



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00370**

(22) Data de depozit: **30/06/2022**

(41) Data publicării cererii:
29/11/2022 BOPI nr. **11/2022**

(71) Solicitant:

- **UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU OPTOELECTRONICĂ INOE2000, FILIALA INSTITUTUL DE CERCETĂRI, PENTRU INSTRUMENTAȚIE ANALITICĂ CLUJ-NAPOCA STR. DONATH, NR.67, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **INSTITUTUL REGIONAL DE GASTROENTEROLOGIE- HEPATOLOGIE "PROF.DR.OCTAVIAN FODOR" CLUJ- NAPOCA, STR. CONSTANȚA NR. 5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:

- **TOMOAI A-COTISEL MARIA, STR. TIMIȘULUI NR.75, BL.T 2, AP.5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

- **MOCANU AURORA, STR.LOUIS PASTEUR NR.40, BL IX R, SC.2, AP.19, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **TOMOAI A GHEORGHE, STR.SCORȚARILOR NR.1, BL.D5, AP.5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **HOROVITZ OSSI, STR.MOGOȘOAI NR.2, SC. IV, AP.32, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **POP ALEXANDRU, STR.IZLAZULUI NR.4, BL.A 1, SC.2, AP. 38, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;**
- **AVRAM ALEXANDRA, STR.CORNIȘA BISTRIȚEI NR.30, SC.A, AP.44, BACĂU, BC, RO;**
- **CADAR OANA, STR.OAȘULUI NR.340M, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **MOCAN TEODORA, STRADA SITARILOR, NR.55 E, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **ROMAN CECILIA, STR. PIAȚA ABATOR, BL. B, AP. 5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
- **BECZE ANCA, BD.NICOLAE TITULESCU, NR.16, BL.P7, SC.4, AP.35, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(54) **NANOCOMPOZITE PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITE ȘI VITAMINE. PROCEDEU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanocompozite pe bază de hidroxiapatite (HAP) și vitaminele D și K utilizate ca suplimente alimentare pentru îngrijirea sănătății, în scopul regenerării și reconstrucției sistemului osos. Procedeuul, conform invenției, constă în etapele: dizolvarea vitaminelor separat, D3 în alcool etilic 98% și K2 în acetonă, la temperatură de maximum 20°C, adăugarea sub agitare energetică, peste soluțiile individuale sau în amestec, a unei hidroxiapatite, HAP sintetică, pulbere cu structură amorfă, obținută prin liofilizare (HAPA, HAPA1) sau calcinată (HAPc), sau multisubstituită (msHAP), în proporție de 2...40% cu ionii Sr²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, SiO⁴⁻, de tip msHAPA, msHAPA1 cu structură amorfă, sau HAPc, msHAPc cu structură cristalină, având suprafața specifică de

120...160 m²/g, cu agitare timp de 2 h în condiții de întuneric până se stabilește echilibrul de adsorbție, decantarea suspensiei, evaporarea, îndepărtarea completă a solventului prin liofilizare, rezultând compozite de tip HAPA-D3, HAPA-K2, HAPA-D3-K2 cu o distribuție uniformă a vitaminelor D și K, separat sau în amestec, având cantitatea de vitamină adsorbită pe nanoparticule de hidroxiapatită în proporție de 0,001...7%, în raport cu hidroxiapatita: HAPA, HAPA1, HAPc, msHAPA, msHAPA1 sau msHAPc și eliberare treptată a acestora, fără acumulare în țesutul adipos.

Revendicări: 6
Figuri: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Nanocompozite pe bază de hidroxiapatite și vitamine. Procedeu de obținere

Prezenta invenție se referă la compozite pe bază de hidroxiapatite (HAP) conjugate cu vitamine D și K care facilitează absorbția calciului în celule, cu efecte pozitive asupra regenerării și reconstrucției osoase.

Datorită proprietăților adsorbitive foarte bune, hidroxiapatita stoechiometrică [HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] este utilizată atât ca suport cât și ca transportor al principiilor active: hormoni, factori de creștere, agenți antitumorali, insulină și globulină. De asemenea HAP naturală sau sintetică prezintă o bună osteocompatibilitate, ceea ce o face să fie larg utilizată ca și înlocuitor de greșă osoasă. În plus, o substituție parțială cu ioni benefici organismului uman (spre exemplu, o substituție cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , în locul ionilor Ca^{2+} și de SiO_4^{4-} în locul ionilor de PO_4^{3-} și OH^-) duce la o îmbunătățire a proprietăților hidroxiapatitei [Oltean-Dan et al. 2019, Garbo et al. 2020, Oltean-Dan et al. 2021]. Spre exemplu, magneziul joacă un rol important în procesele osoase, fiind un element esențial atât pentru osteoblaste cât și pentru osteoclaste, intensificând viabilitatea și diferențierea celulară. Siliciul este și el esențial în dezvoltarea și repararea scheletului, influențând funcția celulară și avansând osteogeneza și angiogeneza. Ionii de stronțiu stimulează activitatea osteoblastelor, iar cei de zinc au și ei un efect stimulator asupra mineralizării osoase.

Cu toate acestea, utilizarea HAP în calitate de suport pentru transportul de vitamine nu a primit o atenție deosebită. Cercetările din ultima perioadă [Bane et al. 2020] au arătat că vitaminele D și K au un rol important în metabolismul osos. Vitamina K2 stimulează producția de osteocalcină în osteoblaste [Li et al. 2019, Hu et al. 2021, Rodriguez-Olleros Rodriguez and Diaz Curiel 2022]. Vitamina D3, pe lângă capacitatea de stimulare a producerii de colagen de tip I și a activității fosfatazei alcaline (ALP) în celulele osteoblaste, reduce resorbția calciului în celulele osoase, prevenind astfel riscul de osteoporoză. Un efect sinergic a fost indicat și pentru vitamina K2 și D3, o combinație care ajută la creșterea cantităților de osteocalcină din celulele osoase, îmbunătățind astfel și mai mult densitatea osoasă [van Ballegooijen et al. 2017]. O concentrație inadecvată a acestor vitamine necesită suplimentare.

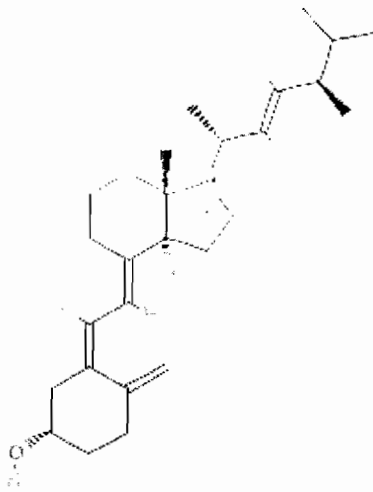
Figura 1 prezintă structurile vitaminelor D, respectiv D2 și cele 3 forme specifice pentru D3. Grupul de „vitamine D” este reprezentat de compuși liposolubili, similari în ceea ce privește structura chimică. Chiar dacă vitaminele D se sintetizează ușor în urma expunerii



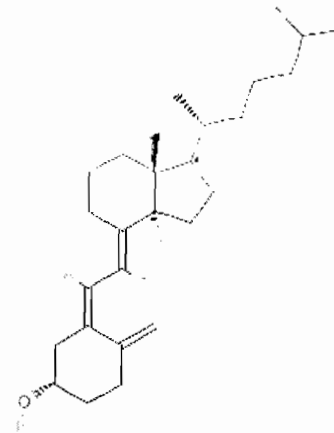
[Handwritten signature]

[Handwritten text: Mădălin Mădălin, 2022]

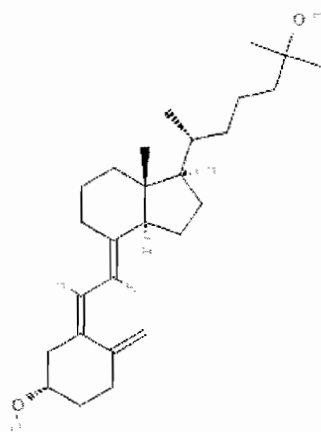
la soare, cantitatea de vitamine D3 produsă depinde de câțiva factori printre care indexul UV, cantitatea de melanină din piele sau latitudinea geografică. Pentru a preveni deficiențele, este necesară o dietă bogată în alimente ce conțin vitamine D. În alimente, acestea se găsesc sub două forme, și anume D2 (ergocalciferol) din surse vegetale și D3 (colecalciferol) din surse animale. Aceste două forme sunt însă metabolizate diferit de către ficat, colecalciferolul ducând la mai mult 25 hidroxi-colecalciferol decât aceeași cantitate de ergocalciferol [Romagnoli et al. 2008]. Ajunsă în ficat, D3 este hidroxilată formându-se 25 hidroxi-colecalciferol [25(OH)D3], care ulterior în rinichi, este transformată în 1,25 dihidroxi-colecalciferol [1,25(OH)₂D3], care este cel mai activ metabolit al vitaminei D3 din punct de vedere biologic, cu cea mai mare stimulare pentru producerea osteocalcinei și a fosfatazei alcaline în celulele osteoblaste [Azizova et al. 2022].



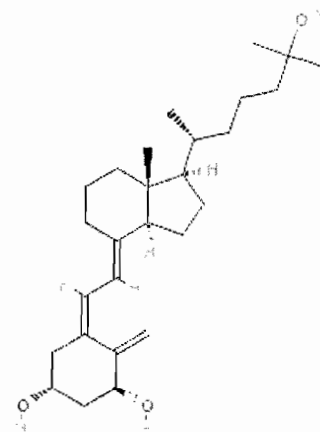
(A)



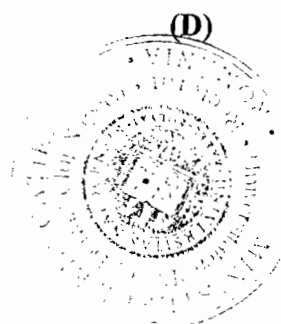
(B)



(C)



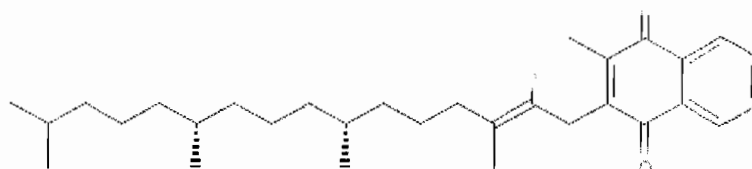
(D)



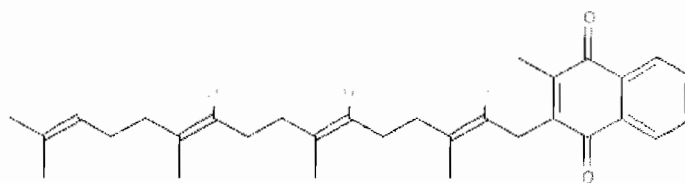
2022.09.01

Figura 1. Structurile vitaminei D: A) ergocalciferol (vitamina D2); B) colescalciferol (vitamina D3); C) 25 hidroxi-colescalciferol (25(OH)D3); D) 1,25 dihidroxi-colescalciferol (1,25(OH)₂D3).

