



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00590**

(22) Data de depozit: **28/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2023 BOPI nr. **3/2023**

(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) **SISTEM BIOCERAMIC COMPLEX DE TIPUL ZnHAp/ZnO
PENTRU REGENERAREA ȚESUTURILOR, PREVENȚIA
ȘI TRATAMENTUL OSTEOPOROZEI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor materiale biocompozite ceramice pe bază de hidroxiapatită dopată cu zinc (ZnHAp) și oxid de zinc (ZnO) cu proprietăți osteoconductive și antimicrobiene utilizate pentru regenerarea țesuturilor osoase. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare a nanoparticulelor de ZnO, sinteza hidroxiapatitei dopată cu Zn, prin metoda sol-gel, în condiții atmosferice, la temperatura de 100°C, în două trepte, menținerea pH soluție la 11 și agitarea lentă timp de 24 h la temperatura de

100°C până la formarea unui gel, spălarea gelului cu apă bidistilată și etanol, rezultând un sistem bioceramic de tip ZnHAp-ZnO stabil și cu proprietăți biologice eficiente, care asigură eliberare imediată și pe termen lung, cât și eliberarea controlată a ionilor de Zn²⁺ la locul implantării în zona afectată.

Revendicări: 7
Figuri: 8



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2021 00590
Data depozit 28-09-2021..

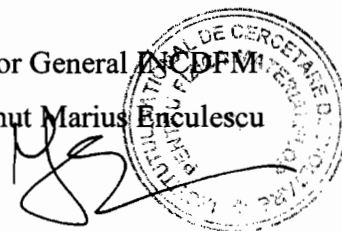
RO 137327 A2 6059

Sistem bioceramic complex de tipul ZnHAp/ZnO pentru regenerarea tesuturilor, prevenția și tratamentul osteoporozei

Prezentul brevet se referă la realizarea unui sistem bioceramic complex de tipul ZnHAp/ZnO pentru regenerarea tesuturilor osoase și pentru prevenția și tratamentul osteoporozei. Osteoporoza este o afecțiune sistemică a scheletului caracterizată prin scăderea masei osoase, însoțită de deteriorarea microarhitecturală a tesutului osos și printr-un risc crescut de fracturare /1-3/. Pe baza criteriilor Organizației Mondiale a Sănătății, osteoporoza poate fi definită pe baza măsurătorilor densității minerale osoase și a conținutului mineral al osului. Dieta alimentară cu supliment de calciu și vitamina D nu este suficientă în tratarea osteoporozei, astfel încât fracturile osteoporotice care apar la nivelul soldului și coloanei vertebrale cresc rata mortalității până la 10-20%. Osteoporoza este una dintre cele mai frecvente boli metabolice osoase, incidența cazurilor fiind foarte ridicată /1,4/. În prezent, sunt realizate studii pentru a dezvolta biomateriale cu proprietăți în regenerarea și vindecarea fracturilor și înlocuirea oaselor distruse. Până în prezent, grefarea osoasă spongioasă autogenă este elementul de bază pentru a stimula vindecarea osoasă în defectele cauzate de fracturi, în ciuda comorbidităților rezultate la locul donatorului și a potențialului osteogenic afectat în grefe osoase la varstnici cu oase osteoporotice /5/. Un potențial important în regenerarea osoasă îl are ca biomaterial, hidroxiapatita, folosit datorită proprietăților sale de osteoconductivitate, ca și grefa pentru umplerea defectelor cauzate de fracturi. Proprietățile osteoconductive ale hidroxiapatitei sunt promitoare în tratarea osteoporozei /6/. Hidroxiapatita simplă, are proprietăți mecanice reduse, solubilitate redusă, activitate antimicrobiană și interacțiuni biologice reduse, ceea ce îi limitează aplicațiile ortopedice /7/.

Soluția propusă este obținerea de materiale biocompozite pe baza de hidroxiapatita dopată cu zinc (ZnHAp) și oxid de zinc (ZnO) care poate îmbunătăți proprietățile osteoconductive și antimicrobiene. În acest sens s-au elaborat materiale de tipul bioceramicilor ZnHAp în care are loc substituția parțială a ionilor de Ca^{2+} cu cei de Zn^{2+} , astfel încât procesul de eliberare a ionilor de Zn^{2+} este lent. Pentru a asigura atât o eliberare imediată cât și pe termen lung a ionilor de Zn^{2+} la locul implantării, este necesară obținerea de bioceramici complexe pe baza de hidroxiapatita dopată cu zinc și oxid de zinc (ZnHAp/ZnO) pentru a cumula proprietățile celor două materiale asigurând eliberarea controlată. Pentru obținerea nanoparticulelor de ZnO s-a pornit de la

Director General INCDPM
Dr. Ionuț Marius Enculescu



dizolvarea precursorului de Zn respectiv, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ si a NaOH in apa distilata prin agitare magnetica in doua vase separate. Ulterior, solutia de NaOH a fost adaugata prin picurare in solutia percursoare de Zn^{2+} sub agitare magnetica la o temperatura de $50^{\circ}C$ formandu-se un precipitat alb. Amestecul rezultat a fost filtrat si spalat pana s-a obtinut un pH neutru. De asemenea, s-a masurat conductivitatea pentru a confirma eliminarea ionilor NO_3^{2-} nereactionati. Ulterior, amestecul a fost uscat in etuva la $60^{\circ}C$ timp de 24 ore si supus tratamentului termic $500^{\circ}C/2$ ore cu $10^{\circ}/min$ viteza de incalzire.

