



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00744**

(22) Data de depozit: **06/12/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2023** BOPI nr. **6/2023**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI  
RADIĂȚIEI - INFLPR, STR. ATOMIȘTILOR  
NR. 409, MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **BONCIU ANCA, STR. TINERETULUI,  
BL. D3, SC.A, AP.10, ET.2, DRĂGĂȘANI,  
VL, RO;**  
• **DUMITRESCU NICOLETA,  
STR.FLORILOR NR.40, BL.C3, AP.20,  
MĂGURELE, IF, RO;**

• **NISTORESCU SIMONA, STR. MIRĂSLĂU  
NR.39, MĂGURELE, IF, RO;**  
• **MARASCU VALENTINA, STR.URANUS  
NR.42F, BL.8, AP.9, ET.1, VARTEJU, IF,  
RO;**  
• **RUSEN LAURENȚIU, STR. MĂRĂȘEȘTI  
NR. 12, BL. B4, SC. 2, AP. 22, MĂGURELE,  
IF, RO;**  
• **GRĂDIȘTEANU GRAȚIELA,  
STR.AVIAȚIEI, NR.15, BL.7D, SC.2, ET.2,  
AP.23,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DINCĂ VALENTINA, STR. MĂRĂȘEȘTI,  
NR.12, BL.B4, SC.2, AP.22, MĂGURELE, IF,  
RO**

(54) **NOI STRATURI SUBȚIRI ZWITERIONICE FOLOSITE  
PENTRU INHIBAREA CREȘTERII DE MICROORGANISME,  
CU APLICAȚII DIRECTE ÎN SUPRAFEȚE ANTIMICROBIENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor filme bioactive pe bază de polimeri zwitterionici cu acțiune antimicrobiană utilizate pentru dispozitive medicale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: preparare a unei soluții de polimer 2-meta-crililoxietil fosforilcolina (MPC) în concentrație de 1...5% masic, plasarea în suportul țintei și aplicarea tehnicii evaporării laser pulsate (MAPLE) pentru depunerea straturilor pe

suporturi de sticlă, rezultând filme subțiri, uniforme zwitterionice care au fost supuse analizei interacțiunii cu microorganisme care au raportat faptul că filmele de MPC prezintă un efect semnificativ de reducere a dezvoltării de colonii microbiene de suprafață.

Revendicări: 3  
Figuri: 7



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2021 0 744
Data depozit ....	06-12-2021

**Descrierea invenției cu titlul: Noi straturi zwitterionice pentru inhibarea creșterii de microorganisme cu aplicații directe în suprafețe antimicrobiene**

Inventatori: Anca Bonciu, Nicoleta Dumitrescu, Simona Nistorescu, Valentina Marascu, Laurentiu Rusen, Gratiela Gradisteanu și Valentina Dinca

**Invenția se referă la noi straturi hidrofile bazate pe polimeri zwitterionici obținute prin metode laser, folosite pentru inhibarea creșterii de microorganisme, cu aplicații directe în obținerea de suprafețe antimicrobiene.** Noile straturi active propuse sunt constituite din *filme subtiri de 2-metacriloloixetil fosforilcolina (MPC)* obținute la temperatura camerei pe suporturi de sticlă, prin metoda depunerii de evaporare laser pulsată asistată de o matrice (MAPLE), utilizând un laser cu Nd:YAG. Filmele obținute au fost testate folosind următoarele tulpini microbiene: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922, determinând unitățile formatoare de colonii per mililitru (UFC/mL) și evaluându-le microscopic în ceea ce privește adeziunea pe filme.

**Este cunoscut** ca sinteza de biomateriale polimerice artificiale/naturale cu rezistență la adsorbția nespecifică a proteinelor, coagularea sangelui și aderența bacteriană au atras o mare atenție, așa ca adsorbția nespecifică a proteinelor și biomoleculelor determină răspunsuri biologice nefavorabile incluzând coagularea sangelui, inflamația, aderența celulară, diferențierea celulelor și formarea de biofilm. Biomimetismul caracteristicilor structurale și de bio-recunoaștere ale componentelor /subcomponentelor celulare asigură proiectarea de noi biomateriale sintetice care pot fi utilizate în diverse aplicații biomedicale, cum ar fi ingineria tesuturilor, livrarea de medicamente, terapeutice, diagnostice, etc [1-2].