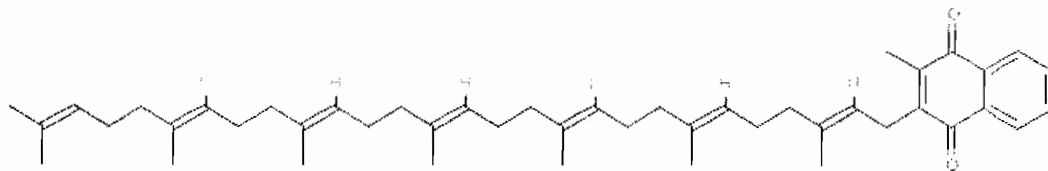
Vitamina K2 (menachinonă: MK, de origine animală și din produse fermentate) este una dintre cele 2 forme naturale ale vitaminei K, împreună cu K1 (filochinonă, de origine vegetală) vezi Figura 2. Este demonstrat faptul că toate formele omoloage ale vitaminei K pot fi transformate în MK-4 in vivo, în ficat [Sato et al. 2012, Ivanova et al. 2018]. Vitamina K2 apare și ea sub diverse forme, diferențiate prin numărul reziduurilor izoprenoide din lanțurile laterale (Figura 2). Deficiența de vitamină K2 pare a fi responsabilă de un efect de depunere scăzută a calciului în țesutul osos și de acumulare pe peretele vaselor de sânge [Mandatori et al. 2021]. Figura 2 prezintă structura vitaminei K1 precum și a celor două forme omoloage ale vitaminei K2, menachinonă-4 (MK-4) și menachinonă-7 (MK-7), acestea fiind cele mai utilizate forme în suplimentele alimentare. Diferența între variantele MK-4 și MK-7 constă în timpul mai scurt de înjumătățire pentru prima variantă. Acest lucru duce la necesitatea împărțirii suplimentului pe parcursul unei zile.



A

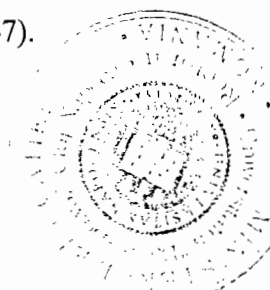


B



C

Figura 2. Structura vitaminelor K: A) vitamina K1 (filochinonă) și vitamina K2: B) menachinonă-4 (MK-4) și C) menachinonă-7 (MK-7).



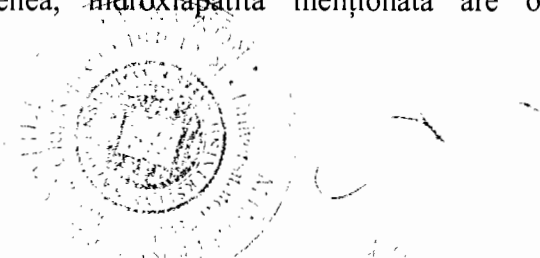
Arătăm totodată că au fost brevetate unele compozite cu vitamine D sau K obținute prin variate procedee de sinteză având ca suport fosfat tricalcic sau hidroxiapatită în prezența unor aditivi considerați cu efect biologic.

Astfel, conform brevetului AU 199864997 B2 (**Preparat solid stabil ce conține vitamina D3 și fosfat tricalcic**) sunt dezvoltate unele preparate ce conțin fosfat tricalcic și colecalciferol. Deși fosfatul tricalcic este asemănător hidroxiapatitei din punct de vedere al proprietăților de compatibilitate biologică, compozitul dezvoltat este un amestec fizic ce conține și *mulți excipienți* cum ar fi lactoza ce poate reprezenta o problemă pentru persoanele cu alergii. De asemenea, vitamina nu este adsorbită, ceea ce duce la o eliberare rapidă, D3 neputând ajunge la celulele suficient de repede.

Brevetul US 7,029,703 B2 (**Compoziții pentru promovarea structurii osoase sănătoase**) dezvoltă un supliment alimentar pe baza de hidroxiapatită, vitamina D și un stimulent (ipriflavona) pentru osteoblaste. Deși conține hidroxiapatită, sursa preferată este hidroxiapatita microcristalină de origine animală, ce încă conține colagen, grăsimi și alți nutrienți specifici. Deși hidroxiapatita naturală prezintă o biocompatibilitate bună, există riscul contaminării cu diverși patogeni sau hormoni, mai ales în cazul prezenței colagenului. Un alt potențial dezavantaj este faptul că hidroxiapatita utilizată este microcristalină, având o suprafață specifică redusă. De asemenea, se menționează prezența caseinatului de sodiu în produsul final, derivat de origine animală, produsul neputând fi consumat de către un segment mare de populație.

Conform brevetului EP 3 139 904 B1 (**Formulări din vitamine liposolubile**) se dezvoltă compoziții de tip supliment pe baza de vitamina K1 sau K2 (MK-7, menachinonă-7) împreună cu un compus pe bază de calciu (CaCO_3) sau magneziu (MgO). În ceea ce privește compusul cu calciu, sub formă de carbonat, deși conținutul de calciu elemental este mare, acesta se absoarbe mai greu. Luând în considerare și bazicitatea ridicată a compusului final, acesta ar avea o eficiență mai scăzută.

Brevetul US 2004/0009235 A1 (**Compoziții din hidroxiapatită nanometrică pentru reprovizionarea calciului**) descrie compoziții pe bază de hidroxiapatită nanometrică cu diverse vitamine printre care și vitamina D, și un alt element din grupa Sr, F, Fe, Zn, și Mn. Un dezavantaj este faptul că amestecul este fizic, toate elementele active fiind adăugate sub formă solidă, ceea ce duce la o adsorbție scăzută și o eliberare rapidă a acestora, diminuând astfel considerabil efectul scontat. De asemenea, hidroxiapatita menționată are o granulometrie relativ ridicată, de până la 800 nm.

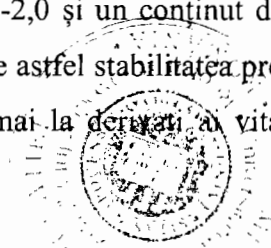


Brevetul JP2007153842A (**Material compozit cu vitamine și apatită**) se referă la un complex apatită-vitamine, unde vitaminele în cauză, printre care și D3 și K2, au fost adsorbite pe suprafața particulelor de apatită, ceea ce duce la un compozit cu activitate mai bună decât cea în cazul amestecurilor fizice discutate anterior. Totuși, în ceea ce privește hidroxiapatita, sunt preferate particulele cu un diametru mediu de 0,01 până la 2 μm , preferabil de 0,03 până la 1 μm (particule primare). De asemenea se menționează și aglomerările de particule primare (particule secundare) cu un diametru 0,1 - 50 μm , preferabil 1 - 25 μm . Dimensiunea particulelor de hidroxiapatită poate fi un neajuns în ceea ce privește adsorbția vitaminelor, particulele mai mici, de dimensiuni nano, având o suprafață specifică mai mare și putând adsorbi mai multă vitamină, ducând la o eliberare sustenabilă (mai îndelungată) și un efect mai bun în ceea ce privește preluarea acestora de către celule.

Brevetul CN103202483A (**Compoziții nutriționale pentru suplimentarea calciului**) face referire la o serie de compoziții nutritive pentru suplimentarea calciului. Drept supliment de Ca sunt menționate diverse materiale cum ar fi minerale din lapte, carbonat de calciu, gluconat de calciu, fosfat de calciu, fosfat acid de calciu și lactat de calciu. Pe lângă alți aditivi, compozițiile din invenție conțin și un adjuvant pentru calciu, cum ar fi vitamina D sau una din proteinele CPP (calciu pump protein) și CBP (calcium bind protein). Exemplele propuse ce conțin vitamina D utilizează fosfatul dicalcic care este mai acid decât hidroxiapatita și nu este recomandat în suplimente alimentare.

Conform brevetului US 2014/0220151 A1 (**Stabilitate în suplimentele pe bază de vitamine și minerale**) sunt descrise compoziții de vitamine și minerale care cuprind cel puțin un metal polivalent, cel puțin o vitamină oxidabilă și un fosfat dicalcic anhidru. Vitaminele la care se face referire sunt vitamina C, vitamina E, vitamina A, vitamina B6, vitamina D3, vitamina K, acidul folic precum și combinații ale acestora. Invenția propune fosfatul dicalcic anhidru, evitându-se astfel utilizarea sărurilor de calciu care conțin apă legată, reducându-se tendința de apariție a reacțiilor de oxidare promovate de apă. Cu toate acestea, trebuie avut în vedere faptul că fosfatul de calciu anhidru are o biodisponibilitate mai scăzută decât cel hidratat.

Brevetul US 9,757,331 B2 (**Compuși activi stabiliizați**) discută compoziții solide pe bază de fosfat de calciu și derivații acestuia și o substanță adsorbită pe acesta, substanță care cuprinde o componentă activă și un stabilizator hidrofob. Fosfații utilizați în invenție sunt descriși a avea raportul Ca/P în intervalul 0,95-2,0 și un conținut de apă mai mic de 3,0% pentru a evita degradarea prin oxidare și a crește astfel stabilitatea preparatului. Din punct de vedere experimental, invenția face referire numai la derivații vitaminei D, componentul



hidrofob fiind ulei de fenicul, măsline, germene de grâu, ulei de in sau ulei Miglyol. Folosirea fazei uleioase este de înțeles ținând cont că vitamina D este solubilă în ulei. Cu toate acestea trebuie avute în vedere și anumite dezavantaje. Spre exemplu, pinorezinolul din componența uleiului de măsline scade absorbția intestinală a vitaminei D.

Preparatele cunoscute în domeniu, dau rezultate nesatisfăcătoare în ceea ce privește formulările suplimentelor pe bază de compuși cu calciu și vitaminele D și K, mai ales în ceea ce privește alegerea compusului cu calciu, care trebuie să fie adecvat din punct de vedere al biodisponibilității și al proprietăților de adsorbție a vitaminelor pe acest compus ales pentru a evita astfel eliberarea rapidă a vitaminelor.

Prezenta invenție propune eliminarea problemelor prezente în starea actuală, pentru obținerea compozitelor care conțin vitamine D și K.