Pentru obtinerea hidroxiapatitei dopate cu zinc, $Ca_{10-x}Zn_x(PO_4)_6(OH)_2$, s-a utilizat o metoda *sol-gel* adaptata prin stabilirea indicilor de compozitie $x=0$ (HAp), $x=0.07$ (7ZnHAp), $x=0.1$ (10ZnHAp) si $x=0.2$ (20ZnHAp) si $(Ca+Zn)/P= 1.67 /8-12/$, unde sinteza a fost efectuata in conditii atmosferice, la o temperatura de $100^{\circ}C$. In prima etapa, $(NH_4)_2HPO_4$ a fost dizolvat in etanol absolut, folosind un agitator magnetic pentru a obtine solutia care contine fosfor (P). In a doua etapa s-a obtinut solutia ce contine (Ca+Zn) prin dizolvarea $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ si a $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ intr-un pahar Berzelius cu apa distilata, in conditii de agitare continua. Solutia care contine P s-a adaugat prin picurare in solutia care contine (Ca+Zn) sub agitare continua la $100^{\circ}C$. Valoarea pH-ului solutiei a fost mentinuta la 11 prin adaugarea de NH_4OH , iar solutia rezultata a fost agitata lent timp de 24 ore la temperatura de $100^{\circ}C$ pana la formarea unui gel. Gelul rezultat a fost spalat de cinci ori utilizand apa bidistilata si etanol si redispersat apoi in apa bidistilata.

Caracterizarea structurala a sistemului bioceramic complex ZnHAp-ZnO s-a realizat prin microscopie electronica in transmisie (MET) si microscopie electronica in transmisie de inalta rezolutie (METIR), identificandu-se dupa cum se poate observa in Figura 1 distributia si compozitia fazelor prezente. Imaginile MET in camp luminos pentru materialele compozite pe baza de ZnHAp ($x=0.1$ (10ZnHAp)) si ZnO 1% si 3% pun in evidenta particule sub forma unor baghete. Legat de morfologie, se observa forma neregulata a particulelor si tendinta acestora de a forma agregate. Tendinta de aglomerare scade odata cu cresterea concentratiei de Zn^{2+} , particulele fiind bine cristalizate. Analiza compozitionala din spectrele EDS indica prezenta elementului Zn in cazul ambelor probe, cu cresterea proportiei de Zn^{2+} la cresterea concentratiei de ZnO. Analiza prin difractie de raze X (DRX) a bioceramicilor ZnHAp (in gradele de substitutie 5, 10, 20%) si

Director General INCDEM

Dr. Ionut Marius Enulescu

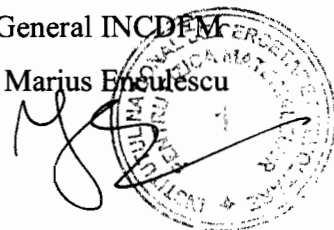


ZnO 1% a indicat prezenta a doi compusi mineralogici principali, respectiv hidroxiapatita si oxidul de zinc. Difractograma de raze X se poate observa in Figura 2, unde hidroxiapatita identificata face parte din sistemul hexagonal P63/m/13/ iar oxidul de zinc din sistemul cristalin hexagonal P63mc, unde substitutia ionilor de Ca^{2+} cu Zn^{2+} din structura HAp determina modificari ale intensitatii maximelor de difractie corespunzatoare celor doua faze cristaline. Astfel, maximul corespunzator ZnO de la unghiul $2\theta=33^{\circ}$ scade cu cresterea gradului de substitutie a Zn^{2+} , datorita disocierii ionilor Zn^{2+} din structura ZnO si substitutiei ulterioara a ionilor de Ca^{2+} . In cazul bioceramicelor ZnHAp au fost identificati compusii mineralogici principali HAp si ZnO, iar in cazul probelor cu ZnO 3% apar maxime de difractie la valoarea unghiului 37° cu o intensitate crescuta pentru proba cu grad de substitutie 20% datorata concentratiei crescute de ZnO. Rezultatul caracterizarii prin spectroscopie Raman se observa in Figura 3 in domeniul spectral $(200-1200)cm^{-1}$. In spectre se identifica maximul principal de la $964 cm^{-1}$ asociat gruparii PO_4^{3-} (legatura P-O) caracteristic hidroxiapatitei /14,15/, iar maximele secundare secundare ale aceleiasi faze se observa la $432 cm^{-1}$, $581 cm^{-1}$, $704 cm^{-1}$, $1049 cm^{-1}$ si $1078 cm^{-1}$. Pentru HAp substituita in proportii diferite cu ioni de zinc si compozit ZnO se observa o usoara deplasare spre stanga a benzilor specifice PO_4^{3-} fata de HAp, datorata substitutiei ionilor Ca^{2+} cu Zn^{2+} . Intensitatile spectrelor Raman caracteristice HAp pentru cele trei grade de substitutie scad odata cu cresterea concentratiei de zinc.

Spectrul de analiza tip FT-IR este prezentat in Figura 4 pentru domeniul de lungimi de unda $(400-4000) cm^{-1}$. Spectrele indica pentru HAp in cele trei grade de substitutie 5,10,20% si ZnO 1% prezenta gruparii PO_4^{3-} in banda de absorbtie $562 cm^{-1}$ si $1025 cm^{-1}$ caracteristica HAp, ultimul maxim avand o scadere in intensitate odata cu cresterea concentratiei ionilor Zn^{2+} . Legatura O-H este pusa in legatura cu banda de absorbtie larga de la $(2800 - 3600 cm^{-1})$ iar banda de absorbtie de la $600 cm^{-1}$ este tipica pentru HAp sintetizata stoichiometric. Maximul de absorbtie cu intensitate relativ scazuta de la $1419 cm^{-1}$ este caracteristic gruparii CO_3^{2-} fapt care demonstreaza obtinerea hidroxiapatitei carbonatate, contribuind la cresterea biomimetismului compozitului obtinut, ceea ce favorizeaza procesul de osteoregenerare /16/. In spectrele FTIR ale materialelor compozite ZnHAp, se observa ca cresterea concentratiei de ZnO de la 1% la 3% nu duce la aparitia unor noi maxime de absorbtie, mentinandu-se structura tipica de apatita, cu modificari la nivelul

Director General INCDEM

Dr. Ionut Marius Enculescu



intensitatii maximelor de absorbtie datorate prezentei ionilor de Zn^{2+} . Caracterizarea prin microscopie electronica de baleiaj (MEB) prezentata in Figura 5 evidentiaza dimensiunile, forma si caracteristicile morfologice ale pulberilor. Astfel, dimensiunile de particule sunt mai mici de 10 nm, observandu-se formarea unor agregate cu caracter neregulat de morfologii diferite. Probele de HAp substituita cu ioni de zinc (5,10,20%) si compozit de ZnO 1% respectiv 3% prezinta forma unor aglomerate cu morfologie preponderant sferica, neremarandu-se modificari morfologice majore la cresterea concentratiei de Zn^{2+} de la 5% la 10% si 20% respectiv ZnO de la 1% la 3%.