Printre aceste materiale, **folosirea de polimeri sau de compuși zwitterionici**, cum ar fi cel fosforilcolinic (PC) de 2-metacriloloixetil fosforilcolina (*2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine- MPC*) vizează în special funcții biologice inerte, în special în rezistența la adsorbția proteinelor.. **Utilizarea de MPC** ca material în **domeniul biomedical** prezintă un **factor cheie în diminuarea dezavantajelor** suprafețelor care folosesc imobilizarea directă de compuși biologici, oferind avantajele **îmbunătățirii compatibilității sangelui, rezistența adsorbției proteinelor, denaturării și aderenței celulare și prevenirea aderenței bacteriene** pentru ingineria tesuturilor și sistemele de livrare a medicamentelor. Caracteristica neutră din punct de



vedere electric si formarea carcasei de hidratare care înconjoara grupul PC ofera aceste caracteristici moleculelor MPC [3] Acesti polimeri sunt materiale biocompatibile si sunt complet inofensivi pentru oameni [4]

Polimerii 2-metacriloloxietil fosforilcolina (MPC) sunt sintetizati pentru a se potrivi cu structura biomembranelor [5]. Ei reduc eficient adsorbtia proteinelor si inhiba aderenta celulara, chiar si atunci cand sunt în contact cu sangele integral în absenta anticoagulantelor [6]. **Printre metodele de functionalizare** a unei suprafete cu polimeri de acest tip, **grefarea sau încorporarea gruparii zwitterionice fosforilcolina (PC)** care contine fragmente ale unui fosfolipid polar prezent în membrana celulara, este una dintre **optiunile promitatoare** pentru realizarea strategiei de biomimetism [7-9]. **Totodata, in contextul eforturilor facute pentru evitarea formarii de biofilme pe suprafete si astfel pentru a preveni aderarea microbiana în continuare la astfel de suprafete**, pe langa **metodele de prevenire** cum ar fi obtinerea de invelisuri cu caracteristici de suprafata specifice, incorporarea de teflon, adaugarea de dezinfectant la acesta [10], folosirea de invelsuri polimerice de tip zwitterionic care sa poata impiedica aderenta bacteriilor reprezinta o optiune de interes. Totodata, **toate metodele raportate in literatura** referitoare la **metodele** de obtinere de suprafete bazate pe MPC **sunt metode chimice** si au ca rezultat **formarea de hidrogeluri**. Spre exemplu, sunt folosite reactii de „clic” bioortogonale pentru a forma rapid o retea reticulata covalent atunci cand doua componente sunt amestecate sau injectate împreuna. Cuplarea tiol-ena [11] si chimiile clic de cicloaditie azida-alchine, cum ar fi SPAAC[12] au fost ambele utilizate pentru a face hidrogeluri formate in situ. **Din cauza reactivitatii gruparii metacrilat, MPC poate fi copolimerizat prin diferite metode pentru a dezvolta numeroase materiale, avand diverse aplicatii în domeniile biomedicale** [13, 14-brevet nr: JP2890316B2], si a fost folosit pana in prezent doar sub forma de hidrogel. Principalele dezavantaje ale acestora este dat de faptul ca hidrogelurile nu pot fi de obicei remodelate dupa formarea in situ, iar producerea de formulari clinice personalizate necesita expertiza specializata si optimizare care necesita timp.

Totodata, in ultimii ani, **evaporarea laser pulsata asistata de o matrice (MAPLE), brevetata in anul 2000 ( 15-brevet nr. US6025036A)** se prezinta ca o **solutie cu multiple avantaje** pentru depunerea de filme subtiri de materiale organice, polimerice sau biologice [15-21]. Dintre acestea, cele mai importante se refera la posibilitatea depunerii unei game variate de materiale, atat organice cat si inorganice pe orice tip de suport/substrat; controlul asupra ratei de



depunere, implicit asupra grosimii filmelor (ex: gama larga de grosimi, de la 20 nm la mai mult de 1  $\mu\text{m}$ ); morfologia suprafetei poate fi controlata prin caracteristicile tinteii sau a parametrilor de depunere (fluanta, numar pulsuri) precum si posibilitatea incorporarii intr-o matrice polimerica de compusi activi, atat biologici (proteine, medicamente), cat si anorganici (de ex. de tip grafene).

