



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00238**

(22) Data de depozit: **10/05/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2021 BOPI nr. **9/2021**

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

(72) Inventatori:
• **PREDOI DANIELA, CALEA PLEVNEI
NR.94, BL.10D2, SC.1, ET.4, AP.12,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ICONARU SIMONA-LILIANA,
STR.MAIOR ION PORUMBARU, NR.52,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CIOBANU STELUȚA CARMEN,
DRUMUL VALEA CRICOVULUI, NR.13-19,
BL.A, SC.1, ET.P, AP.3, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA STRATURILOR SUBȚIRI
DE HIDROXIAPATITĂ DOPATĂ CU MAGNEZIU ÎNTR-O
MATRICE DE CHITOSAN OBȚINUTE PRIN TEHNICA
DE ACOPERIRE PRIN IMERSIE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei acoperiri de hidroxiapatită dopată cu magneziu într-o matrice de chitosan (MgHAp-CTS)cu aplicații biomedicale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: sinteză a suspensiei de Mg HAp-CTS prin metoda de co-precipitare la temperatura camerei folosind azotat de calciu tetrahidrat, azotat de magneziu hexahidrat, etanol absolut și apă distilată, adăugarea soluției prin picurare într-o soluție de fosfat acid de amoniu și chitosan, adăugarea de hidroxid de amoniu și menținerea pH-ului soluției la valoarea 11, agitarea suspensiei de

MgHAp-CTS timp de 24 h la temperatura de 100°C, urmată de depunerea prin imersie, pe un suport de sticlă a 3 straturi succesive de acoperire, fiecare strat fiind uscat la 80°C timp de 4 h, tratament termic la 500°C timp de 1 h și răcire cu o viteză de 5°C/m, din care rezultă un strat de acoperire cu distribuție uniformă și omogenă a elementelor constituente: Ca, P, Mg, O, cu proprietăți biologice semnificativ îmbunătățite.

Revendicări: 4
Figuri: 8



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 pp 238
Data depozit 10-05-2021

57

**OBTINEREA SI CARACTERIZAREA STRATURILOR SUBTIRI DE
HIDROXIAPATITA DOPATA CU MAGNEZIU INTR-O MATRICE DE CHITOSAN
OBTINUTE PRIN TEHNICA DE ACOPERIRE PRIN IMERSIE**

Prezentul brevet se refera la obtinerea si caracterizarea straturilor de hidroxiapatita dopata cu magneziu intr-o matrice de chitosan printr-o procedura de acoperire prin imersie. Suspensia de hidroxiapatita dopata cu magneziu intr-o matrice de chitosan pentru realizarea straturilor a fost obtinuta folosind o metoda de co-precipitare adaptata. Pentru a dezvolta materiale bioceramice cu proprietati mecanice, fizico-chimice si biologice imbunatatite s-au depus eforturi sustinute in scopul folosirii acestora in aplicatii biomedicale [1-5]. Mai mult, un efort continuu se desfasoara la scara globala pentru realizarea de noi materiale, cum ar fi dezvoltarea de inlocuitori ai oaselor care sa aiba proprietatile fizico-chimice si structurale ale oaselor naturale [6] si care sa conduca la folosirea acestora in diferite aplicatii ortopedice sau dentare scazand riscul infectiilor postoperatorii. Cunoscut fiind faptul ca sarurile minerale din compozitia osului sunt reprezentate de fosfatul de calciu (CaPO_4) iar hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) este cea mai importanta substanta cristalina, hidroxiapatita, (HAp), a fost folosita des in aplicatii medicale in ciuda existentei unor diferente importante intre structura osului si HAp dezvoltata in laborator [7]. Astfel, in scopul de a imbunati proprietati ale HAp cum ar fi: osteoconductivitatea, osteointegrarea, proprietatile mecanice, eficienta implantului si proprietatile antimicrobiene [8-9], in ultimii ani au fost introdusi in structura HAp o serie de ioni precum F^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Ce^{3+} , Eu^{3+} , Sm^{3+} [10-18]. Printre diferitii ioni metalici care pot fi folositi ca dopanti in structura HAp cei mai studiatii sunt Ag^+ , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} pentru capacitatea lor de a conferi HAp proprietati biologice mai inalte precum: osteoconductivitatea, osteogenicitatea, angiogenitatea impreuna cu proprietati mecanice imbunatatite. In particular magneziul este considerat a fi un excelent ion substituent in mare parte si datorita faptului ca este considerat a fi cel de-al patrulea element ca abundenta in organismul uman cu un raport intre 0.44 si 1.23 greutate% iar in oase este gasit intr-o proportie de 0.72% greutate % [17,18]. In plus magneziul este un element esential care se afla in orice fiinta vie si mai mult de 100 de enzime isi conditioneaza reactiile catalitice de prezenta ionilor de magneziu.