Analiza concentratiei de zinc s-a realizat si prin studii de eliberare a ionilor de zinc prin spectroscopie de masa cu plasma cuplata inductiv (ICP-MS). Masuratorile au fost efectuate pentru izotopul Zn^{66} iar cuantificarea rezultatelor s-a facut prin metoda calibrarii externe. Utilizand aceasta metoda, a fost determinata compozitia elementala a bioceramicilor pe baza de ZnHAp si ZnO. S-a observat ca in cazul probelor cu ZnO 1% concentratia ionilor de Zn^{2+} creste odata cu cresterea gradului de substitutie al ionilor de Ca^{2+} din structura HAp (de la $\sim 2.7 \mu g/mg$ pana la $\sim 10 \mu g/mg$), in schimb in cazul probelor ZnO 3% scaderea concentratiei ionilor de Zn^{2+} o data cu cresterea gradului de substitutie (de la $\sim 11 \mu g/mg$ la $7 \mu g/mg$) este corelata cu informatiile din analiza DRX, astfel incat la concentratii crescute de ZnO in materialul compozit, efectul disocierii si implicit al substitutiei ionilor de Ca^{2+} cu ionii de Zn^{2+} este sesizabil. Studiile cantitative prin metoda absorbtiei atomice aduc informatii privind compozitia elementala a sistemului bioceramic ZnHAp/ZnO privind influenta concentratiei de zinc in prezenta oxidului de zinc. Astfel, rezultatele au evidentiat o crestere a concentratiei de zinc din probe 7ZnHAp/ZnO_0.01 analizate comparativ cu probele 7ZnHAp si care au fost in acord cu calculele teoretice, iar sistemul bioceramic complex 7ZnHAp/ZnO_0.01 (7.05 mg/g) a avut o concentratie de zinc mai mare decat a probei 7ZnHAp (6.75 mg/g).

Evaluarea citotoxicitatii sistemului bioceramic complex ZnHAp/ZnO a fost investigata utilizand celule HeLa, cultivate in mediu RPMI 1640 (Gibco, NY, USA), suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat termic si solutie de penicilina/streptomicina, celulele fiind incubate la $37^{\circ}C$ in atmosfera umeda cu 5% CO_2 . Cuantificarea viabilitatii celulare in cazul expunerii celulelor HeLa la o suspensie de nanoparticule de HAp, 7ZnHAp si 7ZnHAp/ZnO_0.01 (50mg/10ml) diluata de 200x a fost efectuata folosind testul colorimetric MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-

Director General INCDPM

Dr. Ionut Marius Enculescu



bromura de 2,5-difeniltetrazoliu, un tetrazol)). Rezultatele au aratat ca probele studiate nu au prezentat efecte citotoxice asupra celulelor HeLa, iar viabilitatea celulelor HeLa incubate a fost de peste 90% in cazul probelor studiate la cele trei intervale de timp dupa cum se poate observa in Figura 6. Studiile de citotoxicitate au demonstrat faptul ca sistemele bioceramice complexe de tipul ZnHAp/ZnO nu au efecte citotoxice asupra liniei celulare studiate ceea ce le face candidati ideali pentru dezvoltarea de noi materiale cu proprietati biocompatibile pentru aplicatii biomedicale. Pentru evaluare *in vivo* a citotoxicitatii sistemului bioceramic complex ZnHAp/ZnO s-au realizat experimente pe soareci de tip OVX-ovarectomizat, avand drept obiectiv testarea sistemului bioceramic 7ZnHAp/ZnO_0.01 asupra regenerarii osoase la animale.

Pentru acest studiu s-au folosit 3 loturi de cate 5 soareci. Astfel, primul lot este cel al soarecilor asupra carora nu s-a intervenit, pentru cel de-al doilea lot s-a indus osteoporoza si a fost lasat sa evolueze natural, iar cel de-al treilea lot caruia i s-a indus osteoporoza a fost tratat cu bioceramici de tipul 7ZnHAp/ZnO_0.01. Dupa 120 de zile de la administrarea tratamentului cu bioceramici, soarecii din cele trei loturi au fost eutanasiati iar din femur au fost obtinute preparatele histopatologice prezentate in Figura 7, care arata ca tratamentul cu 7ZnHAp/ZnO_0.01 a avut o contributie semnificativa la regenerarea osoasa. Studiile antimicrobiene asupra ZnHAp arata ca aceasta are un efect inhibitor asupra dezvoltarii bacteriilor si drojdiilor patogene si fungilor precum *E.coli*, *S.aureus*, *Candida albicans* si *Streptococcus mutans*. Astfel, s-a analizat influenta dispersiilor de hidroxiapatita dopata cu zinc asupra *S. aureus* ATCC 25923 si *E.coli* ATCC 25922 folosindu-se dispersii coloidale ZnHAp cu indicii de compozitie $x_{Zn}=0$, $x_{Zn}=0.07$ si $x_{Zn}=0.2$, la concentratii care variaza intre 1000 si 1.95 $\mu\text{g/ml}$. Cresterea celulara asupra dezvoltarii *S. aureus* si *E. coli* este prezentata in Figura 8. Rezultatele au aratat ca exista o inhibare a cresterii celulare pentru *S. aureus* pornind de la 15.62 $\mu\text{g/ml}$, inhibarea relevanta fiind observata la concentratia 62.5 $\mu\text{g/ml}$. In cazul celulelor bacteriene *E.coli*, inhibarea cresterii a fost observata incepand cu concentratia de 125 $\mu\text{g/ml}$. Activitatea antimicrobiana a fost maxima in cazul probei 20ZnHAp urmata de 7ZnHAp in raport cu martorul (Figura 8 a,b), observandu-se ca probele *S.aureus* au fost mai sensibile decat *E.coli* la solutiile de hidroxiapatita dopata cu zinc in comparatie cu martorul. Efectul inhibitor cel mai puternic a fost observat in cazul probei 20ZnHAp care a avut deasemenea cel mai bun parametru stabil din probele testate. Activitatea antibacteriana a fost inflentata atat de