Se utilizează hidroxiapatita sintetică datorită purității și biodisponibilității ridicate. Se evită astfel problemele create de utilizarea hidroxiapatitei de origine naturală, cum ar fi potențiala impurificare a acesteia cu hormoni și antibiotice (HAP de origine bovină, porcină, etc.) sau metale grele în cazul hidroxiapatitei de origine marină (scoici, corali, etc.). De asemenea HAP sintetic are o absorbție mai bună în organism față de alți compuși cu calciu utilizați în starea actuală, eliminând totodată și potențialele schimbări de pH a unora dintre aceștia, cum ar fi carbonatul de calciu (pH bazic) și fosfatul dicalcic (pH mai acid). Pe de altă parte, un alt compus utilizat în suplimente, și anume lactatul de Ca este foarte bine tolerat dar conținutul său scăzut în calciu (aprox 13%) îl fac să fie inferior hidroxiapatitei.

Hidroxiapatitele din prezenta invenție sunt obținute după procedee proprii, [**Brevet RO 125817; Brevet RO 133124**], putându-se controla astfel dimensiunile particulelor, acestea fiind la nivelul inferior al scalei nanometrice. De asemenea, uniformitatea dimensiunilor și a formei nanoparticulelor în toată pulberea de HAP ajută la o distribuție uniformă a vitaminelor D sau K, sau a amestecului de vitamine în compozitul final. Hidroxiapatita este liofilizată, astfel eliminându-se tendința de apariție a reacțiilor de oxidare promovate de apă, problemă amintită de câteva studii din starea actuală.

Invenția de față îmbunătățește starea actuală prin aceea că hidroxiapatita este utilizată ca vehicul pentru transportul de vitamină. Vitamina este adsorbită pe nanoparticula de hidroxiapatită ducând la o eliberare treptată, cantitatea de vitamină administrată fiind transportată la celule aproape fără risipă. Eficiența vitaminelor crește în stare adsorbită pe suport, comparativ cu amestecurile fizice, eliberarea făcându-se treptat, evitând astfel eliberarea bruscă caracteristică vitaminelor ca atare, și/sau acumularea în cantitate mare în țesutul adipos. Comparativ cu suplimentele în care vitamina este adăugată în amestec fizic,

neadsorbită, unde este necesară o cantitate foarte mare de substanță activă pentru prepararea suplimentelor respective, adsorbția pe HAP în invenția de față se face din soluție cu o concentrație specifică în vitamine. Astfel, se poate atinge ușor o cantitate dorită de vitamină sau amestec de vitamine în compozitul final, chiar dacă aceasta este foarte mică. Prin urmare, compozitele din prezenta invenție ar putea rezolva problema existentă de risipă de vitamine costisitoare specifică amestecurilor fizice. Totodată, eliminarea solvenților se face rapid (i.e. rotavapor), fără o degradare a vitaminei adsorbite și fără a lăsa urme toxice.

De asemenea, prin utilizarea hidroxiapatitei de natură sintetică, cu particule nanometrice, se crează o suprafață specifică mai mare (120-160 m²/g) pentru adsorbția efectivă a vitaminei, ducându-se astfel la o cantitate adsorbită mai mare și astfel, la un complex final cu activitate mai bună din punct de vedere biologic. În același timp, potențiala utilizare a hidroxiapatitei multisubstituite cu ioni benefici în ceea ce privește regenerarea osoasă, cum ar fi Sr²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, SiO₄⁴⁻, duce la un efect și mai pronunțat al compozitului final, cu vitamine D și K. Acest lucru ajută în sensul consumului unui singur supliment ce aduce un aport atât de vitamine necesare cât și de ioni necesari pentru metabolismul osos. De asemenea, utilizarea HAP multisubstituit în compozitele cu vitamine pentru suplimente alimentare este o altă îmbunătățire adusă la starea actuală. Anumiți ioni metalici, benefici organismului sunt utilizați și în alte studii, împreună cu un compus pe baza de calciu și vitamine, dar aceștia sunt adăugați sub alte forme (i.e. magneziul sub formă de MgO) și nu toți împreună.

Compozitele realizate în cadrul prezentei propuneri de brevet de invenție au utilizat hidroxiapatite preparate după procedee originale proprii [Brevet RO 125817; Brevet RO 133124] având compozițiile corespunzătoare conform Tabelului 1.

Tabel 1. Compozițiile pulberilor de hidroxiapatite, HAP, sintetizate și folosite la prepararea diverselor compozite cu vitamine D și K (i.e., exemple 1-12; Figura 3).

Nr. Crt.	HAP			Grad cristalinitate	Element de substituție (%wt)				Formulă teoretică
	Tip HAP	Simbol	Calcinare		Mg	Zn	Si	Sr	
1	HAP	HAPA	Necalcinat	48,4	0	0	0	0	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
2		HAPA1	300 °C, 1h	55,3					
3		HAPc	850 °C, 4h	90,2					
4	HAP - 1,5%Mg -0,2%Si -0,2%Zn -5%Sr	msHAPA	Necalcinat	37,7	1,5	0,2	0,2	5	Ca _{8,76} Mg _{0,63} Zn _{0,03} Sr _{0,58} (PO ₄) _{5,93} SiO ₄) _{0,07} (OH) _{1,93}
5		msHAPA1	300 °C, 1h	39,6					
6		msHAPc	600 °C, 4h	56,8					

Întrucât structura morfologică, porozitatea, suprafața specifică și dimensiunea particulelor de HAP au un rol determinant asupra capacității de adsorbție, s-au efectuat măsurători care au evidențiat influența tratamentelor hidrotermale și termice și a metodelor de preparare asupra adsorbției vitaminei D3/HAP, K2/HAP și a amestecului de vitamine D3-K2/HAP. Rezultatele prezentate în tabelele 2, 3 și 4, demonstrează capacitatea de adsorbție net superioară a pudrei HAP amorfe (HAPA), la care uscarea s-a efectuat prin liofilizare.

Terapia combinată cu HAP sau msHAP și simultan vitaminele K2 și D3 mărește turnover-ul osos și promovează formarea și calcificarea osului, rezultând creșteri substanțiale ale densității minerale osoase și astfel realizându-se îmbunătățirea calității osoase [Price and Baukol 1980, Koshihara et al. 1996, Andrew 1997, Ushiroyama et al. 2002, Sanguineti et al. 2016, Kuroda et al. 2019, Tsugawa and Siraki 2020]. Efectul sinergic al acestor componente din nanocompozitele inovative poate fi util persoanelor cu tulburări simultane ale sistemului fibrinolitik și deficite de mineralizare osoasă (tulburări specifice post-menopauzei sau secundare statusului pacienților hemodializati).

Tabel 2. Coeficientul de adsorbție (a) și gradul de adsorbție (% ads) al vitaminei D3* (dată în Figura 1) pe hidroxiapatite* (i.e. Tabel 1). Cantitatea de hidroxiapatită este constantă (1g), volumul de soluție alcoolică cu vitamina D3 este constant (10 mL).

Nr. Crt.	Conc. inițială, D3 (mg/mL)	Conc. inițială, D3 (mg/g)	a (mg/g) D3			% ads D3		
			HAPA	HAPA1	HAPc	HAPA	HAPA1	HAPc
1	1,00	10,0	2,04	0,84	0,57	20,4	8,4	5,7
2	6,67	66,7	7,51	6,05	3,09	11,3	9,1	4,6
3	13,33	133,3	14,25	10,23	5,13	10,7	7,7	7,0
4	20,0	200,0	19,86	14,10	7,19	9,9	7,05	3,6

***Obs.** Concentrația inițială este dată în mg de vitamină D3 în 1mL de soluție alcoolică; coeficientul de adsorbție (a) este dat în mg de vitamină D3 pentru 1g de hidroxiapatite. Hidroxiapatita utilizată a fost obținută prin precipitare. HAPA - pulbere de hidroxiapatită (amorfa, A) obținută prin precipitare urmată de liofilizare; HAPA1 - pulbere obținută prin precipitare urmată de liofilizare și calcinare la 300 °C, 1h (amorfa 1, A1); HAPc - pulbere obținută prin precipitare urmată de liofilizare și calcinare la 850 °C, 4h, cu grad de cristalinitate (c) ridicat.



47

Tabel 3. Coeficientul de adsorbție (a) și gradul de adsorbție (% ads) al vitaminei K2* (MK-4, Figura 2) pe HAPA. Cantitatea de hidroxiapatită este constantă (1g), volumul de soluție cu vitamina K2 în acetonă este constant (10 mL).

Nr. Crt.	Conc. inițială, K2 (mg/mL)	Conc. inițială, K2 (mg/g)	a (mg/g) K2	% ads K2
1	0,0067	0,067	0,0142	21,2
2	0,0670	0,67	0,0581	8,7
3	0,17	1,7	0,135	7,9
4	0,33	3,3	0,241	7,3
5	0,67	6,7	0,446	6,7
6	1,00	10	0,641	6,4

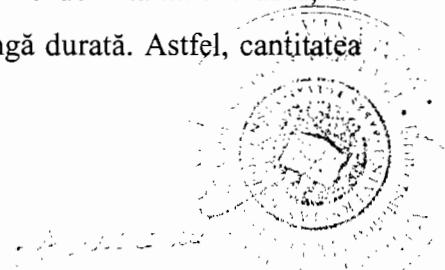
*Obs. Concentrația inițială este dată în mg de vitamină K în 1mL de soluție de acetonă; coeficientul de adsorbție (a) este dat în mg de vitamină K pentru 1g de hidroxiapatită, HAPA.

Tabel 4. Coeficientul de adsorbție (a) și gradul de adsorbție (% ads) al vitaminelor D* și K* pe nanoparticulele de HAPA. Cantitatea de hidroxiapatită este constantă (1g), volumul de soluție cu vitamine este de 10 mL (v : v este 1:1, 5 ml alcool etilic : 5 ml acetonă; wD3: wK2).

Nr. Crt.	Conc. Inițială, D3 (mg/mL)	Conc. Inițială, D3 (mg/g)	a (mg/g) D3	% ads D3	Conc. Inițială, K2 (mg/mL)	Conc. Inițială, K2 (mg/g)	a (mg/g) K2	% ads K2
1	0,0033	0,033	0,0184	55,8	0,0033	0,033	0,0048	14,5
2	0,033	0,33	0,086	26,1	0,033	0,33	0,021	6,4
3	0,083	0,83	0,13	15,7	0,083	0,83	0,053	6,4
4	0,17	1,67	0,20	12,0	0,17	1,67	0,11	6,6
5	0,33	3,33	0,37	11,1	0,33	3,33	0,23	6,9
6	0,50	5,00	0,48	9,6	0,50	5,00	0,36	7,2

*Obs. Concentrația inițială este dată în mg de vitamină D sau K în 1mL de soluție respectiv pe 1g de hidroxiapatită, HAPA; coeficientul de adsorbție (a) este dat în mg de vitamină D sau K pentru 1g de hidroxiapatită, HAPA.