Director General INCDFM

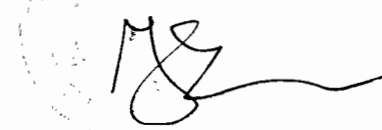
Dr. Ionut Marius Enculescu



In plus, un deficit de magneziu induce afectiuni ale scheletului o scadere a activitatii osteoblaste si osteoclastice si este responsabil de aparitia unor afectiuni ca osteopenia si fragilitatea osoasa [3,19]. Iata, de ce, folosirea ca dopant pentru HAp a ionilor de Mg constituie o dezvoltare a unui nou material cu proprietati biologice semnificativ imbunatatite (osteogenice, osteoconductive, antimicrobiene) precum si cu proprietati mecanice care au o influenta explicita asupra metabolismului mineral, asupra proceselor de dizolvare a cristalelor si asupra proceselor de biodegradare [19-20]. In plus, datorita faptului ca magneziu a fost raportat ca prezentand proprietati osteogenice si angiogenice imbunatatite, folosirea hidroxiapatitei dopate cu Mg a fost extinsa in obtinerea acoperirilor biologice pentru implanturile dentare si ortopedice [8, 21]. Pe de alta parte, chitosanul este o polizaharida cu proprietati antimicrobiene dovedite fiind larg folosita in agricultura, vinificatie (pentru a preveni alterarea vinului), in filtrarea apei dar si in medicina pentru proprietatile lui antihemostatice si antimicrobiene. Metoda de obtinere a hidroxiapatitei dopate cu magneziu ($\text{Ca}_{25-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) intr-o matrice de chitosan in suspensie unde $x_{\text{Mg}}=0.25$ a condus la o buna stabilitate si omogenitate a suspensiei ceea ce a permis realizarea de acoperiri omogene cu proprietati antimicrobiene. Hidroxipatita dopata cu magneziu intr-o matrice de chitosan a fost sintetizata folosind: azotat de calciu tetrahidrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, fosfat acid de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, azotat de magneziu hexahidrat $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, hidroxid de amoniu NH_4OH , chitosan, etanol absolut si apa bidistilata. Pentru a obtine suspensia de hidroxiapatita dopate cu magneziu intr-o matrice de chitosan MgHAp-CTS s-a folosit o metoda de co-precipitare adaptata [22], sinteza avand loc la temperatura camerei. Cantitatea de magneziu a fost $x_{\text{Mg}}=0.25$, iar rapoartele molare Ca/P si $(\text{Ca}+\text{Mg})/\text{P}$ au fost egale cu 1.67. Solutia obtinuta prin dizolvarea $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ si $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in etanol a fost adaugata prin picurare intr-o solutie de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ si chitosan (3%). Prin adaugarea de NH_4OH , pH-ul solutiei a fost mentinut constant la valoarea de 11 tot timpul procesului de sinteza. Solutia finala notata ca MgHAp-CTS a fost agitata pentru 24 ore la 100°C inainte de a obtine acoperirile. Straturile subtiri de MgHAp-CTS au fost preparate prin metoda de acoperire prin imersie pe suporti de sticla. In acest sens, suportii de sticla au fost pregatiti prin spalare cu apa deionizata. Acoperirile s-au realizat in conditii de presiune si umiditate atmosferica normale.

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



Evaporarea solventului a fost controlata de conditiile atmosferice. Evaporarea solventului a condus la un process de gelatinare si la formarea unui film transparent. Au fost depuse trei straturi succesive de MgHAp-CTS pe substrat de sticla. Fiecare strat a fost uscat la 80°C pentru 4 ore. In final, a fost realizat un tratament termic la 500°C pentru o ora. Racirea a fost facuta la o viteza de 5 °C/min. Calitatea si proprietatile straturilor subtiri astfel obtinute au fost investigate prin analiza principalelor caracteristici fizico chimice si biologice. Astfel au fost folosite metode de analiza precum: microscopia electronica de transmisie (MET), spectroscopia de fotoelectroni de raze X (XPS), microscopia electronica de baleiaj (MEB), microscopia de forta atomica (AFM), microscopia optica, estimarea activitatii antimicrobiene fata de tulpinile microbiene *S.aureus*, *E. coli* si *C. albicans*. Estimarea proliferarii celulare si a viabilitatii a fost facuta prin testul MTT. Analiza citotoxicitatii *in vitro* a fost facuta folosind linia de celule osteoblaste fetale umane. Analiza suprafetei stratului de MgHAp-CTS depus pe sticla indica o suprafata omogena dupa cum se poate observa in Figura 1(a) din imaginea de microscopie electronica de baleiaj (MEB). In Figurile 1b-e se prezinta distributia elementelor realizata prin spectroscopia tip EDS. Se poate observa ca elementele prezente au fost Ca, P, O si Mg. Imaginea de cartografiere a suprafetei filmului subtire arata ca toate elementele constituinte sunt distribuite uniform, suprapunerea lor fiind prezentata in Figura 1f. Reprezentarea 3D prezentata in Figura 2 a topografiei suprafetei, demonstreaza formarea unui strat uniform fara fisuri sau alte imperfectiuni. De asemenea in Figura 2 este ilustrata clar distributia uniforma si omogena a elementelor constituinte Ca, P, Mg, O. Morfologia filmelor subtiri de MgHAp-CTS analizata prin topografia AFM este prezentata in Figura 3 unde atat imaginea 2D cat si reprezentarea 3D arata ca suprafata stratului subtire are o structura uniforma, fara fisuri sau rupturi in strat. In plus, rezultatele AFM evidentiaza ca topografia suprafetei pentru straturile de MgHAp-CTS este omogena cu o rugozitate avand valoarea $R_{RMS} = 52.25$ nm.