Director General INCDFM

Dr. Ionut Marius Enculescu



stabilitatea solutiilor cat si de concentratia de Zn. Dupa cum s-a aratat /17,18/ activitatea antimicrobiana a hidroxiapatitei dopate cu Zn^{2+} si Ag^+ , a fost influentata de factori precum dimensiunea particulelor, aria suprafetei acestora, compozitia si structura suprafetei. In studii recente /8/ stabilitatea dispersiilor coloidale este un factor major in analiza viabilitatii celulare. Pe masura ce concentratia de zinc creste, stabilitatea probelor in solutie creste, ceea ce conduce la o mai buna biocompatibilitate si o mai buna eficienta antimicrobiana.

Se poate afirma ca prin realizarea biocompozitului ZnHAp/ZnO s-a reusit realizarea unor probe cu o mai buna stabilitate si cu proprietati biologice mai eficiente precum biocompatibilitatea, insa cu o usoara crestere a proprietatilor antimicrobiene.

Director General INCDFM
Dr. Ionut Marius Enculescu



BIBLIOGRAFIE

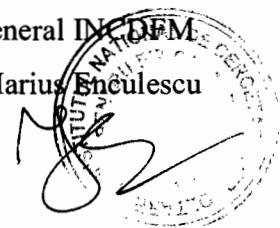
- [1]. Slovik DM. Chapter 141 - Osteoporosis. In: Frontera WR, Silver JK, Rizzo TD, editors. *Essentials of Physical Medicine and Rehabilitation (Fourth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2020. p. 799-805.
- [2]. Blanchard R, Thomas CDL, Hardiman R, Clement JG, Cooper DC, Pivonka P. Structural and Material Changes of Human Cortical Bone With Age: Lessons from the Melbourne Femur Research Collection. In: Narayan R, editor. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Oxford: Elsevier; 2019. p. 246-64.
- [3]. Chapurlat RD, Genant HK. Chapter 69 - Osteoporosis. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, et al., editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016. p. 1184-213.e6.
- [4]. Gimigliano F. 34 - Osteoporosis. In: Cifu DX, Lew HL, editors. *Braddom's Rehabilitation Care: A Clinical Handbook*: Elsevier; 2018. p. 238-43.e5.
- [5]. Thormann U, Ray S, Sommer U, Khassawna T, Heiss C, Schnettler R, et al. Biomaterials for enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *BioNanoMaterials*. 2013;14.
- [6]. Kattimani VS, Kondaka S, Lingamaneni KP. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*. 2016;7:BTRIS36138.
- [7]. Saxena V, Hasan A, Pandey LM. Effect of Zn/ZnO integration with hydroxyapatite: a review. *Materials Technology*. 2018;33(2):79-92.
- [8]. Popa, C.L.; Deniaud, A.; Michaud-Soret, I.; Guégan, R.; Motelica-Heino, M.; Predoi, D. Structural and Biological Assessment of Zinc Doped Hydroxyapatite Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2016**, 2016, 1062878.
- [9]. Miao, S.; Cheng, K.; Weng, W.; Du, P.; Shen, G.; Han, G.; Yan, W.; Zhang, S. Fabrication and evaluation of Zn containing fluoridated hydroxyapatite layer with Zn release ability. *Acta Biomater.* **2008**, 4, 441–446.
- [10]. Tank, K.P.; Chudasama, K.S.; Thaker, V.S.; Joshi, M.J. Pure and zinc doped nano-hydroxyapatite: Synthesis, characterization, antimicrobial and hemolytic studies. *J. Cryst. Growth*. **2014**, 401, 474–479.
- [11]. Iconaru, S.L.; Prodan, A.M.; Buton, N.; Predoi, D. Structural Characterization and Antifungal Studies of Zinc-Doped Hydroxyapatite Coatings. *Molecules* **2017**, 22, 604.
- [12]. Kim, I.-S.; Kumata, P.N. Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder. *Mater. Sci. Eng. B* **2004**, 111, 232–236.
- [13]. Veselinovic L, Karanovic, L., Stojanovic, Z., Bracko, I., Markovic, S., Ignjatovic, N., Uskokovic, D. 00-064-0738. *J Appl Crystallogr.* 2010;43(320).
- [14]. Ciobanu, C.S.; Massuyeau, F.; Constantin, L.V.; Predoi, D. Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 °C. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, 6, 613.
- [15]. Costescu, A.; Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Ghita, R.V.; Chifiriuc, C.M.; Marutescu, L.G.; Predoi, D. Fabrication, Characterization, and Antimicrobial Activity, Evaluation of Low Silver Concentrations in Silver-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2013**, 2013, 194854.

Director General INCDEM

Dr. Ionut Marius Enculescu

- [16]. Xiao, D.-Q.; Wang, D.-W.; Ren, J.-C.; Duan, K.; Yao, N.; Lu, X.; Zheng, X.-T.; Weng, J. Synthesis and Characterization of Copper-substituted Hydroxyapatite Microspheres. *J. Inorg. Mater.* **2014**, *29*, 769–775.
- [17]. Ciobanu, C.S.; Iconaru, S.L.; Le Coustumer, P.; Constantin, L.V.; Predoi, D. Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*, 324.
- [18]. Ciobanu, G.; Barga, A.M.; Luca, C. New cerium (IV)-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Preparation and characterization. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 12192–12201.