Ținând cont că în unele afecțiuni severe cu deficit mare de vitamine, cauzate de diete dezechilibrate, intervenții chirurgicale (cum ar fi chirurgia bariatrică) sau diverse tratamente medicamentoase (cum ar fi chimioterapia) este necesar și un aport rapid din aceste vitamine, am preparat și compozite cu efect dublu (sintetizate prin evaporare). Aceste compozite sunt obținute prin evaporarea solventului folosit și conțin o parte din vitamine adsorbite pe suprafața nanoparticulelor de hidroxiapatită și o parte aflată interstițial (între nanoparticulele de HAP acoperite cu vitamine adsorbite), oferind atât o eliberare de vitamine bruscă, de scurtă durată, cât și o eliberare de vitamine sustenabilă și de lungă durată. Astfel, cantitatea



de vitamină aflată interstital se eliberează rapid iar cea adsorbită pe HAP se eliberează cu efect întârziat, oferind consumatorului aportul optim de vitamine indiferent de situație.

Tabel 5. Conținutul în vitamine D și K al compozitelor sintetizate cu hidroxiapatită amorfă, HAPA* prin evaporare (vezi exemplele 1-3); pentru caracterizarea fizică și chimică a compozitelor vezi Figurile 4-6, Tabel 6.

Nr. Crt.	Compozit	HAPA (%)	D3 (%)	K2 (%)
1	HAPA-D3	94,4	5,6	-
2	HAPA-K2	96,1	-	3,9
3	HAPA-D3-K2	94,4	2,8	2,8

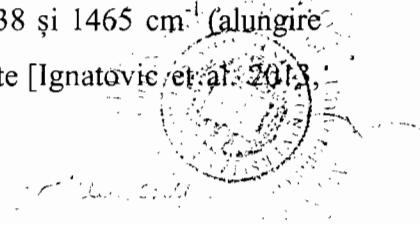
*Obs. HAPA – hidroxiapatită obținută prin precipitare urmată de liofilizare; vitamina D: vitamina D3; vitamina K: vitamina K2; HAPA-D3 reprezintă compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată, HAPA, și vitamina D3 obținut prin evaporare; HAPA-K2 este compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată, HAPA, și vitamina K2 obținut prin evaporare; HAPA-D3-K2 este compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată, HAPA, și amestecul de vitamine D3 și K2 (wD3: wK2 este 1:1), obținut prin evaporare.

Tabel 6. Absorbțiile caracteristice prezenței vitaminelor D și/sau K adsorbite pe HAPA, compozitele (HAPA-D3, HAPA-K2 sau HAPA-D3-K2) sintetizate prin evaporare, (vezi exemplele 1-3), obținute din spectrele FTIR (redate în Figura 5).

Număr de undă (cm ⁻¹)					
HAPA	D3	K2	HAPA-D3	HAPA-K2	HAPA-D3-K2
-	2933	2942	2952	2973	2932
1637,4	1647	1659	1633	1661	1661
-	-	1295	-	1296	1295

Formarea compozitelor pe bază de HAPA și cele două vitamine, atât singure cât și în amestec a fost investigată cu ajutorul analizei FTIR (Figura 5). Spectrul HAPA prezintă picurile benzilor de vibrație specifice pentru hidroxiapatită (HAP), respectiv 3570 cm⁻¹ specific grupării O-H structurale din HAP, 1637 cm⁻¹ (mod deformare apă adsorbită v2); 1092 și 1032 cm⁻¹ (alungire asimetrică PO₄ v3); 962 cm⁻¹ (alungire simetrică PO₄ v1); 633 cm⁻¹ (librație OH structural); 602 și 564 cm⁻¹ (deformare asimetrică PO₄ v4); 474 cm⁻¹ (deformare simetrică PO₄ v2).

În cazul spectrului vitaminei D3 avem picurile specifice, cele predominante fiind la 3304,1 cm⁻¹ (alungire O-H); 3077 cm⁻¹ (alungire C-H); 2933 (alungire asimetrică CH₃); 2866 cm⁻¹ (alungire simetrică CH₂); 1647 cm⁻¹ (alungire C=C); 1438 și 1465 cm⁻¹ (alungire C=C), în conformitate cu cele raportate în literatura de specialitate [Ignatovic et al. 2013].



Othayoth et al. 2015, Simana et al. 2015, Hasanvand et al. 2015, Zia et al. 2017, Trivedi et al. 2021, Balcers et al. 2022]. Prezența vitaminei D3 în compozitul HAPA-D3 este evidențiată de apariția unui pic la 2952 cm^{-1} corespondent pentru banda de absorbție maximă a vitaminei D3, prezentă în spectrul acesteia la 2953 cm^{-1} . De asemenea se poate lua în considerare și picul prezent în compozit la 1633 cm^{-1} , cu corespondență în cazul HAPA la 1637 și în spectrul D3 la 1647 cm^{-1} .

Spectrul pentru vitamina K2 prezintă picurile specifice la 2962 cm^{-1} (alungire C-H), 1659 cm^{-1} (inel aromatic $\nu(\text{C-C})$), 1617 cm^{-1} (inel chinoid $\nu(\text{C-C})$), 1295 cm^{-1} (vibrație cuplată C-C/C=C), în conformitate cu literatura de specialitate [Hellwig 2015, US Patent 2014/0314867 A1]. În compozitul HAPA-K2 se disting picurile specifice pentru vitamina K2, respectiv la $2973,1$ și 1296 cm^{-1} . În plus, se poate lua în considerare și picul prezent în compozit la 1661 cm^{-1} , cu corespondență în cazul HAPA la 1637 și în spectrul K2 la 1659 cm^{-1} .

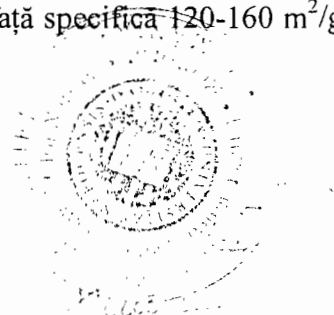
Spectrul pentru compozitul HAPA-D3-K2 este similar spectrelor celorlalte două compozite. Astfel prezența vitaminelor se poate distinge prin benzile de la 2942 , 1661 și 1295 cm^{-1} .

Conform invenției, compozitele au drept component mineral (ν , Tabel 1) HAP amorf, HAPA, HAPA1 sau HAPc și HAP amorf multisubstituit (msHAPA) cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , msHAPA1, sau msHAPc, cu suprafață specifică $120\text{-}160\text{ m}^2/\text{g}$, conjugate cu vitaminele D și K în proporție de $0,001\text{-}7\%$, de preferință $0,002\text{-}4\%$, sau amestecul acestora (în proporții egale) în proporție de $0,001\text{-}7\%$, de preferință $0,005\text{-}5\%$ al compozitului.

Conform invenției, procedeul de preparare utilizează soluții pe bază de D3 și K2, precum și alcoolul etilic și acetona în calitate de solvenți ai vitaminelor D3 și respectiv K2, soluții a căror concentrații variază între $0,2\text{-}5\%$, de preferință între $0,5\text{-}2\%$. Îndepărtarea solvenților se realizează ușor prin evaporare la temperaturi mai mici de 20°C și presiune $100\text{-}200$ torr într-un vas cu amestecare ceea ce asigură realizarea unui produs omogen.

Conform invenției, tipul de aparat în care se realizează eliminarea solventului este cu agitarea continuă a amestecului, ceea ce asigură obținerea unui produs final omogen din punct de vedere a dispersiei vitaminelor.

Avantajele compozitelor conform invenției provin din faptul că utilizează drept componentă minerală hidroxiapatite cu structură amorfă cu suprafață specifică $120\text{-}160\text{ m}^2/\text{g}$ și mare capacitate de adsorbție (Tabel 1).



Capacitatea mare de adsorbție a componentului mineral utilizat (HAP) elimină posibilitatea eliberării spontane, ceea ce conduce pe de o parte la pierderi de vitamine care sunt scumpe, și pe de altă parte poate duce la intoxicații dacă celulele nu le pot metaboliza.

Utilizarea hidroxiapatitelor multisubstituie cu microelemente Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} active (Tabel 1) ce acționează sinergic potențează activitatea vitaminelor D și K cu efectele pozitive asupra stării de sănătate a pacienților.

Conform procedurii invenția utilizează alcoolul etilic și acetonă, solvenți care pot fi ușor eliminați la temperaturi mai mici de 20 °C, fără a lăsa urme de compuși toxici evitând totodată degradarea vitaminelor în timpul evaporării solventului.

Eliminarea prin evaporare sub vid a solvenților într-un aparat prevăzut cu agitator (sau rotavapor) asigură o repartizare uniformă a vitaminelor rezultând astfel un produs omogen din punct de vedere al compoziției chimice.

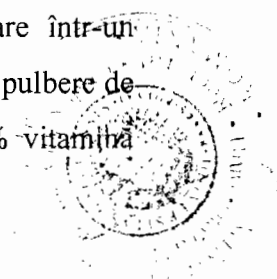
În cele ce urmează se dau 12 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Într-un balon cu dop, cotat, de 250 ml, se introduc 90 ml alcool etilic 98% peste care, sub agitare se adaugă 1,5 g vitamina D3, în condițiile în care temperatura să nu depășească 20 °C. Agitarea se continuă 45 minute până la completa dizolvare a vitaminei. În soluția alcoolică de vitamina D3 se adaugă sub agitare energetică 25 g HAP pulbere cu structură amorfă, obținută prin liofilizare (HAPA). Se continuă agitarea timp de 2 ore (500 rpm), în condiții de întuneric pentru a proteja vitamina de degradare până se stabilește echilibrul de adsorbție, timp în care temperatura din balon să nu depășească 5 °C. Suspensia astfel preparată este trecută într-un decantor și supusă evaporării într-un rotavapor la $P=100-200$ mm col Hg. Îndepărtarea completă a solventului se realizează prin liofilizare la $P=(5-10) \cdot 10^{-5}$ torr și temperatura între -30 și -35 °C. Produsul rezultat, compozitul HAPA-D3, în cantitate de 26,3 g se prezintă ca o pulbere de culoare albă cu un conținut de 5,6% vitamina D3; vezi Tabel 5, linie 1, Figura 4A, Figura 5A, Figura 6A. Similar se pot folosi HAPA1 și HAPc (Tabel 1) drept suport pentru vitamine D, respectiv vitamina D3.