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



Morfologia straturilor depuse a fost analizata, de asemenea, folosind microscopia optica si metalografica. Imaginea optica a suprafetei stratului depus este prezentata atat 2D cat si 3D in Figura 4 indicand ca depunerea realizata prin tehnica descrisa este uniforma fara fisuri sau rupturi vizibile, respectiv discontinuitati in strat. Informatii complementare privind morfologia de suprafata a straturilor subtiri au fost obtinute folosind microscopia metalografica dupa cum este prezentat in Figura 5 atat in reprezentare 2D cat si 3D. Aceste reprezentari au confirmat ca acoperirile au o morfologie uniforma, sunt omogene si continue fara rupturi sau fisuri. Analiza XPS a straturilor a fost realizata cu radiatie monocromatica Al K_{α} ($h\nu=1486.6$ eV) la o presiune in camera de analiza de $p\sim 3\cdot 10^{-9}$ torr, cu o fereastră de energie $w=20$ eV la o rezolutie $R=20$ eV si inregistrand 400 de canale, procesarea datelor facandu-se folosind Spectral Data Processor v 2.3 (SDP) [22]. In Figura 6 se prezinta atat spectrul XPS al probei MgHAp-CTS cat si sectre ;e XPS de inalta rezolutie pentru Mg 1s si Mg 2s. Dupa cum se poate observa, componenta metalica situata in jurul energiei de legatura de 1303 eV nu a fost observata. Energia de legatura de Mg 2p este usor mai mare decat in oxid. Picul de 1305 eV ar putea indica legaturile de Mg^{2+} cu PO_4^{2-} . Spectrul XPS Mg 2p indica un singur maxim asociat energiei de legatura ce are valoarea in jur de 50.32 eV (Figura 6b). Maximul asociat energiei de legatura din jurul valorii de 49 eV asociat Mg metalic nu este observant. Maximul asociat energiei de legatura de la 50.34 eV indica legatura Mg^{2+} cu PO_4^{2-} . Studiul activitatii antimicrobiene a fost realizat uilizand tulpini Gram-pozitive si Gram negative precum *Staphylococcus aureus* si *Escherichia coli* si o tulpina levurica de *Candida albicans*. Rezultatele testelor antimicrobiene privind efectul inhibitor asupra dezvoltarii de unitati formatoare de colonii (UFC) in prezenta probelor de MgHAp-CTS sunt prezentate in Figura 7 (a-b). Studiile antimicrobiene indica ca cel mai bun efect inhibitor al UFC-urilor de catre materialele studiate a fost obtinut in cazul *Candida albicans* ATCC 90029. Mai mult decat atat, studiile au aratat ca straturile subtiri de MgHAp-CTS au prezentat un efect antimicrobian mai puternic fata de microorganismele testate in comparatie cu straturile subtiri de HAp. Testele antimicrobiene demonstreaza ca straturile de MgHAp-CTS prezinta proprietati fungicide dupa 48 ore de la incubarea fata de tulpina fungica *C. albicans* ATCC 90029. Straturile subtiri de MgHAp-CTS au inceput sa inhibe dezvoltarea UFC-urilor pentru toate tulpinile microbiene testate inca din primele 8 h de la incubare.

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



Datele obtinute din studiile cantitative antimicrobiene indica ca straturile de MgHAp-CTS sunt eficiente in inhibarea dezvoltarii de UFC ale tulpinilor testate. Rezultatele au evidentiat o usoara scadere a numarului de UFC in cazul straturilor HAp pentru *C. albicans* si *S. aureus* dupa 24 h de incubare iar acest fenomen poate fi datorat atat prezentei ionilor de siliciu din substratul de sticla cat si a interactiilor HAp-substrat. Astfel, conform rezultatelor, activitatea antimicrobiana a probelor MgHAp-CTS este corelata cu prezenta ionilor de magneziu. Efectele citotoxice ale straturilor de MgHAp-CTS obtinute din suspensii stabile au fost determinate prin testul MTT utilizand linia celulara de celule fetale umane (hFOB 1.19) si sunt prezentate in Figura 8. Dupa cum se poate observa straturile subtiri prezinta valori excelente ale viabilitatii la 4 zile si la 7 zile. Viabilitatea celulelor hFOB 1.19 incubate cu straturile subtiri de HAp si MgHAp-CTS au prezentat o tendinta de crestere mai mare fata de viabilitatea celulelor hFOB 1.19 incubate cu substratul de sticla. Mai mult decat atat, din studiile de citotoxicitate s-a observat o mai buna proliferare a celulelor hFOB 1.19 incubate cu straturile subtiri de MgHAp-CTS comparativ cu probele de HAp, fapt atribuit prezentei ionilor de Mg in structura HAp. Figura 8 arata ca de-a lungul perioadei de incubatie cu probele de MgHAp-CTS viabilitatea celulara a culturilor de hFOB 1.19 a fost dupa 4 zile, de aproximativ 80%, in timp ce dupa 14 zile viabilitatea lor creste la 96% in raport cu controlul. Probele pe baza de HAp au prezentat o viabilitate de aproximativ 76% dupa 4 zile de incubatie atingand 82% dupa 7 zile iar dupa 14 zile viabilitatea celulara pentru straturi era de 86%. Dupa 14 zile, diferenta intre viabilitatea celulara a celulelor hFOB 1.19 incubate cu HAp si MgHAp-CTS devine semnificativ mai mare decat viabilitatea celulara a celulelor hFOB 1.19 incubate cu substratul de sticla, fapt care indica ca probele de MgHAp-CTS prezinta o buna biocompatibilitate si proprietati bioactive. Pe de alta parte, un exces de Mg ar putea produce radicali hidroxil ($\bullet\text{OH}$) si anioni de tipul O_2^- care ar putea cauza inactivarea proteinelor si chiar apoptoza celulelor [23]. Totusi, tinand cont de substitutia preferentiala a Mg in pozitia Ca(II) din structura HAp [24], riscul de a avea o cantitate mare de Mg scade considerabil si chiar devine inexistent. Astfel, toate straturile subtiri de MgHAp-CTS constituie un mediu excelent pentru proliferarea celulelor primare osteoblaste hFOB 1.19. Se poate trage concluzia ca straturile subtiri obtinute din suspensiile stabile MgHAp-CTS prin imersie au proprietati antimicrobiene bune ceea ce le face candidati ideali pentru dezvoltarea de noi dispozitive antimicrobiene medicale.