Director General INCDFM
Dr. Ionut Marius Enculescu

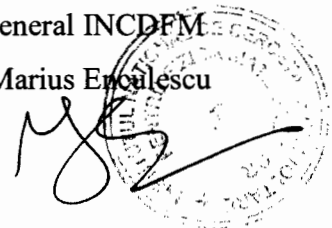


REVENDICARI

1. Obținerea de materiale biocompozite ceramice caracterizate prin aceea ca hidroxiapatita se combina cu nanoparticulele de oxid de zinc pentru a asigura o eliberare imediata cat si pe termen lung a ionilor de Zn^{2+} la locul implantarii si pentru a cumula proprietatile celor doua materiale (ZnHAp/ZnO) asigurand eliberarea controlata.
2. Obținerea nanoparticulelor de ZnO pornind de la precursorul de Zn: $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ si solutia NaOH in apa distilata prin agitare magnetica caracterizate prin aceea ca in doua vase separate, solutia de NaOH a fost adaugata in picurare in solutia percursoare de Zn^{2+} sub agitare magnetica la o temperatura de $50^{\circ}C$, iar amestecul rezultat se filtreaza si se spala pana la pH neutru si se usca in etuva la $60^{\circ}C$ timp de 24 ore urmat de tratamentul termic la $500^{\circ}C/2$ ore cu $10^0/min$ viteza de incalzire.
3. Obținerea printr-o metoda *sol-gel* adaptata a hidroxiapatitei dopate cu zinc pornind de la $Ca_{10-x}Zn_x(PO_4)_6(OH)_2$ prin stabilirea indicilor de compozitie caracterizata prin aceea ca sinteza este efectuata in conditii atmosferice, la o temperatura de $100^{\circ}C$ unde mai intai $(NH_4)_2HPO_4$ a fost dizolvat in etanol absolut, iar mai apoi se obtine solutia ce contine (Ca+Zn) prin dizolvarea $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ si a $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ in apa distilata, in conditii de agitare continua. Solutia care contine P se adaugat prin picurare in solutia care contine (Ca+Zn) sub agitare continua la $100^{\circ}C$. Valoarea pH-ului solutiei se mentine la 11 iar solutia rezultata se agitata lent timp de 24 ore la temperatura de $100^{\circ}C$ pana la formarea unui gel, care se spala in apa bidistilata
4. Analiza concentratiei de zinc prin studii de eliberare a ionilor de zinc folosind spectroscopia de masa cu plasma cuplata inductiv (ICP-MS) coroborate cu analiza concentratiei ionilor prezenti in structura prin metoda absorbtiei atomice in flacara .
5. Realizarea evaluarii citotoxicitatii sistemului ceramic complex ZnHAp/ZnO utilizand cultura de celule HeLa caracterizate prin aceea ca sunt cultivate in mediu RPMI 1640(Gibco, NY, USA), suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat termic si solutie de penicilina/streptomicina, celule fiind incubate la $37^{\circ}C$ in atmosfera umeda cu 5% CO_2 cu cuantificarea viabilitatii celulare folosind testul colorimetric MTT.

Director General INCDFM

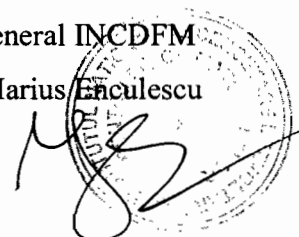
Dr. Ionut Marius Enculescu



6. Studiul regenerării osoase în tratamentul cu 7ZnHAp/ZnO_0.01 folosind cercetări *in vivo* caracterizate prin aceea că s-au făcut studii pe trei loturi de soareci OVX-soricel ovariectomizat folosind vizualizarea histopatologică.
7. Analiza proprietăților antimicrobiene ale biocompozitului caracterizat prin aceea că se studiază rolul inhibitor asupra dezvoltării bacteriilor și drojdiilor patogene și fungilor precum *E.coli*, *S. aureus*, *C. albicans* și *S. mutans*.

