În mediul nutritiv (proba control) și pe
substratul nefuncționalizat, proliferarea bacteriană prezintă o evoluție exponențială până la
43 48 h, la 72 h atingându-se un platou. În cazul straturilor sacrificiale de sticlă fosfatică cu
grosime de ~ 100 și $\sim 500-1000$ nm reducerea dezvoltării bacteriene la 48 h este față de
45 însămânțare cu unul și respectiv două ordine de mărime, iar față de mediul nutritiv și
substratul nefuncționalizat cu patru și respectiv șase ordine de mărime. Rezultatele demon-
47 strează că durata și intensitatea efectului antimicrobian poate fi controlată prin grosimea de
strat sacrificial depus pe suprafața implantului.

RO 134819 B1

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 endoosoase 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.

RO 134819 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a unui implant endoosos cu acoperire sacrificială din straturi din sticlă bio-activă fosfatică continue, uniforme, poroase, resorbabile și cu efect anti-microbian, **caracterizat prin aceea că**, are loc 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 , pentru degradarea eficace concentrația de Na_2O poate fi variată în intervalul 5...15 mol.%, presarea țintei 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 țintă-substrat de 35 mm și temperatură de depunere menținută sub 100°C.

5

7

9

11

13

(51) Int.Cl.

A61L 27/10 (2006.01);

A61F 2/28 (2006.01);

C23C 14/10 (2006.01);

C23C 14/35 (2006.01);

C03C 8/08 (2006.01)

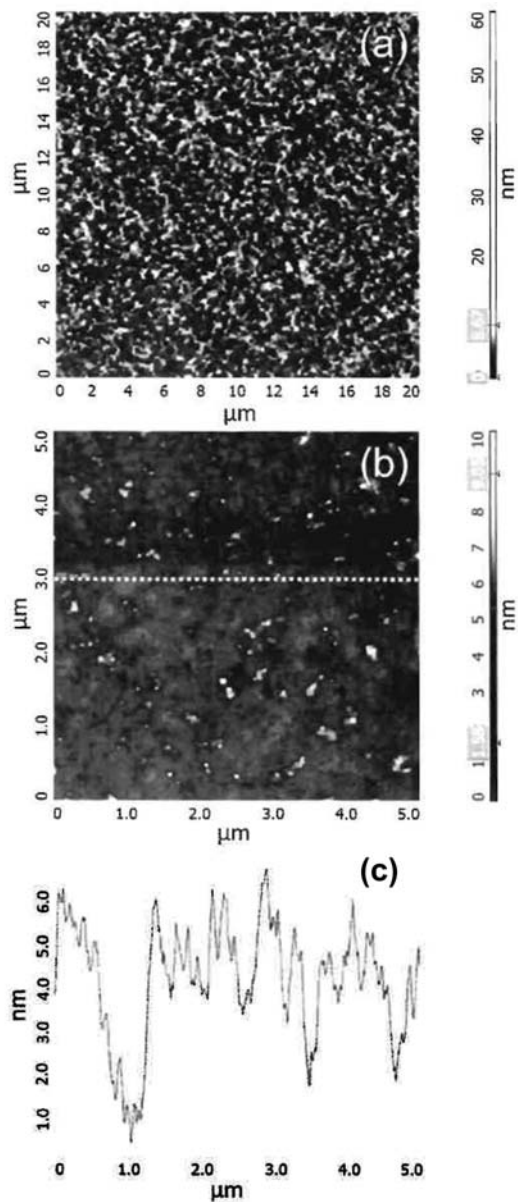


Fig. 1

(51) Int.Cl.

A61L 27/10 (2006.01);

A61F 2/28 (2006.01);

C23C 14/10 (2006.01);

C23C 14/35 (2006.01);

C03C 8/08 (2006.01)