In acest context, **scopul inventiei** este de a obtine prin **evaporare laser pulsata asistata de o matrice** straturi subtiri polimerice pe baza de compusi zwiterionici (**polimerul 2-metacrililoixietil fosforilcolina (MPC)**), **straturi care prezinta o activitate antimicrobiana atat pentru tulpinile gram negative cat si cele gram pozitive.**

Prin folosirea tehnicii MAPLE , se pot obtine straturi subtiri de MPC cu suprafete compacte, grosimi controlabile pe intreaga suprafata a substratului depus si cu activitate antimicrobiana, eliminand astfel dezavantajele date de obtinerea de suprafete de MPC doar sub forma de hidrogel prin metodele existente utilizate pana in prezent.

Inventia de fata se **refera la obtinerea de straturi subtiri cu caracteristici zwiterionice, cu o suprafata a carei componenta polare a energiei libere de suprafata nu are valori minime, influentand astfel adeziunea de microorganisme.** Straturile descrise în aceasta inventie pot fi utilizate pentru obtinerea unor suprafete antimicrobiene pentru dispozitive medicale.

**Metoda, conform inventiei, prezinta urmatoarele avantaje:**

- permite obtinerea de straturi subtiri de MPC uniforme, omogene, cu caracteristici hidrofile.
- îmbunatatirea proprietatilor antimicrobiene prin caracteristicile suprafetei caracterizate de o energie de suprafata crescuta (reducerea numarului de colonii de *S.aureus* de la  $12,6 \times 10^6$  pana la  $6,66 \times 10^3$ ; iar pentru *E. coli*, la  $5,5 \times 10^2$ , prin comparatie cu controlul de  $7,3 \times 10^6$ ).

**Problema tehnica** pe care o rezolva prezenta inventia consta in obtinerea de noi straturi polimerice, cu caracteristici hidrofile si caracterizate de o energie de suprafata crescuta, capabile sa genereze o scadere a adeziunii microbiene pe suprafata cu 90% fata de control.

**Conform metodei** de obtinere a filmelor cu caracteristici zwiterionice, acestea au fost realizate prin depunerea straturilor pe suporturi de sticla folosind tehnica evaporarii laser pulsate (MAPLE). MAPLE necesita ca materialul de interes sa fie dizolvat intr-un solvent in concentratii



de 1-5% procente de masa sau volum, aceasta solutie fiind ulterior turnata intr-un suport din cupru (suportul tinte)(Desenul 1). Suportul impreuna cu solutia sunt racite cu azot lichid, obtinandu-se astfel o tinta solida, care este plasata intr-o incinta vidata. Tinta solida este apoi iradiata cu un fascicul laser. Pentru aceasta, tinta inghetata a fost obtinuta din 3%MPC dizolvat in apa si etanol. Lungimea de unda folosita a fost de 266nm (laser cu ND:YAG), fluenta laser a fost de 250-450 mJ/cm<sup>2</sup>. Intervalul de fluente a fost ales tinand cont de rezultatele din literatura care sugereaza pastrarea functionalitatii materialelor in acest interval de fluente. Numarul de pulsuri a fost de 54.000. In timpul depunerilor, tinta au fost rotita si translata evitandu-se astfel ablaarea consecutiva a unei singure zone si deteriorarea acesteia.

Eficienta filmelor a fost testata folosind urmatoarele tulpini microbiene: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, determinand unitatile formatoare de colonii per mililitru (UFC/mL) si evaluandu-le microscopic in ceea ce priveste adeziunea pe filme.

In urma testelor putem concludiona:

- MAPLE permite obtinerea de straturi subtiri uniforme zwitterionice;
- straturile polimerice obtinut prin MAPLE au efect inhibitor asupra urmatoarelor tulpini microbiene: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 si *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Se da in continuare, un exemplu de realizare a filmelor de tip zwitterionic din MPC folosind metoda MAPLE:**

**Referitor la Desenul 1** (Schema de depunere de filme de MPC prin MAPLE: laser pulsat Nd:YAG (Surelite-II, Continuum) (266 nm, 5-7 ns , 10 Hz) (1), sistem optic format din oglinzi (2) si lentile (3), suport de Cupru (4) ;Substratul (5), sistem de pompe de vid (6)), metoda de obtinere a pe baza de MCP, utilizand evaporarea laser pulsata, presupune urmatoarele etape:

- Se prepara o solutie de MPC in cantitate de 3% in greutate, intr-o solutie de etanol si apa(50% cu 50%);
- Se toarna solutia intr-un suport de Cupru (4) si se ingheata folosind azot lichid pana la solidificarea solutiei continuta de suportul de Cupru (4);
- Se monteaza suportul cu tinta in incinta de depunere;