Director General INCDFM

Dr. Ionut Marius Enculescu



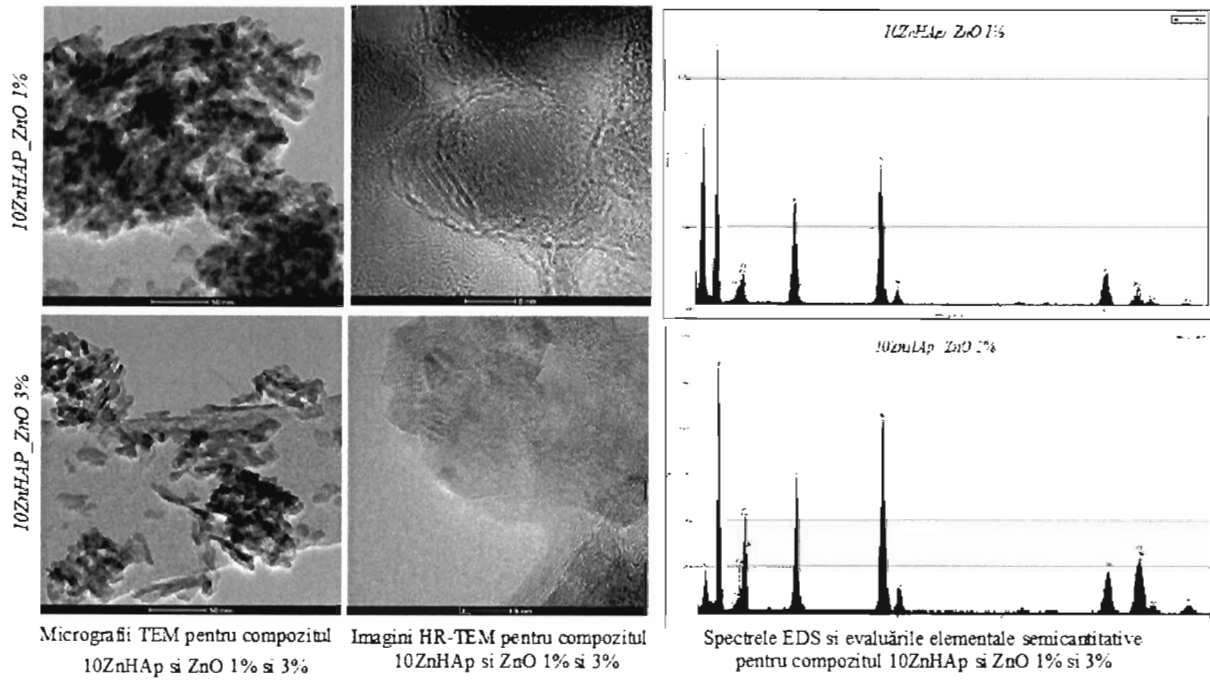
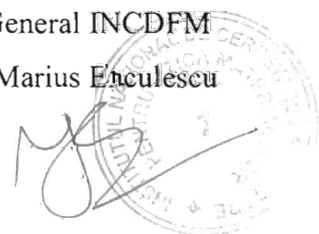
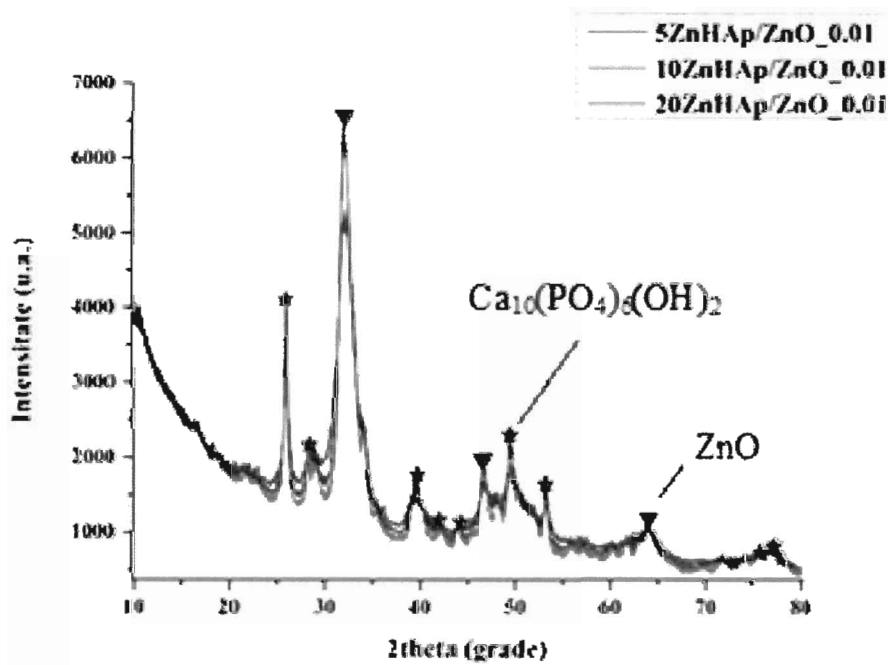


Figura 1

Director General INCDFM

Dr. Ionut Marius Enculescu





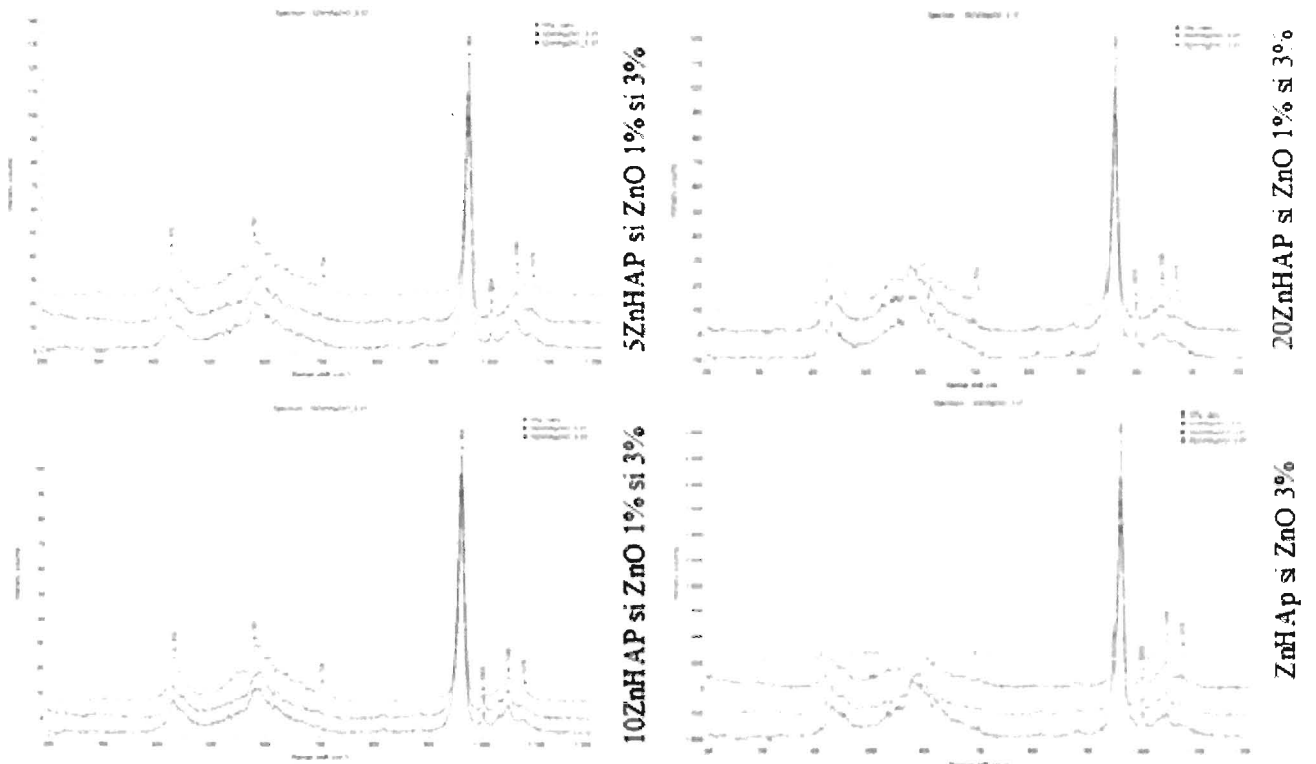
Difractogramele de raze X corespunzatoare probelor de materiale compozite pe baza de ZnHAp si ZnO 1% si principalii compusi mineralogici identificati