Exemplul 2

Identice cu exemplul 1, cu deosebirea că solventul este acetona peste care se adaugă o cantitate de 1g vitamina K2. După eliminarea solventului și uscarea într-un liofilizator la $P=(5-10) \cdot 10^{-5}$ torr și temperatură între -30 și -35 °C se obțin 25,8 g pulbere de culoare albă cu tentă galbenă, compozitul HAPA-K2, cu concentrația de 3,9% vitamină



K2; vezi Tabel 5, linie 2, Figura 4B, Figura 5B, Figura 6B. Similar se pot folosi HAPA1 și HAPc, drept suport pentru vitamina K2.

Exemplul 3

Identic cu exemplele 1 și 2 cu deosebirea că dizolvarea vitaminelor se realizează separat, 1,5g D3 în alcool și 1,5g K2 în acetonă. După completa dizolvare a vitaminelor, cele două soluții (alcoolică cu vitamina D3 și acetonă cu vitamina K2) se amestecă, și sub agitare energetică se adaugă 50g pulbere HAP amorfă obținută prin liofilizare (HAPA). Se continuă agitarea timp de 2h (500 rpm) în condiții de întuneric pentru a proteja vitamina de degradare, până se stabilește echilibrul de adsorbție, după care se trece la îndepărtarea solvenților într-un rotavapor. După îndepărtarea solvenților pulberea obținută este trecută într-un liofilizator, unde la $P=(5-10) \cdot 10^{-5}$ torr și temperatură între -30 și -35 °C se îndepărtează urmele de solvenți. Rezultă 52,4g compozit HAPA-D3-K2, cu un conținut de 2,8% vitamina D3 și 2,8% vitamina K2; vezi Tabel 5, linie 3, Figura 4C, Figura 5C, Figura 6C. Similar se pot folosi HAPA1 și HAPc, drept suport pentru vitamina D3 și vitamina K2, folosite simultan.

Exemplul 4

Similar cu exemplul 1 cu deosebirea că drept suport pentru vitaminele D s-a utilizat hidroxiapatita multisubstituită cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , având structură amorfă, msHAPA. Similar se poate folosi msHAPA1 sau msHAPc (Tabel 1).

Exemplul 5

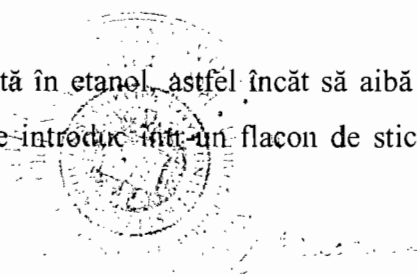
Similar cu exemplul 2 cu deosebirea că drept suport pentru vitaminele K s-a utilizat hidroxiapatita multisubstituită cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , având structură amorfă, msHAPA. Similar se poate folosi msHAPA1 sau msHAPc.

Exemplul 6

Similar cu exemplul 3 cu deosebirea că drept suport pentru vitaminele D3 și K2 s-a utilizat hidroxiapatita multisubstituită cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , având structură amorfă, msHAPA. Similar se poate folosi msHAPA1 sau msHAPc.

Exemplul 7

Vitamina D3 (colecalfiferol) a fost dizolvată în etanol, astfel încât să aibă o concentrație de 20 mg/mL. 150 mL din această soluție se introduce într-un flacon de sticlă



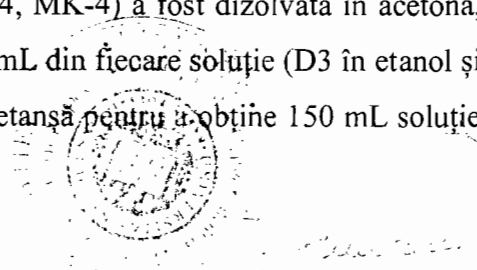
brună cu închidere etanșă. Ulterior, în acest tub se adaugă 15 g de hidroxiapatită amorfă, HAPA. Flaconul ce conține soluția de D3 și hidroxiapatita se supune unei agitări timp de 2 ore la 500 rpm în condiții de întuneric și o temperatură în intervalul 0-5 °C pentru a proteja vitamina de degradare. După 2h conținutul flaconului a fost centrifugat pentru a separa hidroxiapatita de supernatant. Cantitatea de vitamină D3 din supernatant a fost determinată cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC, Perkin Elmer Series 200) [Becze et al. 2021]. Compozitul HAPA-D3 umed a fost ulterior liofilizat pentru a îndepărta umiditatea remanentă. Cantitatea de vitamină D3 adsorbită pe nanoparticulele de hidroxiapatită HAPA s-a cuantificat prin extracție cu metanol și s-a determinat prin HPLC. Rezultă un compozit cu un conținut de 1,95% în vitamina D3; Vezi Tabel 2, linie 4. Similar se poate folosi HAPA1 sau HAPc drept suport pentru vitamina K2.

Exemplul 8

Vitamina K2 (menachinonă-4, MK-4) a fost dizolvată în acetonă, astfel încât să aibă o concentrație de 1 mg/mL. 150 mL din această soluție se introduc într-un flacon de sticlă brună cu închidere etanșă. Ulterior, în acest tub se adaugă 15 g de hidroxiapatită amorfă (HAPA). Flaconul ce conține soluția de K2 și hidroxiapatită se supune unei agitări timp de 2 ore la 500 rpm în condiții de întuneric și o temperatură în intervalul 0-5 °C pentru a proteja vitamina de degradare. După 2 h conținutul flaconului a fost centrifugat pentru a separa hidroxiapatita de supernatant. Cantitatea de vitamină K2 din supernatant a fost determinată cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC, Perkin Elmer Series 200). Compozitul HAPA-K2 a fost ulterior liofilizat pentru a îndepărta umiditatea remanentă. Cantitatea de vitamină K2 adsorbită pe nanoparticulele de hidroxiapatită HAPA s-a cuantificat prin extracție cu metanol și s-a determinat prin HPLC. Rezultă un compozit HAPA-K2 cu un conținut de 0,06% în vitamina K2; Vezi Tabel 3, linie 6. Similar se pot folosi HAPA1 și HAPc, drept suport pentru vitamina K2.

Exemplul 9

Vitamina D3 (colecalfiferol) a fost dizolvată în etanol, astfel încât să aibă o concentrație de 1 mg/mL. Vitamina K2 (menachinonă-4, MK-4) a fost dizolvată în acetonă, astfel încât să aibă o concentrație de 1 mg/mL. Câte 75 mL din fiecare soluție (D3 în etanol și K2 în acetonă) se amestecă într-un flacon cu închidere etanșă pentru a obține 150 mL soluție



finală de 1 mg/mL (D3+K2). Peste soluția din flacon se adaugă 15 g hidroxiapatită amorfă, liofilizată. Flaconul ce conține soluția de D3+K2 și hidroxiapatită se supune unei agitări timp de 2 ore la 500 rpm în condiții de întuneric și o temperatură în intervalul 0-5 °C pentru a proteja vitamina de degradare. După 2 h conținutul flaconului a fost centrifugat pentru a separa hidroxiapatita de supernatant. Cantitatea de vitamine D3 și K2 din supernatant a fost determinată cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC, Perkin Elmer Series 200). Compozitul HAPA-D3-K2 umed a fost ulterior liofilizat pentru a îndepărta umiditatea remanentă. Cantitatea de amestec de vitamine (D3+K2), adsorbită pe nanoparticulele de hidroxiapatită s-a cuantificat prin extracție cu metanol și s-a determinat prin HPLC. Rezultă un compozit HAPA-D3-K2 pulbere cu un conținut de 0,05% în vitamina D3 și 0,04% în vitamina K2; Vezi Tabel 4, linie 6. Similar se pot folosi HAPA1 și HAPc, drept suport pentru vitamina D3 și vitamina K2.

Exemplul 10

Similar cu exemplul 7 cu deosebirea că drept suport pentru vitaminele D s-a utilizat hidroxiapatita multisubstituită cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , având structură amorfă, msHAPA respectiv msHAPA1 sau cristalină msHAPc.

Exemplul 11

Similar cu exemplul 8 cu deosebirea că drept suport pentru vitaminele K s-a utilizat hidroxiapatita multisubstituită cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , având structură amorfă, msHAPA respectiv msHAPA1 sau cristalină msHAPc.

Exemplul 12

Similar cu exemplul 9 cu deosebirea că drept suport pentru vitaminele D și K s-a utilizat hidroxiapatita multisubstituită cu Sr^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , având structură amorfă, msHAPA respectiv msHAPA1 sau cristalină msHAPc.



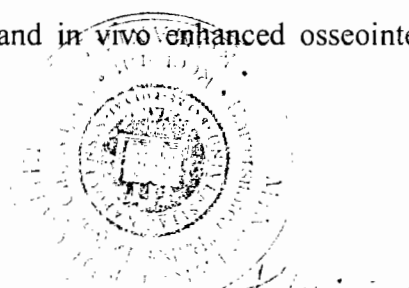
secțiune transversală pe direcția săgeții din imaginea a); aria de scanare 1 μm x 1 μm; unde HAPA-hidroxiapatită amorfă obținută prin precipitare urmată de liofilizare; D3 – vitamina D3; K2 – vitamina K2; HAPA-D3 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și vitamina D3 obținut prin evaporare; HAPA-K2 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și vitamina K2 obținut prin evaporare; HAPA-D3-K2 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și amestecul de vitamine D3 și K2 (wD3:wK2 este 1:1), obținut prin evaporare.

Bibliografie

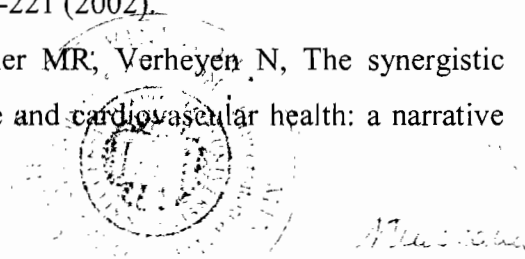
Articole:

- Andrew M, The relevance of developmental hemostasis to hemorrhagic disorders of newborns, *Seminars in Perinatology*, Elsevier, 21(1), 70-85 (1997).
- Azizova UH, Baghirova SA, Rahimova RR, Dashdamirova GS, Vitamin D: Structure and mechanism of action, *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, 9(3), 36-41 (2022).
- Becze A, Babalau Fuss VL, Scurtu DA, Tomoaia-Cotisel M, Mocanu A, Cadar O, Simultaneous Determination of Vitamins D3 (Calcitriol, Cholecalciferol) and K2 (Menaquinone-4 and Menaquinone-7) in Dietary Supplements by UHPLC, *Molecules* 26(22), 6982 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26226982>
- Balcers O, Miranda U, Veilande R, Study of ergocalciferol and cholecalciferol (Vitamin D): Modeled optical properties and optical detection using absorption and Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 269, 120725 (2022).
- Bane TA, Bertels JC, Polkoff KM, Rubessa M, Wheeler MB, The effects of vitamin D3, Vitamin B12, and Vitamin K on the differentiation of porcine adipose-derived stem cells (ASC) into osteoblasts, *Journal of Biology Engineering and Medicine*, 2(1), 1-5 (2020). <http://dx.doi.org/10.31487/j.jbeem.2020.01.01>
- Garbo C, Locs J, D'Este M, Demazeau G, Mocanu A, Roman C, Horovitz O, Tomoaia-Cotisel M, Advanced Mg, Zn, Sr, Si Multi-Substituted Hydroxyapatites for Bone Regeneration, *International Journal of Nanomedicine*, 15, 1037-1058 (2020).
- Hasanvand E, Fathi M, Bassiri A, Javanmard M, Abbaszadeh R, Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization, *Food and Bioproducts Processing*, 96, 264-277 (2015).