- Substratul (5) (siliciu (100)-dublu slefuit, transparent in infrarosu folosit pentru experimentele de caracterizare a filmelor de dupa depunere si sticla pentru evaluarea optica si *in vitro*) se monteaza in camera de evaporare, paralel cu tinta inghetata;
- Se porneste sistemul de pompe de vid (6)(presiunea finala inainte de inceperea procesului de ablatie fiind de  $4 \times 10^{-3}$  bar);
- Fasciculul este ghidat spre tinta cu un sistem optic format din oglinzi(2) si lentile(3), fiind focalizat pe tinta (4) la un unghi de incidenta de  $\sim 45^\circ$ . O oglinda(2) este plasata inaintea lentilei de focalizare(3) si adaptata pentru a translati spotul laser pe suprafata tinte cu scopul de a evita formarea de cratere in tinta.
  - a fost folosit un laser pulsant (1) Nd:YAG (Surelite-II, Continuum) (266 nm, 5-7 ns , 10 Hz).
  - Designul rezervorului permite, de asemenea, rotirea suportului tinta, pentru a mentine, impreuna cu translatarea fasciculului, o evaporare uniforma a tinte, evitandu-se astfel atat incalzirea locala excesiva cat si eroziunea suprafetei acesteia in timpul experimentului.
  - Fluenta pulsurilor laser (F) a fost variata intre 250 si 450 mJ / cm<sup>2</sup>.

Dupa extragerea probei din camera de ablatie, au fost evaluate proprietatile straturilor depuse prin determinarea gruparilor functionale prin spectrometrie cu transformata Fourier in infrarosu (*Fourier Transform Infrared- FTIR*) si microscopie electronica de baleiaj (SEM).

In Desenul 2, determinarea gruparilor functionale s-a realizat prin metoda FTIR. **Referitor la Desenul 2** (Spectrele FTIR aferente materialelor investigate), filmele subtiri obtinute prin tehnica laser, au fost analizate cu ajutorul spectrometrului cu transformata Fourier in infrarosu- *FTIR (Jasco FTIR 6300/ Type A Spectrometer)*. Probele au fost analizate in vederea obtinerii spectrelor de vibratii ale moleculelor aferente materialului nou sintetizat. Aceasta tehnica este una nedistructiva si permite obtinerea unei analize chimice a materialelor. In consecinta, materialele sintetizate prin tehnica laser, au fost masurate in modul transmisie (probele de material au fost plasate perpendicular pe fasciculul de lumina), in intervalul  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , la rezolutia de  $4 \text{ cm}^{-1}$  (specifica materialelor solide) si cu un numar de acumulari automat determinat de programul de operare al instrumentului. De altfel, datorita faptului ca materialul dizolvat in apa si etanol ramane in stare lichida pe substratul de siliciu, controlul a fost materialul initial, prezent sub forma de pudra, fiind masurat in modul reflexie total atenuata- *ATR (Attenuated Total Reflection)*, utilizand modulul suplimentar pentru ATR intr-un singur punct. Aici, pudra este asezata pe o suprafata de



*Sony*

diamant cu un diametru de 2 mm, fiind presata pentru a obtine rezultatele aferente. Ca si in cazul probelor analizate in modul transmisie, parametrii utilizati pentru modul ATR implica o rezolutie de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , intervalul de masura de  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , si un numar de acumulari automat determinat de programul de operare al instrumentului. Totodata, in timpul analizei, in urma interactiunii materialului initial (pudra) cu atmosfera ambientala si accelerata de expunerea la fascicolul luminos, materialul devine partial lichid (specific materialelor zwitterionice), conducand la aparitia de legaturi specifice in domeniul  $1800 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ . In Desenul 2 sunt reprezentate spectrele FTIR ale materialului initial (linia neagra), cat si ale materialelor obtinute prin tehnica laser la diferite fluente (liniile rosu, albastru si verde). Rezultatele FTIR au fost obtinute la 10 minute dupa expunerea materialelor in atmosfera ambientala. Spectrul FTIR al materialului initial (Desenul 2, linia neagra), prezinta absorbtii la  $958 \text{ cm}^{-1}$  [ $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ] [22,23],  $1079 \text{ cm}^{-1}$  si  $1298 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{POCH}_2-$ ) [23],  $1174 \text{ cm}^{-1}$  C-O si  $1239 \text{ cm}^{-1}$  vibratia legaturii P-O [24]. De altfel, materialul initial prezinta vibratiile legaturilor P=O la  $1482 \text{ cm}^{-1}$ , C=C la  $1636 \text{ cm}^{-1}$  si C=O la  $1728 \text{ cm}^{-1}$  [22]. Intre  $2850 \text{ cm}^{-1} - 3000 \text{ cm}^{-1}$  apar legaturile de tip  $\text{sp}^3$ ,  $\text{CH}_{x(2,3)}$ , iar la  $3038 \text{ cm}^{-1}$  este legatura de tip  $\text{sp}^2$ , C-H. De asemenea, vibratiile legaturilor  $\nu\text{N-H}$  si  $\nu\text{O-H}$  apar in intervalul  $3080 \text{ cm}^{-1} - 3700 \text{ cm}^{-1}$ .