Figura 2

Director General INCDFM

Dr. Ionut Marius Enculescu



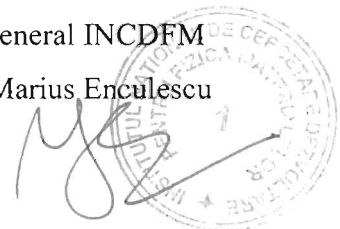


Spectrele Raman pentru compozit

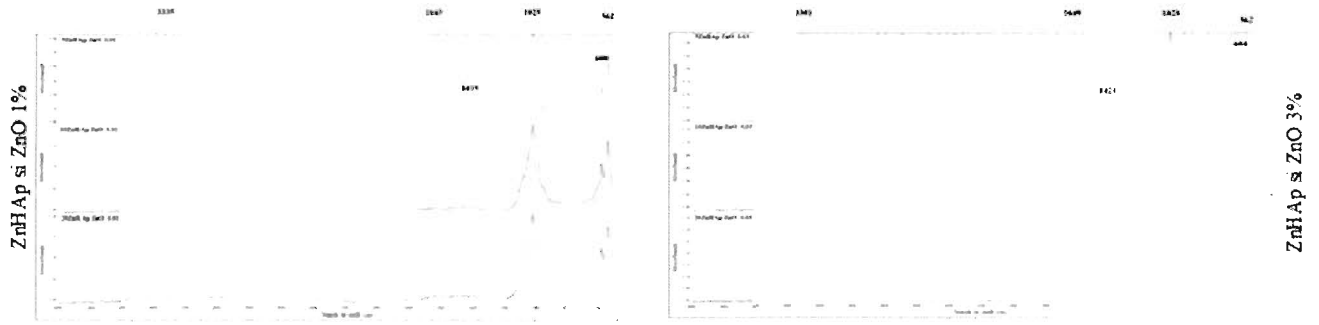
Figura 3

Director General INCDFM

Dr. Ionut Marius Enculescu



49/18



Spectrele FT-IR corespunzatoare materialelor compozite pe baza

Figura 4

Director General INCDEM
Dr. Ionut Marius Enculescu



4847

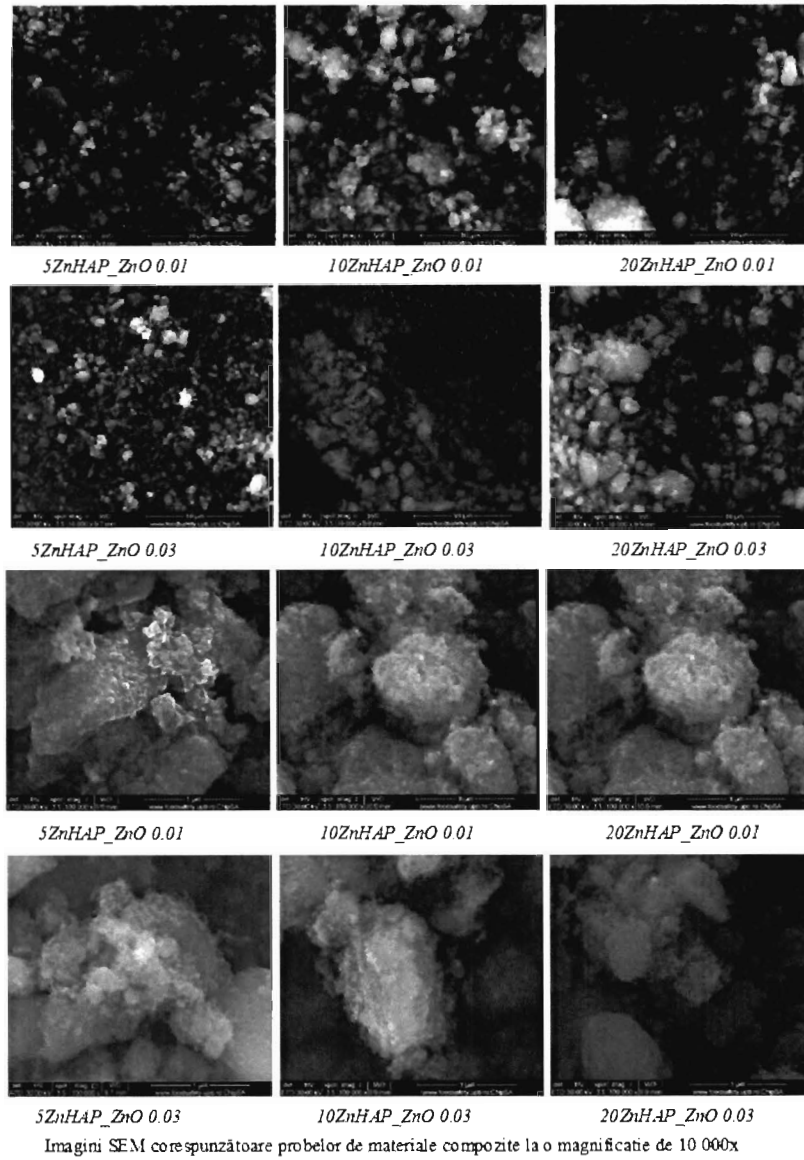


Figura 5

Director General INCDFM
Dr. Ionut Marius Enculescu



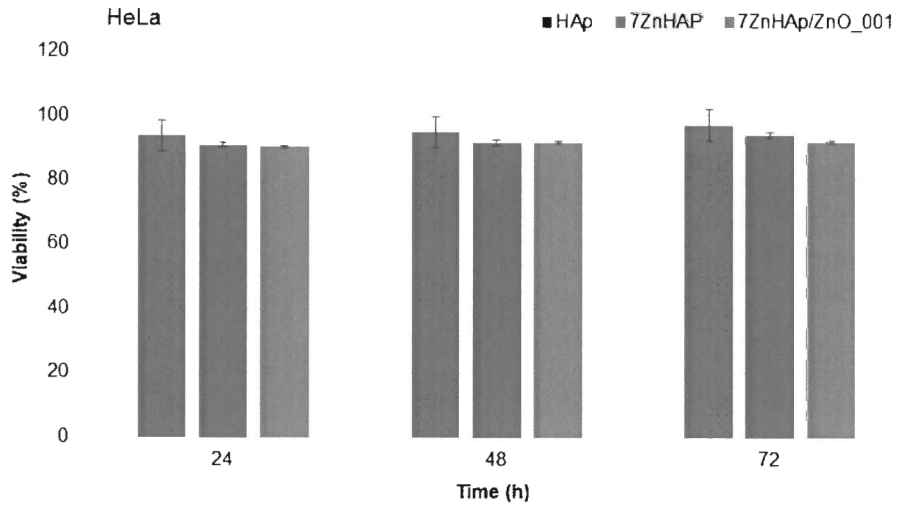
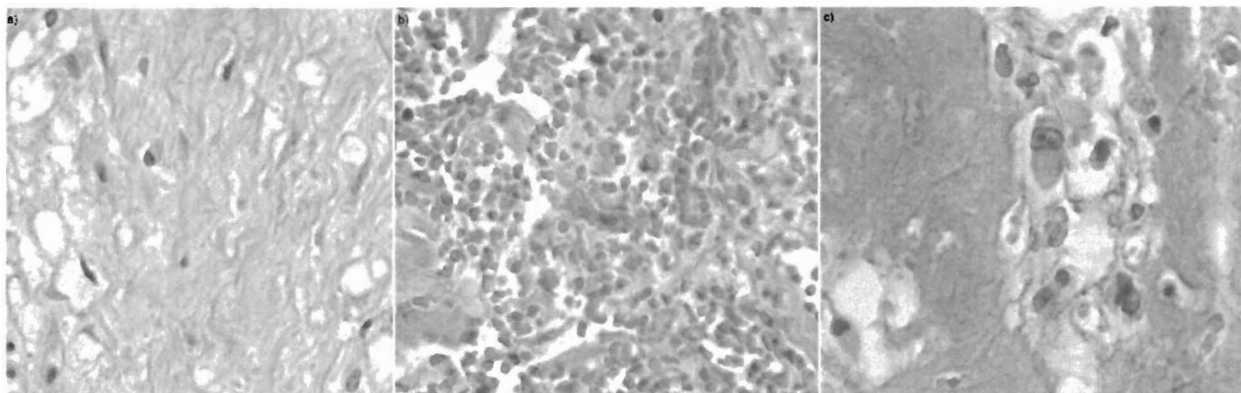


Figura 6. Evaluarea citotoxicității sistemului bioceramic complex ZnHAp/ZnO.

Director General INCDFM
Dr. Ionut Marius Enculescu