Director General INCDFM,
Dr. Ionut Marius Enculescu



BIBLIOGRAFIE

1. Kalita, S. J.; Bhatt, H.A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27*, 837-848.
2. Aina, V.; Lusvardi, G.; Annaz, B.; Gibson, I.R.; Imrie, F.E.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Cerrato, G.; Martra, G. Magnesium-and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties. *J Mater Sci: Mater Med* **2012**, *23*, 2867-2879.
3. Mróz, W.; Bombalska, A.; Burdyska, S.; Jedynski, M.; Prokopiuk, A.; Budner, B.; S'łószarczyk, A.; Zima, A.; Menaszek, E.; S'cisłowska-Czarnecka, A.; Niedzielski, K. Structural studies of magnesium doped hydroxyapatite coatings after osteoblast culture. *J. Mol. Struct.* **2010**, *977*, 145-152.
4. Mroz, W.; Budner, B.; Syroka, R.; Niedzielski, K.; Golanski, G.; Słószarczyk, A.; Schwarze, D.; Douglas, T. E. L. In vivo implantation of porous titanium alloy implants coated with magnesium-doped octacalcium phosphate and hydroxyapatite thin films using pulsed laser deposition. *J. Biomed. Mater. Res. B* **2014**, *103*(1), 151-158.
5. Kulanthaivel, S.; Mishra, U.; Agarwal, T.; Giri, S.; Pal, K.; Pramanik, K.; Banerjee, I. Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion. *Ceram. Int.* **2015**, *41*(9), 11323-11333.
6. Oliveira, A.L.; Mano, J.F.; Reis, R.L. Nature-inspired calcium phosphate coatings: present status and novel advances in the science of mimicry. *Curr Opin Sol St M.* **2003**, *7*, 309-318.
7. Martini, L.; Staffa, G.; Giavaresi, G.; Salamanna, F.; Parrilli, A.; Serchi, E.; Pressato, D.; Arcangeli, E.; Fini, M. Long-term results following a cranial hydroxyapatite prosthesis implantation in a large skull defect model. *Plast. Reconstr. Surg.* **2012**, *129*, 625e-35
8. Yana, Y.; Dinga, Q.; Huang, Y.; Hana, S.; Panga, X. Magnesium substituted hydroxyapatite coating on titanium with nanotubular TiO₂ intermediate layer via electrochemical deposition. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *305*, 77-85.
9. Shepherd, J.H.; Shepherd, D.V.; Best, S.M. Substituted hydroxyapatites for bonerepair. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 2335-2347.

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



10. Predoi, D.; Iconaru, S.L.; Predoi, M.V.; Motelica-Heino, M.; Guegan, R.; Buton, N. Evaluation of antibacterial activity of zinc-doped hydroxyapatite colloids and dispersion stability using ultrasounds. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 515.
11. Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Popa, C.L.; Motelica-Heino, M.; Predoi, D. Evaluation of samarium doped hydroxyapatite, ceramics for medical application: Antimicrobial activity. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 849216.
12. D. Predoi, S.L.Iconaru, M.V.Predoi, Bioceramic layers with antifungal properties , *Coatings*, **2018**, *8*, 276
13. Nagyné-Kovács, T.; Studnicka, L.; Kincses, A.; Spengler, G.; Molnár, M.; Tolner, M.; Lukács, I.E.; Szilágyi, I.M.; Pokol, G. Synthesis and characterization of Sr and Mg-doped hydroxyapatite by a simple precipitation method. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 22976-22982.
14. Li, M.; Xiao, X.; Liu, R.; Chen, C.; Huang, L. Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 797-803.
15. Tite, T.; Popa, A.-C.; Balescu, L.M.; Bogdan, I.M.; Pasuk, I.; Ferreira, J.M.F.; Stan, G.E. Cationic substitutions in hydroxyapatite: Current status of the derived biofunctional effects and their in vitro interrogation methods. *Materials* **2018**, *11*, 2081.
16. Predoi, D.; Iconaru, S.L.; Predoi, M.V.; Stan, G.E.; Buton, N. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Magnesium-Doped Hydroxyapatite Suspensions. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1295.
17. I. Cacciotti, A. Bianco, M. Lombardi, L. Montanaro, Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behavior. *J. Euro. Cer. Soc.* **2009**, *29*, 969-2978.
18. Adzila, S.; Murad, M.C.; Sopyan, I. Doping metal into calcium phosphate phase for better performance of bone implant materials. *Rec. Pat. Mater. Sci.* **2012**, *5*, 18-47.
19. T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R. Bizios. Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59*(2), 312-317.