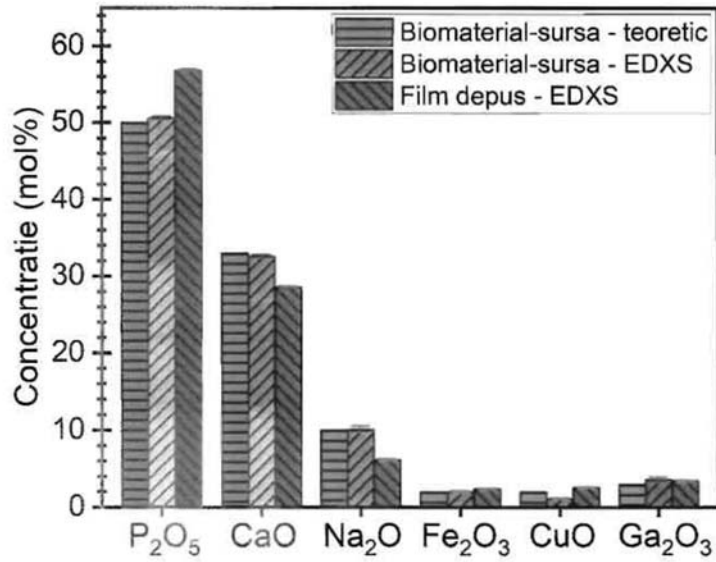


Fig. 2

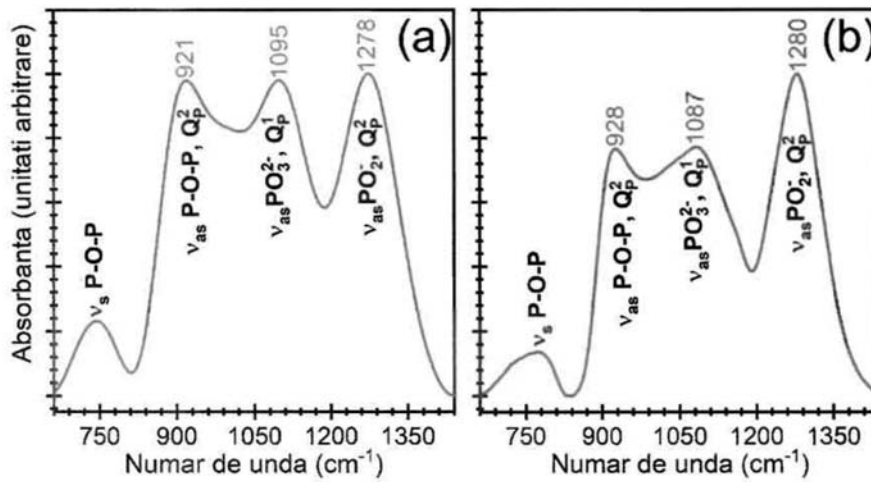


Fig. 3

(51) Int.Cl.

A61L 27/10 (2006.01);
A61F 2/28 (2006.01);
C23C 14/10 (2006.01);
C23C 14/35 (2006.01);
C03C 8/08 (2006.01)

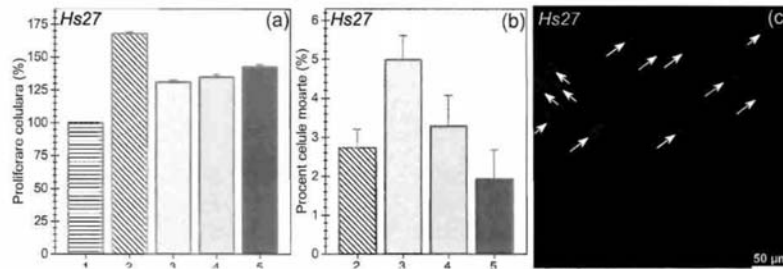


Fig. 4

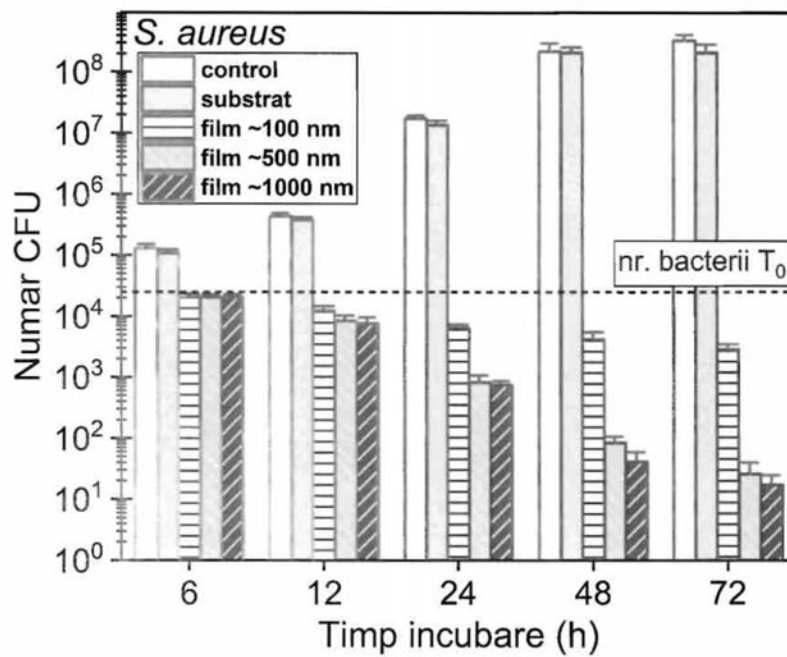


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 436/2022