- Hellwig P, Infrared spectroscopic markers of quinones in proteins from the respiratory chain, *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1874(1), 126-133 (2015).
- Hu L, Ji J, Li D, Meng J, Yu B, The combined effect of vitamin K and calcium on bone mineral density in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16, 592 (2021).
- Ignatovic N, Uskokovic V, Ajdukovic Z, Uskokovic D, Multifunctional hydroxyapatite and poly(D,L lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol, *Materials Science and Engineering C*, 33(2), 943-950 (2013).
- Ivanova D, Zhelev Z, Getsov P, Nikolova B, Aoki I, Higashi T, Bakalova R, Vitamin K: Redox-modulation, prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect, *Redox Biology*, 16, 352-358 (2018).
- Koshihara Y, Hoshi K, Ishibashi H, Shiraki M, Vitamin K2 promotes $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamin D3-induced mineralization in human periosteal osteoblasts, *Calcified Tissue International*, 59(6), 466-473 (1996).
- Kuroda T, Uenishi K, Ohta H, Shiraki M, Multiple vitamin deficiencies additively increase the risk of incident fractures in Japanese postmenopausal women, *Osteoporosis International*, 30(3), 593-599 (2019).
- Li W, Zhang S, Liu J, Liu Y, Liang Q, Vitamin K2 stimulates MC3T3-E1 osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction, *Molecular Medicine Reports*, 19(5), 3676-3684 (2019).
- Mandatori D, Pelusi L, Schiavone V, Pipino C, Di Pietro N, Pandolfi A, The dual role of vitamin K2 in “bone-vascular crosstalk”: opposite effects on bone loss and vascular calcification, *Nutrients*, 13(4), 1222 (2021).
- Oltean-Dan D, Dogaru G-B, Tomoaia-Cotisel M, Apostu D, Mester A, Benea H-R-C, Paiusan M-G, Jianu E-M, Mocanu A, Popa C-O, Berce C, Bodizs G-I, Toader A-M, Tomoaia Gh, Enhancement of bone consolidation using high-frequency pulsed electromagnetic short-waves and titanium implants coated with biomimetic composite embedded into PLA matrix: in vivo evaluation, *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5799-5816 (2019).
- Oltean-Dan D, Dogaru G-B, Jianu E-M, Riga S, Tomoaia-Cotisel M, Mocanu A, Barbu-Tudoran L, Tomoaia Gh, Biomimetic composite coatings for activation of titanium implant surfaces: methodological approach and in vivo enhanced osseointegration, *Micromachines*, 12(11), 1325 (2021).



- Othayoth R, Mathi P, Bheemanapally K, Kakarla L, Botlagunta M, Characterization of vitamin–cisplatin-loaded chitosan nano-particles for chemoprevention and cancer fatigue, *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers*, 32(6), 578-588 (2015).
- Price PA, Baukol SA, 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells, *Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 11660-11663 (1980).
- Rodriguez-Olleros Rodriguez C, Diaz Curiel M, Vitamin K and bone health: a review on the effects of vitamin K deficiency and supplementation and the effect of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants on different bone parameters, *Journal of Osteoporosis*, 2069176 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/2069176>
- Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D'Erasmus E, Carnevale V, Scillitani A, Minisola S, Short and long-term variations in serum calciotropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (Vitamin D2) or cholecalciferol (Vitamin D3) in the elderly, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(8), 3015-3020 (2008).
- Sanguineti R, Monacelli F, Parodi A, Furfaro .L, Borghi R, Pacini, D, Pronzato MA, Odetti P, Molfetta L, Traverso N, Vitamins D3 and K2 may partially counterbalance the detrimental effects of pentosidine in ex vivo human osteoblasts, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 30(3), 713-726 (2016).
- Sato T, Schurgers LJ, Uenishi K, Comparison of menaquinone-4 and menaquinone-7 bioavailability in healthy women, *Nutrition Journal*, 11, 93 (2012).
- Simana E, Simian R, Portnoy S, Jaffe A, Dekel BZ, Feasibility study – vitamin D loading determination by FTIR-ATR, *Information and Control Systems*, 76(3), 107-111 (2015).
- Trivedi MK, Jana S, Assessment of physical, thermal and spectral properties of consciousness energy treated cholecalciferol, *Journal of Advances in Nanotechnology*, 1(3), 56-73 (2021).
- Tsugawa N, Shiraki M, Vitamin K nutrition and bone health, *Nutrients* 12(7), 1909 (2020).
- Ushiroyama T, Ikeda A, Ueki M, Effect of continuous combined therapy with vitamin K2 and vitamin D3 on bone mineral density and coagulofibrinolysis function in postmenopausal women, *Maturitas*, 41(3), 211-221 (2002).
- van Ballegooijen AJ, Pilz S, Tomaschitz A, Grubler MR, Verheyen N, The synergistic interplay between vitamins D and K for bone and cardiovascular health: a narrative



review, International Journal of Endocrinology, 7454376 (2017).
<https://doi.org/10.1155/2017/7454376>

Zia R, Nazir A, Iqbal Khan MK, Aslam Maan A, Rashid A, Preparation of ascorbic acid and cholecalciferol microsponges for topical application, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 9(10), 280-287 (2017).

Brevete:

Aoki H, Ozeki K, Hashimoto H, Yajima T (2005) Vitamin apatite composite material (Japanese patent, JP2007153842A), Japan Patent Office, in Japanese.

Aukrust IR, Larsson HM, Rove T (2021) Formulations of fat-soluble vitamins (European patent, EP 3 139 904 B1), European Patent Office.

Elaraqi KT, Broze G, Leruite A (2017) Stabilized active compounds (United States patent, US 9,757,331 B2), United States Patent Office.

Goldberg AM, Dills S, Mark W, Sutton B, Byerley C (2014) Stability in vitamin and mineral supplements (United States patent, US 2014/0220151 A1), United States Patent Office.

Krumhar KC, Johnson HA (2006) Composition for promoting healthy bone structure (United States patent, US 7,029,703 B2), United States Patent Office.

Li J (2004) Nanometer grade hydroxyapatite composition for replenishing calcium (United States patent, US 2004/0009235 A1), United States Patent Office.

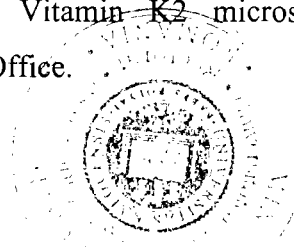
Schaffler A, Wildner C (1998), Stable solid preparation containing vitamin D3 and tricalcium phosphate (Australian patent, AU 199864997 B2), Australian Patent Office.

Shao S, Hu GSJ, Zhou X, Xie L (2013) Nutritional composition for calcium supplement (Chinese patent, CN103202483A), Chinese Patent Office, in Chinese.

Tomoaia-Cotisel M, Mocanu A, Pop A, Garbo CL, Tomoaia Gh, Roman C, Cadar O, Racz C-P (2021) Nanomateriale pe baza de hidroxiapatită multisubstituită și procedeu de obținere a acestora (Romanian patent, RO 133124), BOPI 8/2021, Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci.

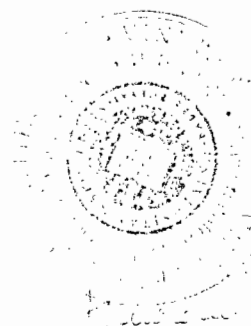
Tomoaia Gh, Tomoaia-Cotisel M, Pop LB, Mocanu A, Pop A (2013) Nanopulberi de hidroxiapatită și derivații ei substituiți, utilizate în scopuri medicale și procedeu de fabricare a acestora (Romanian patent, RO 125817), BOPI 6/2013, Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci.

Whu S-W, Cheng C-C, Yang C-C (2014) Vitamin K2 microspheres (US Patent 2014/0314867 A1), United States Patent Office.



Revendicări

1. Compozite pe bază de hidroxiapatite, utilizate în medicina regenerativă osoasă, caracterizate prin aceea că utilizează drept suport mineral pentru vitaminele D și/sau K hidroxiapatite preferabil cu suprafață specifică de 120-160 m²/g, hidroxiapatite stoechiometrice simple sau hidroxiapatite multisubstituite cu ioni Sr²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, SiO₄⁴⁻, în proporție de 2-40%, de preferință 5-20%, obținute prin liofilizare, amorfe necalcinate, sau calcinate având diverse grade de cristalinitate.
2. Compozite pe bază de hidroxiapatite utilizate în medicina regenerativă osoasă, conform revendicării 1 caracterizate prin aceea că hidroxiapatita simplă sau multisubstituită este conjugată cu vitaminele D și/sau K în proporție de 0,001-7%, de preferință 0,02-4%.
3. Compozite pe bază de hidroxiapatite utilizate în medicina regenerativă osoasă conform revendicărilor 1 și 2 caracterizate prin aceea că hidroxiapatita simplă sau multisubstituită este conjugată cu vitaminele D3 și/sau K2 în proporție de 0,001-7%, de preferință 0,005-5%.
4. Procedul de obținere al compozitelor conform revendicărilor 1, 2 și 3 caracterizat prin aceea că utilizează drept solvenți alcoolul etilic pentru vitaminele D respectiv acetona pentru vitaminele K.
5. Procedul de obținere a compozitelor conform revendicării 4 caracterizat prin aceea că concentrația soluției alcoolice de vitamina D3, respectiv vitamina K2 în acetonă, este în limitele 0,2-5%, de preferință 0,5-2%.
6. Procedul de obținere a compozitelor conform revendicărilor 4 și 5 caracterizat prin aceea că îndepărtarea solvenților se realizează prin evaporare sub vid într-un rotavapor sau alt vas cu agitare legat la vid.