Director General INCDFM,
Dr. Ionut Marius Enculescu



20. W.J.A. Dhert, C.P.Klein, J.A.Jansen A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite magnesiumwhitlockite and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats , *J.Biomed Mater, Res* **1993**, 27 127 -138
21. Iconaru, S.L.; Predoi, M.V.; Motelica-Heino, M.; Predoi, D.; Buton, N.; Megier, C.; Stan, G.E. Dextran-Thyme Magnesium-Doped Hydroxyapatite Composite Antimicrobial Coatings. *Coatings* **2020**, 10, 57.
22. Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Massuyeau, F.; Constantin, L. V.; Costescu, A.; Predoi, D. Synthesis, structure, and luminescent properties of europium-doped hydroxyapatite nanocrystalline powders. *J. Nanomater.* **2012**, 2012, 1-9, doi.org/10.1155/2012/942801.
23. Hayyan, M.; Hashim M. A.; Inas M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications, AlNashef, *Chem. Rev.* **2016**, 116, 3029–3085, DOI:10.1021/acs.chemrev.5b00407
24. Magnesium Compounds-Advances in Research and Application: 2013 Edition, Q. Ashton Acton General Editor, Scholarly Editions, pp. 2013 - 333

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



REVENDICARI

1. Obținerea hidroxiapatitei dopate cu magneziu într-o matrice de chitosan caracterizată prin aceea că a fost sintetizată printr-o metodă de co-precipitare adaptată la temperatura camerei folosind azotat de calciu tetrahidrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, fosfat acid de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, azotat de magneziu hexahidrat $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, hidroxid de amoniu NH_4OH , chitosan etanol absolut și apă bidistilată. Cantitatea de magneziu a fost $x_{\text{Mg}}=0.25$, iar rapoartele molare Ca/P și (Ca+Mg)/P au fost egale cu 1.67 și soluția obținută prin dizolvarea $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și etanol într-un pahar a fost adăugată prin picurare într-o soluție de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ și chitosan. Prin adăugarea de NH_4OH , pH-ul soluției a fost menținut constant la valoarea de 11 tot timpul procesului de sinteză iar soluția finală notată ca MgHAp-CTS a fost agitată pentru 24 ore la 100°C .
2. Suspensia de MgHAp-CTS a fost folosită pentru realizarea straturilor subțiri caracterizate prin aceea că acoperirile de straturi subțiri de MgHAp-CTS au fost preparate folosind metoda de acoperire prin imersie pe suporturi de sticlă. Suportii de sticlă au fost pregătiți prin spălare cu apă deionizată. Echipamentul standard folosit permite prepararea la o viteză definită și în condiții de presiune și umiditate atmosferică normale. Au fost depuse trei straturi succesive de MgHAp-CTS pe sticlă. Fiecare strat a fost uscat la 80°C timp de 4 ore. În final, s-a realizat un tratament termic la 500°C pentru o oră iar răcirea a fost făcută cu viteză de $5^\circ\text{C}/\text{min}$.
3. Estimarea activității antimicrobiene față de tulpinile *S.aureus*, *E.coli* și *C. albicans* s-a făcut în urma studiilor antimicrobiene care au arătat că straturile de MgHAp-CTS sunt eficiente față de tulpinile microbiene testate. Rezultatele testelor antimicrobiene demonstrează că straturile de MgHAp-CTS prezintă proprietăți fungicide împotriva *C.albicans* ATCC 90029 după 48 ore de la incubare. Cel mai bun efect inhibitor a fost obținut în cazul *Candida albicans* ATCC 90029.

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



4. Estimarea efectelor citotoxice a straturilor de MgHAp-CTS obtinute din suspensii stabile s-a realizat prin testul MTT folosind celule osteoblaste fetale umane (hFOB 1.19). Testarea viabilitatii in cazul straturilor de MgHAp-CTS dupa 4 si 7 zile de incubare a evidentiat o mai buna proliferare a celulelor hFOB 1.19 comparativ cu straturile de HAp. Cresterea viabilitatii in cazul straturilor de MgHAp-CTS s-a datorat prezentei ionilor de Mg in structura hidroxiapatitei, acoperirile de MgHAp-CTS prezentand o foarte buna biocompatibilitate.