**Filmele de MPC obtinute prin tehnica laseri, pastreaza legaturile chimice ale materialului initial, si conform spectrelor FTIR, au o stabilitate chimica mai mare in atmosfera ambientala, comparativ cu materialul initial.** Mai mult de atat, se poate observa ca utilizand o fluenta mai mare a laserului ( $450 \text{ mJ/cm}^2$ ), se poate obtine o replica aproximativ identic chimic, cu materialul initial.

Imaginile de microscopie electronica de baleiaj ale filmelor MPC depuse la 3 fluente diferite se regasesc în Desenul 3. **Referitor la Desenul 3 (Imagini SEM ale filmelor de MPC obtinute prin MAPLE la fluente de  $250 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $350 \text{ mJ/cm}^2$ , respectiv  $450 \text{ mJ/cm}^2$ ), putem spune ca datorita capacitatii mari de hidratare (derivata din interactiunile electrostatice, precum si din legaturile de hidrogen), acoperirile realizate la  $250 \text{ mJ/cm}^2$ , respectiv  $350 \text{ mJ/cm}^2$  au tendinta de a forma si insule de material, spre deosebire de cele obtinute la  $450 \text{ mJ/cm}^2$ , unde suprafetele sunt netede, fara insule micronice.**

Starea unei suprafete înainte ca aderenza bacteriilor sa aiba loc trebuie mai întâi definita pentru a determina daca acoperirea MPC a avut sau nu efect. In acest scop, unghiurile de contact si energiile de suprafata s-au dovedit a fi utile în prezicerea comportamentelor de aderenza ale agentilor



patogeni specifici la suprafețele hidrofobe/hidrofile. Ca indice de hidrofobicitate, s-au masurat unghiurile de contact ale suprafeței.

Modificarea suprafeței biomaterialelor cu scopul de a preveni infectiile asociate implanturilor este o parte esentiala a cercetării. În acest context, zwitterionii, precum MPC, au un potential mare datorita proprietatilor lor antifouling. Acest efect antifouling este produs de o interactiune a doua mecanisme. Primul efect este formarea unui învelis de hidratare bazat pe interactiuni electrostatice care împiedica atasarea proteinelor la suprafata. În al doilea rand, obstacolul steric este realizat de lanturile polimerice zwitterionice datorita hidrofilitatii si mobilitatii lor [25, 26].

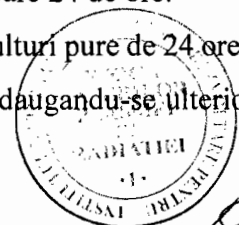
Referitor la Desenul 4 (Histograme ce prezinta valorile unghiurilor de contact si ale componentelor polare, dispersive si totale ale energiilor libere de suprafata ale filmelor de MPC obtinute prin MAPLE la fluente de 250 mJ/cm<sup>2</sup>, 350 mJ/cm<sup>2</sup>, respectiv 450mJ/cm<sup>2</sup>), hidrofilicitatea crescuta a filmelor este atribuita hidratarii ionice a grupului fosforilcolina din unitatea MPC. Folosind masuratorile unghiului de contact a doua lichide (apa deionizata si di-iodometan) cu densitati si indici de refractie diferiti, am determinat si energiile libere de suprafata (SFE), precum si componentele polare si dispersive ale SFE ale materialelor testate conform metodei OWRK [27, 28]. MPC obtinut la fluenta de 450 mJ/cm<sup>2</sup>, a prezentat cea mai mare componenta polara, aproximativ dubla fata de cea a filmelor de MPC obtinute la fluenta de 250 mJ/cm<sup>2</sup>. În ceea ce priveste componenta dispersiva, filmele obtinute la fluente de 350 si 450 mJ/cm<sup>2</sup> au valori similare. La randul lor, Yuan si colab. [29] au raportat o aderența bacteriana considerabila a E. coli la substraturile polimerice, în ciuda unei componente polare scazute a energiei de suprafata. In plus, în acelasi studiu, un material tratat cu plasma de aer cu cea mai mare componenta polara (31,3 mN/m<sup>-1</sup>) a prezentat aderența bacteriana scazuta.