Figuri

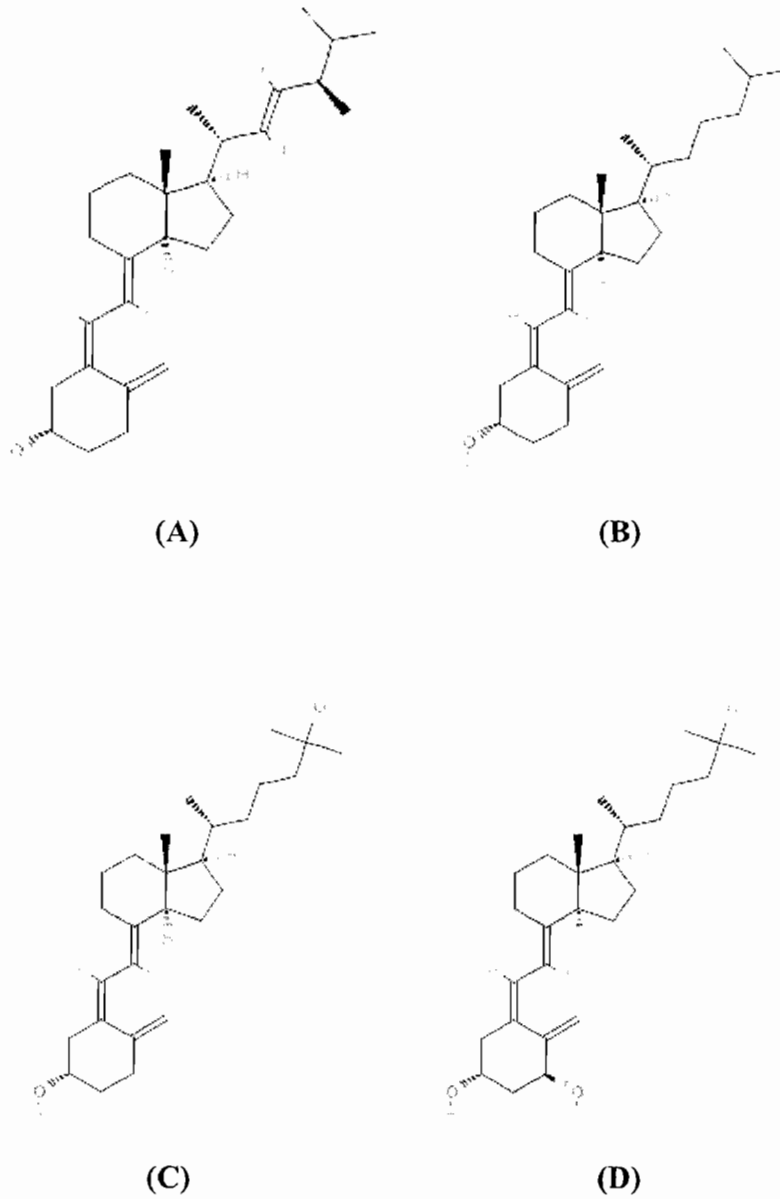


Figura 1. Structurile vitaminei D: A) ergocalciferol (vitamina D2); B) colecalciferol (vitamina D3); C) 25 hidroxi-colecalciferol (25(OH)D3); D) 1,25 dihidroxi-colecalciferol (1,25(OH)₂D3).



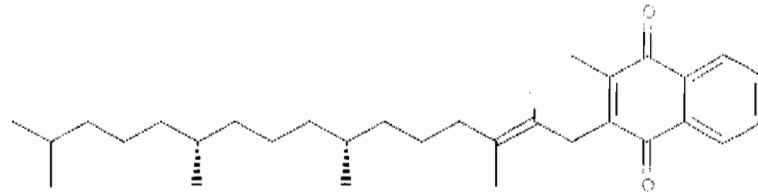
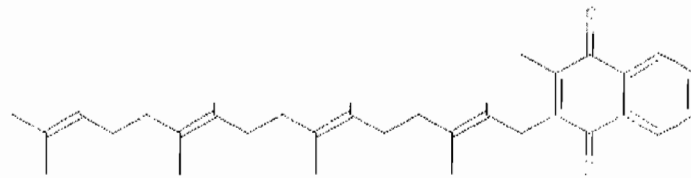
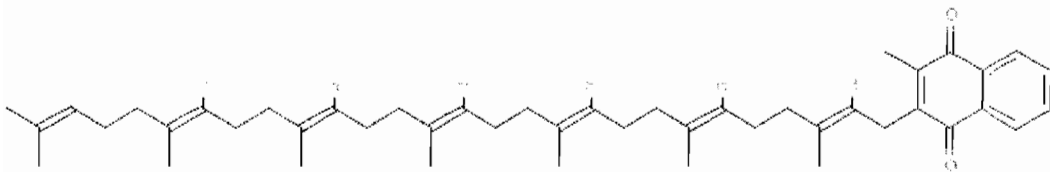
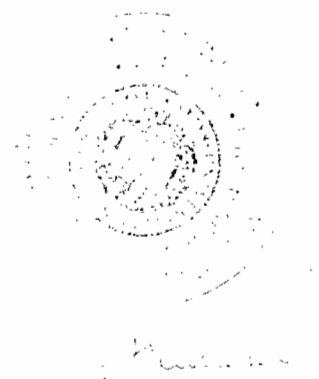
**A****B****C**

Figura 2. Structura vitaminelor K: A) vitamina K1 (filochinonă) și vitamina K2: B) menachinonă-4 (MK-4) și C) menachinonă-7 (MK-7).



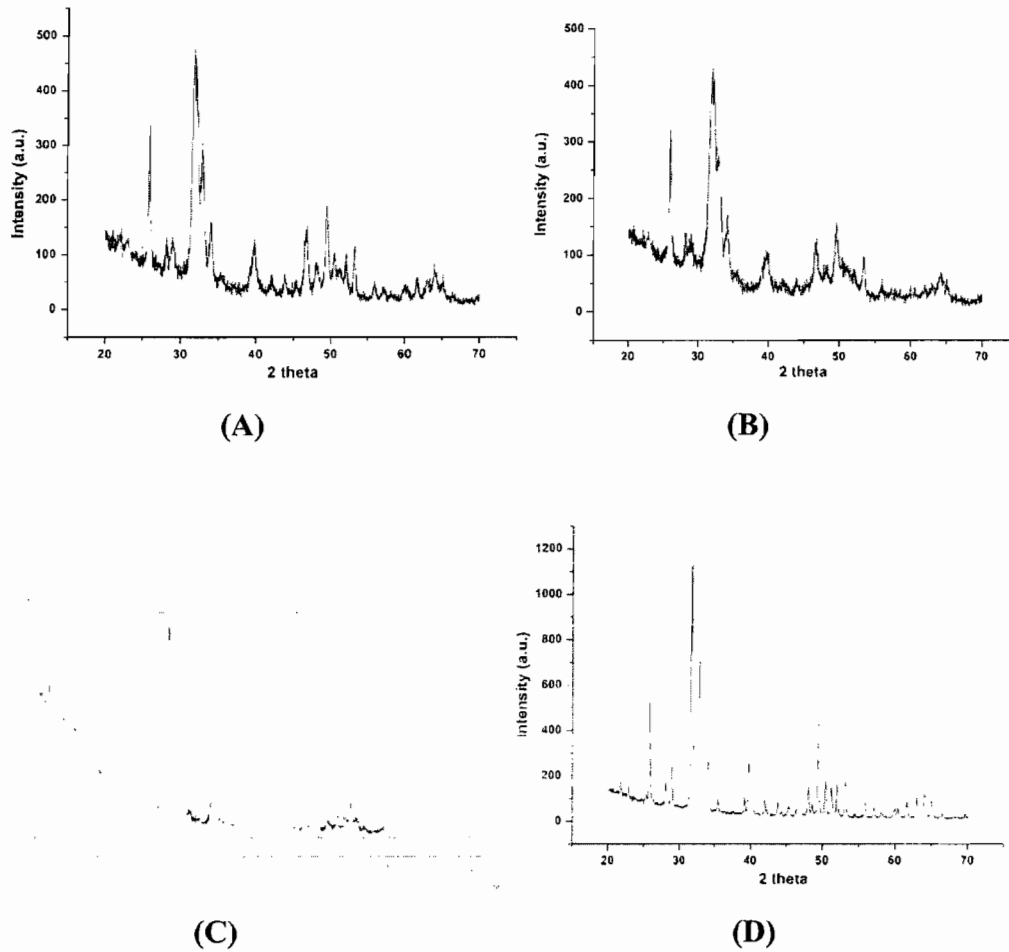
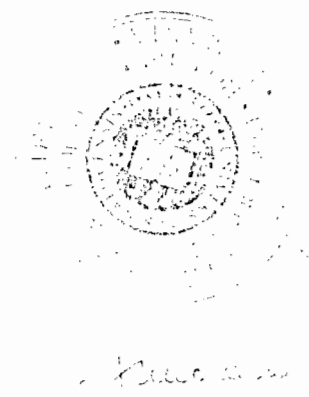


Figura 3. XRD pentru (A) HAPA; (B) msHAPA; (C) HAPA1; (D) HAPc; unde HAPA-pulbere obținută prin precipitare urmată de liofilizare; msHAPA - pulbere HAP multisubstituită obținută prin precipitare urmată de liofilizare; HAPA1-pulbere obținută prin precipitare urmată de liofilizare și calcinare la 300 °C, 1h; HAPc-pulbere obținută prin precipitare urmată de liofilizare și calcinare la 850 °C, 4h.