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



FIGURI

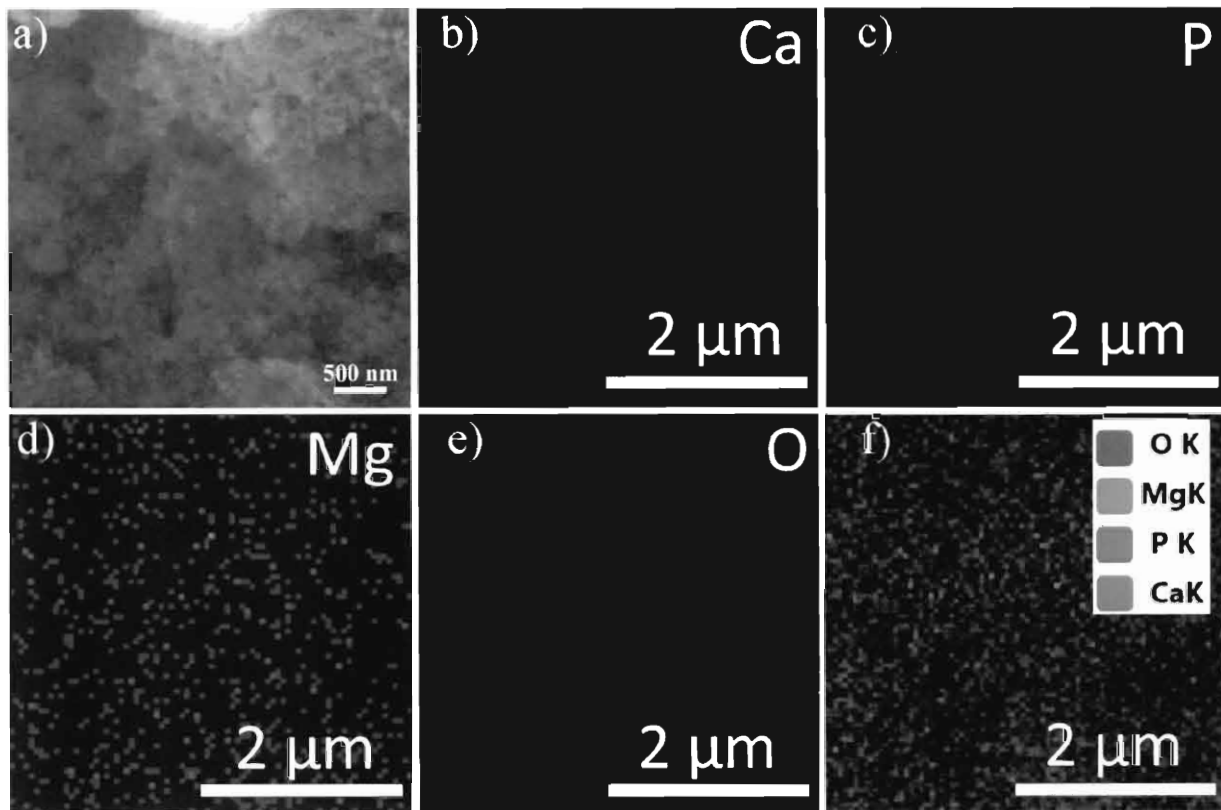


Figura 1- Imaginea MEB (a), harta distributiei elementale pentru Ca (b), P (c), Mg(d), O(e) si suprapunerea elementelor constituinte (f) pe suprafata stratului de MgHAp-CTS

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu

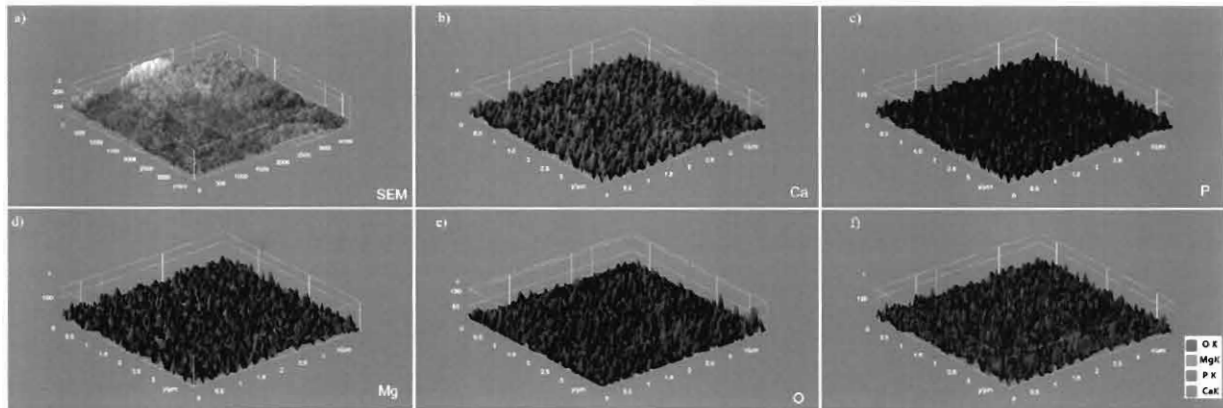


Figura 2 Reprezentarea 3D a imaginii MEB (a) a hartii distributiei elementale pentru Ca(b), P(c), Mg(d), O(e) si suprapunerea tuturor constituentilor (f) pe suprafata stratului MgHAp-CTS

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu

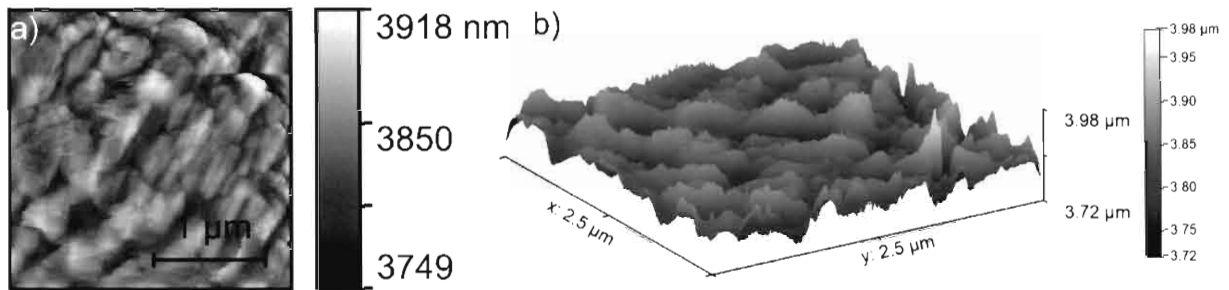


Figura 3 Imaginea de topografie AFM pentru stratul subtire MgHAp-CTS reprezentata in 2D (a) si 3D (b)