The image shows a handwritten signature in black ink over a circular official stamp. The stamp contains the text 'INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETĂRI ȘI DEZVOLTĂRI ÎN CERAMICĂ ȘI COMPOZITE' and 'INCDFM'.

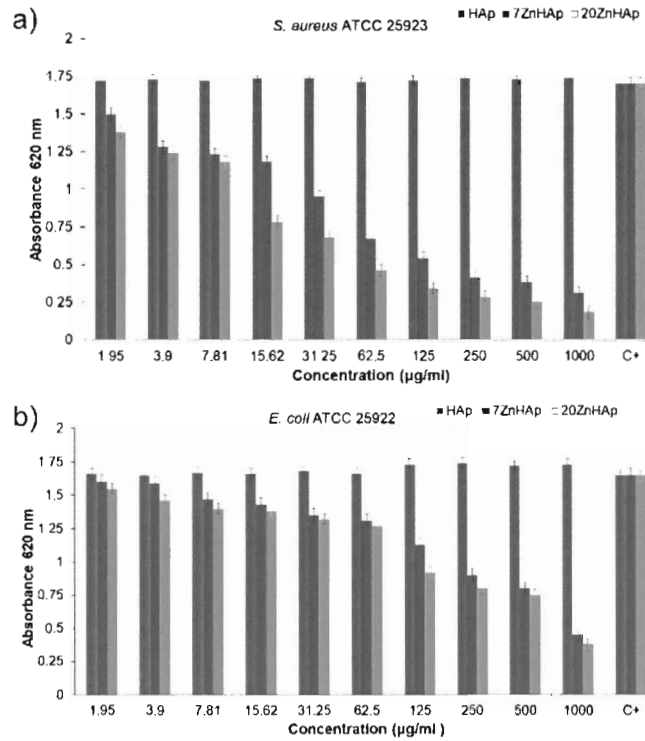


Imagini histopatologice femur pentru sorcele din lotul marker (a), sorcele cu osteoporoză incușă (b) și sorcele cu osteoporoză tratată cu bio ceramică de $7ZnHAxZnO_{0.01}$ (c)

Figura 7

Director General INCDFM
Dr. Ionut Marius Enculescu





Cresterea celulară a *S. aureus* ATCC 25923 (a) și *E. coli* ATCC 25922 (b) în LB la 30 °C timp de 12 ore, în prezența hidroxiapatitei dopate cu zinc (ZnHAp), având $x_{Zn} = 0$, $x_{Zn} = 0.07$ sau $x_{Zn} = 0.2$, la concentrații cuprinse între 1.95 și 1000 µg/mL.

Figura 8

Director General INCDFM
Dr. Ionut Marius Enculescu