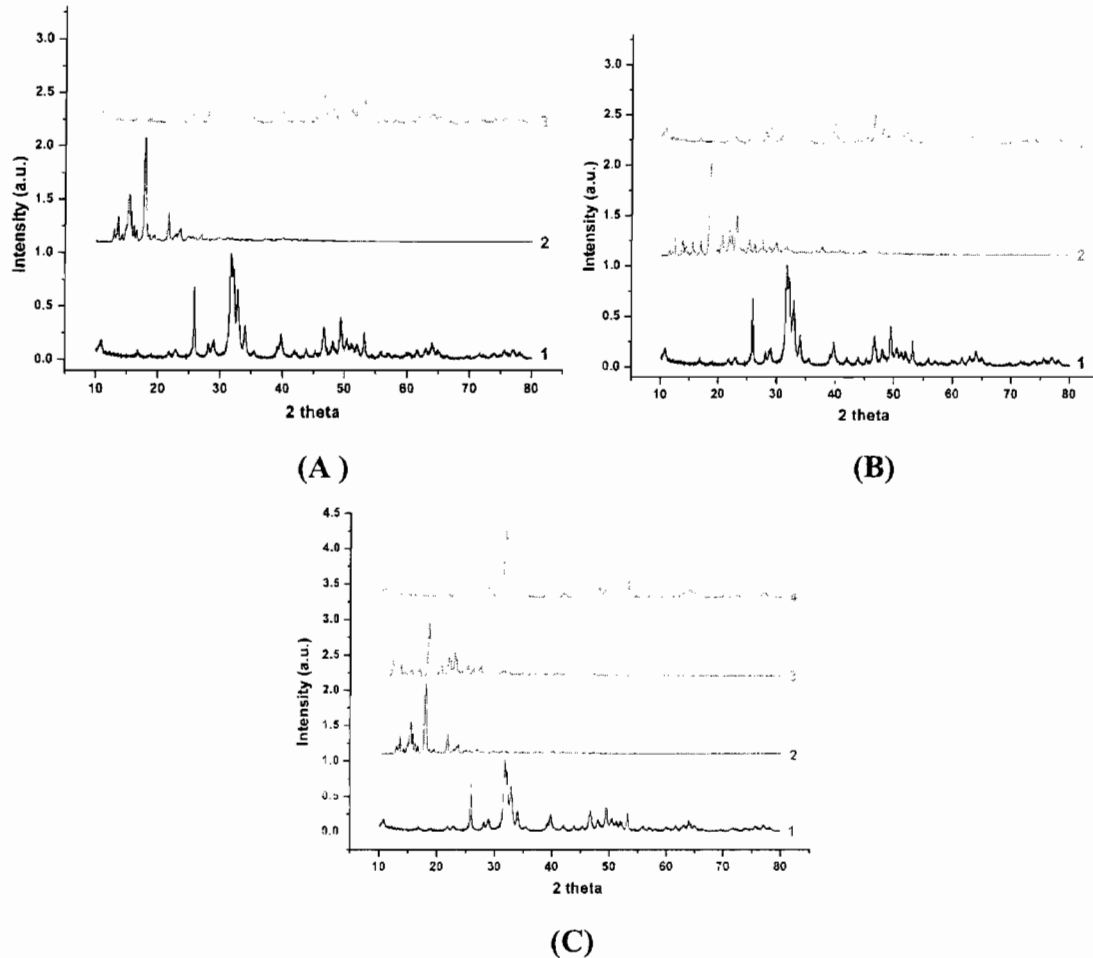


Figura. 4 XRD pentru (A): 1-HAPA, 2-D3, 3-HAPA-D3; (B): 1-HAPA, 2-K2, 3-HAPA-K2; (C): 1-HAPA, 2-D3, 3-K2, 4-HAPA-D3-K2; unde HAPA-hidroxiapatită obținută prin precipitare urmată de liofilizare; D3 – vitamina D3; K2 – vitamina K2; HAPA-D3 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și vitamina D3 obținut prin evaporare; HAPA-K2 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și vitamina K2 obținut prin evaporare; HAPA-D3-K2 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și amestecul de vitamine D3 și K2 (wD3: wK2 este 1:1), obținut prin evaporare.



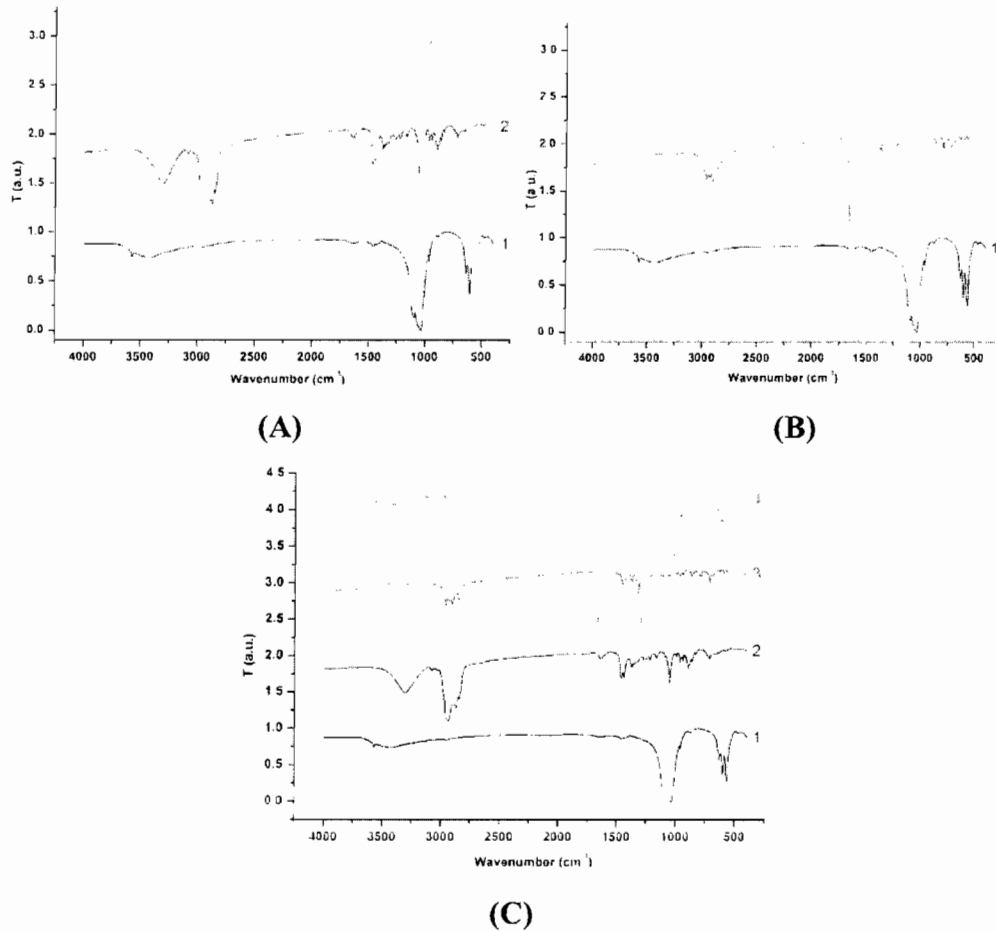


Figura 5. Spectrele FTIR pentru (A): 1-HAPA, 2-D3, 3-HAPA-D3; (B): 1-HAPA, 2-K2, 3-HAPA-K2; (C): 1-HAPA, 2-D3, 3-K2, 4-HAPA-D3-K2 (vezi Tabel 6); unde HAPA-hidroxiapatită amorfă obținută prin precipitare urmată de liofilizare; D3 – vitamina D3; K2 – vitamina K2; HAPA-D3 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și vitamina D3 obținut prin evaporare; HAPA-K2 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și vitamina K2 obținut prin evaporare; HAPA-D3-K2 – compozitul pe bază de hidroxiapatită liofilizată și amestecul de vitamine D3 și K2 (wD3: wK2 este 1:1), obținut prin evaporare.



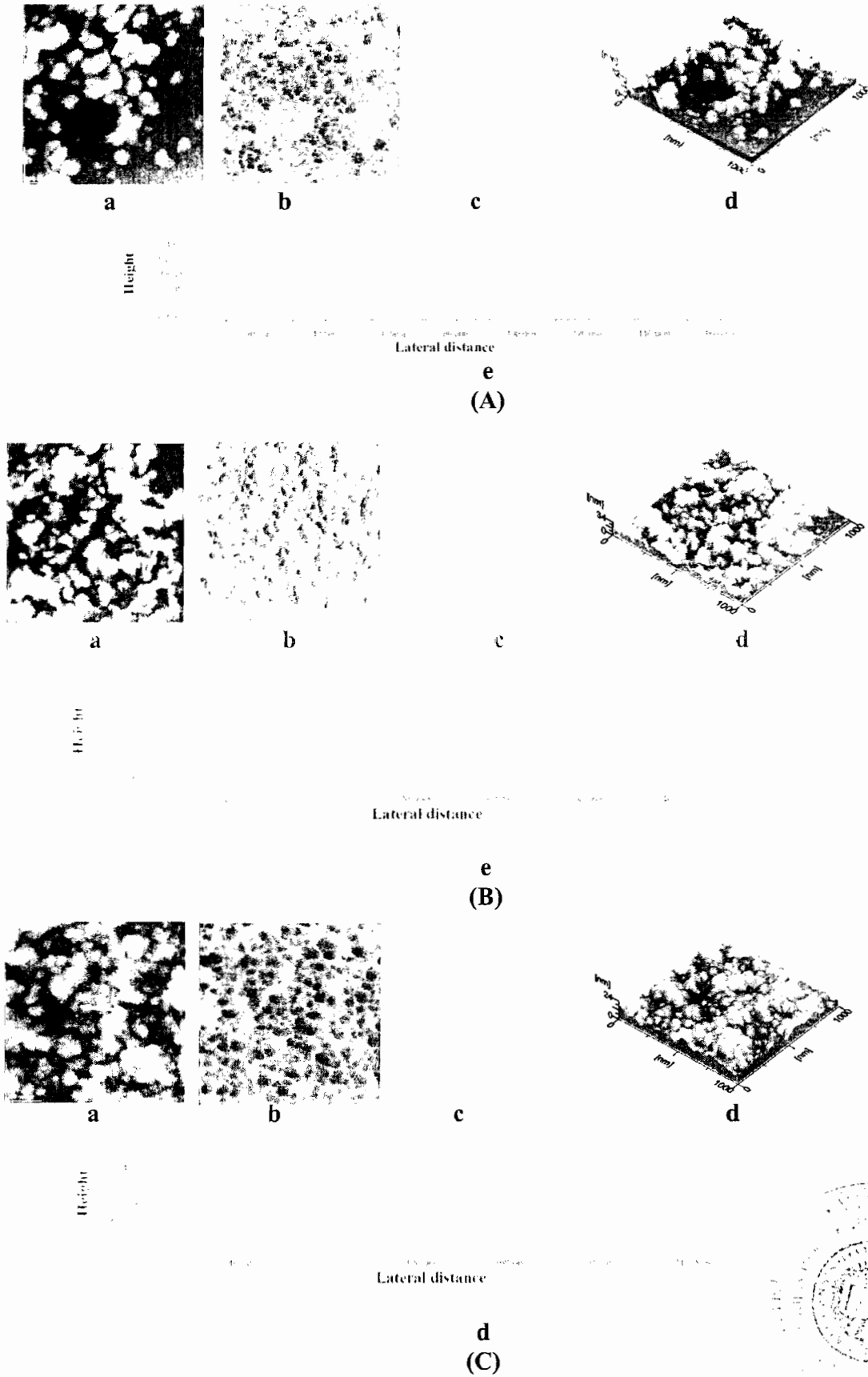


Figura 6. Imagini AFM pentru (A) HAPA-D3; (B) HAPA-K2; (C) HAPA-D3-K2, unde a) topografie 2D, b) imagine de fază, c) imagine de amplitudine, d) topografie 3D, e) profil.