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu

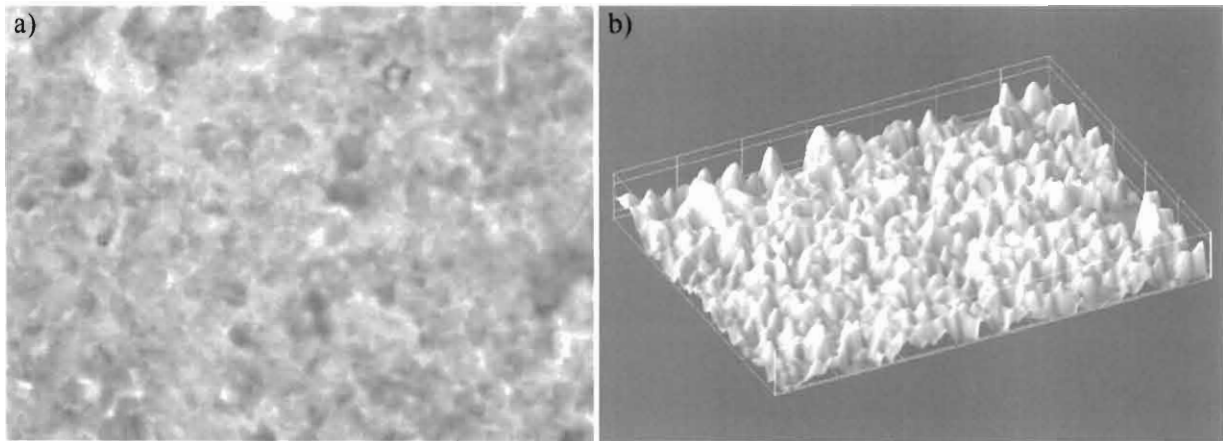


Figura 4 Imaginea de microscopie optica a suprafetei stratului de MgHAp-CTS (a) si reprezentarea 3D a suprafetei stratului 25MgHAp (b)

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



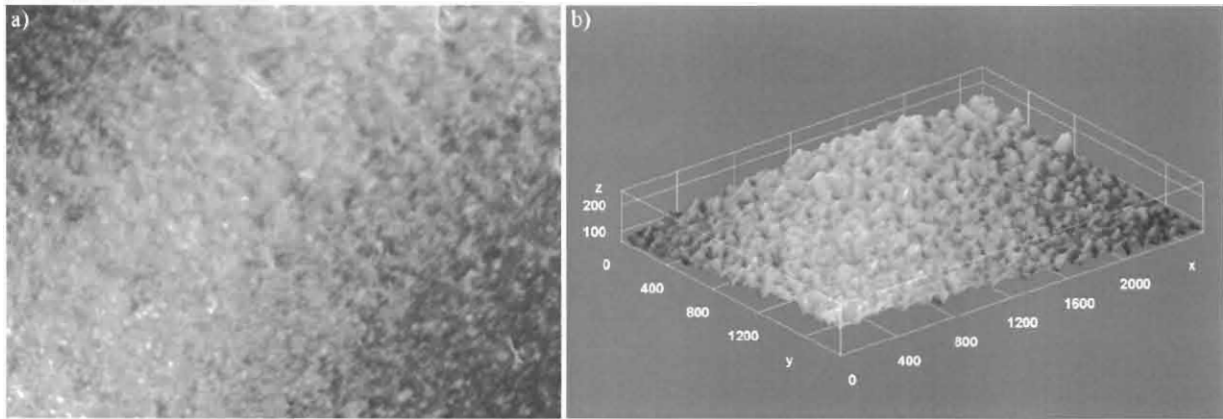


Figura 5 Imaginea de microscopie metalografică a suprafeței stratului MgHAp-CTS în reprezentare 2D (a) și reprezentarea 3D a suprafeței stratului 25MgHAp (b).

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu



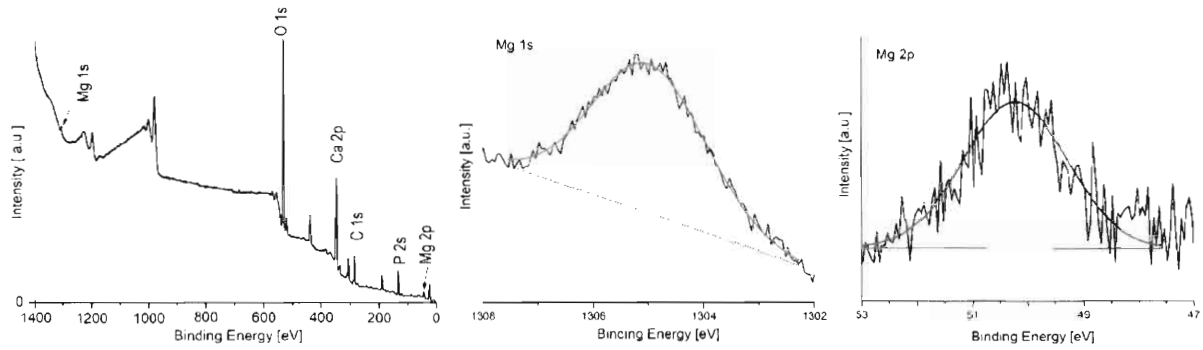


Figura 6 Spectrul XPS inregistrat pentru stratul MgHAp-CTS. Spectrele de inalta rezolutie pentru Mg1s (a) si Mg 2p (b) pentru acoperirea MgHAp-CTS.

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu

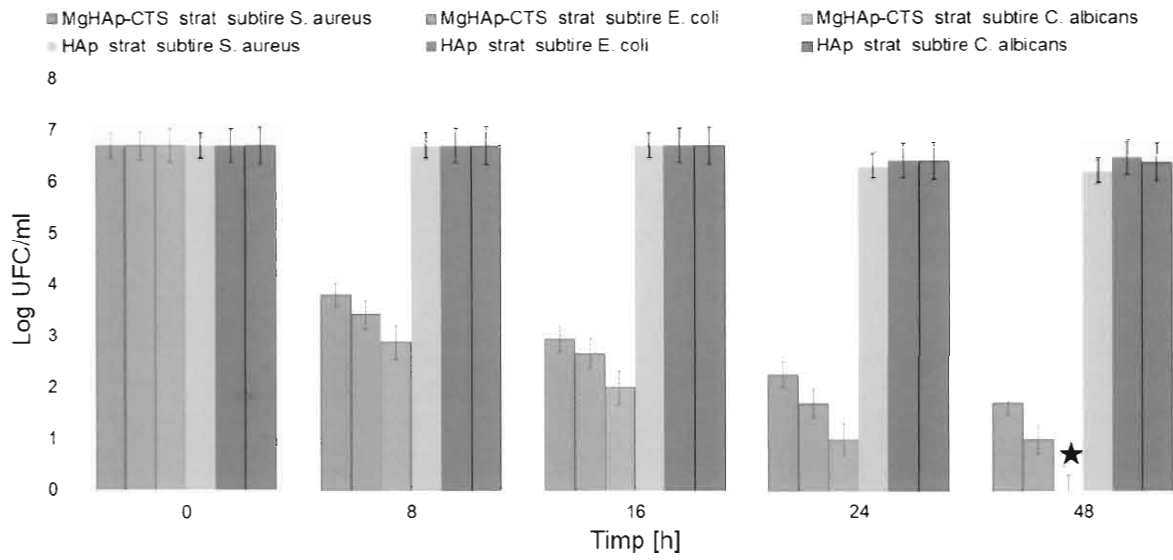


Figura 7 Reprezentarea grafica pentru Log UFC/ml ca functie de timpul de expunere pentru straturile subtiri de HAp si MgHAp-CTS (b)

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu

MTT

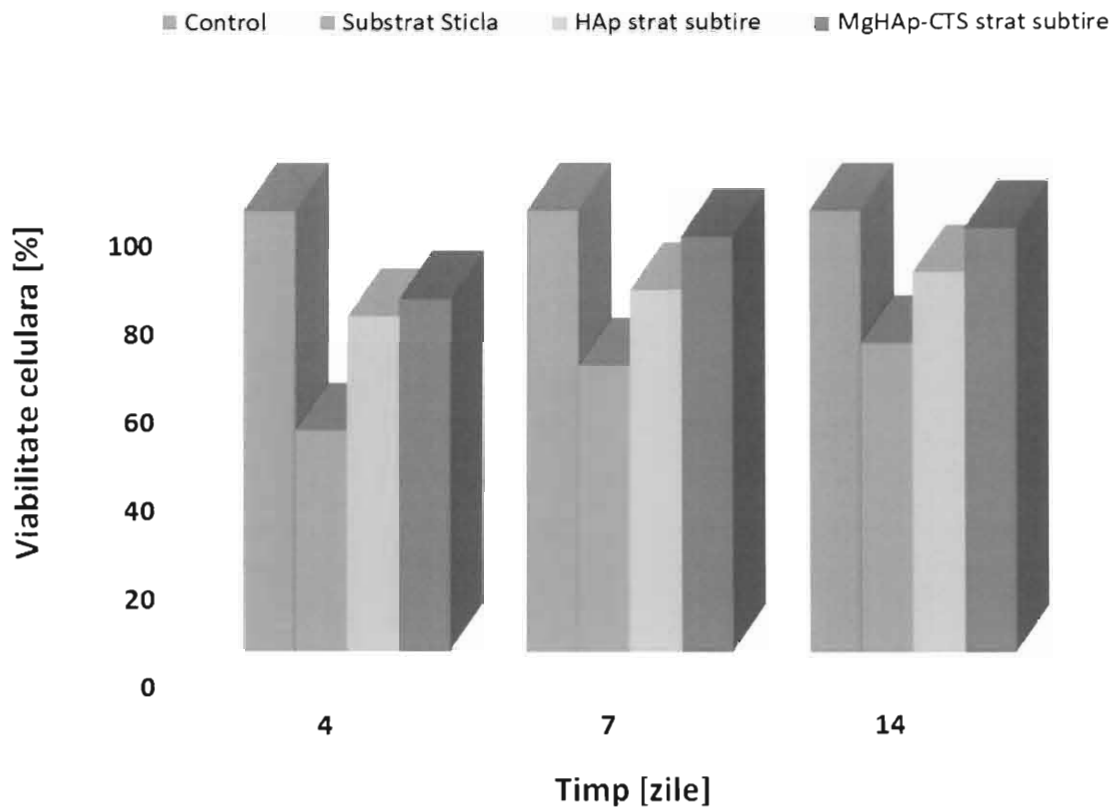


Figura 8 Testul MTT pentru viabilitatea culturii de celule hFOB 1.19 pe substratul de sticla, stratul de HAp, si stratul de MgHAp-CTS la diferite perioade de incubatie

Director General INCDFM,

Dr. Ionut Marius Enculescu