#### **Aplicatie practica a filmelor zwitterionice in analiza interactiei cu microorganisme.**

Raspunsul caracteristic al suprafețelor la microorganisme a fost obtinut urmarind pasii de mai jos:

**1. Cultivarea tulpinilor microbiene.** Au fost utilizate urmatoarele tulpini microbiene: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231. Înșamantarea tulpinilor s-a realizat prin descarcarea ansei bacteriologice de unica folosinta pe mediul de cultura agar nutritiv (PCA – Plate Count Agar), scopul cultivării fiind de a obtine culturi pure. Condițiile de incubare au fost: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, timpul de incubare 24 de ore.

**2. Prepararea suspensiilor microbiene.** Au fost preparate suspensii din culturi pure de 24 ore. În tuburi sterile au fost pipetati cate 5 mL de apa fiziologica sterila (AFS), adaugându-se ulterior o



Signature



cantitate mica de inocul prin depunere pe peretii tubului. Turbiditatea suspensiilor a fost determinate cu ajutorul unui densitometru si a fost ajustata la valoarea standardului de 0.5 McFarland, care corespunde cu  $10^8$  unitati formatoare de colonii per mililitru (UFC/mL).

### **3. Pregatirea probelor si formarea cresterea microorganismelor pe suprafetele de interes.**

Filmele au fost taiate, cu un bisturiu steril la o dimensiune de 1x1 cm. Toate probele sectionate au fost sterilizate la UV timp de 15 minute pe fiecare parte. Dupa sterilizare, probele au fost mutate în placi cu 24 de godeuri, iar peste materiale au fost pipetati cate 600  $\mu\text{L}$ /godeu din suspensiile microbiene preparate. Întreg experimental a fost realizat în duplicat; placile au fost incubate pentru 24 de ore la  $37^{\circ}\text{C}$  pentru a permite dezvoltarea de biofilme pe suprafetele de interes.

### **4. Validarea efectului antimicrobian al filmelor de MPC in formarea biofilmelor microbiene.**

Cand microorganismele se ataseaza pe o suprafata si formeaza un biofilm, acestea devin mai rezistente la actiunea agentilor antimicrobieni. Aderenta la materialului testat a fost determinata prin numararea UFC/ mL, conform protocolului urmator: dupa 24 de ore de incubare, toate probele au fost transferate în tuburi Eppendorf sterile în care a fost depus în prealabil cate 1 mL de AFS. Tuburile cu materiale au fost vortexate pentru 1 minut la viteza mare pentru a desprinde celulele aderente pe filmele studiate. În placi sterile cu 96 de godeuri au fost distribuiti 90  $\mu\text{L}$ /godeu de AFS, peste care s-au adaugat, în primul godeu al fiecarui rand, 10  $\mu\text{L}$  din fiecare tub cu proba si s-au realizat 6 dilutii seriale pornind de la godeul 1 (dilutia  $10^{-1}$ ) pana în godeul 6 (dilutia  $10^{-6}$ ). Diluarea unei solutii reprezinta procesul prin care se reduce concentratia unei solut. Dilutiile in serile realizate in experiment s-au realizat prin depunerea a 10  $\mu\text{L}$  din fiecare tub cu proba/ godeu in 90  $\mu\text{L}$  AFS, ulterior, din acest amestec rezultat (dilutie  $10^{-1}$ ) s-au aspirat 10  $\mu\text{L}$  si care au fost, de asemenea, resuspendati in 90  $\mu\text{L}$  AFS ( dilutie  $10^{-2}$ ), procesul a fost repetat pana la dilutia  $10^{-6}$ , de unde 10  $\mu\text{L}$  din amestecul rezultat au fost aruncati in tancul de deseuri. Volumul final pentru fiecare dilutie fiind de 90  $\mu\text{L}$ /godeu. O dilutie în serie reprezinta, in fapt, dilutia repetata a unei solutii stoc pentru a obtine o dilutie geometrica a solutiei initiale, folosita adesea in experimentele in care este necesara o scara logaritmica.

Ulterior, pentru a putea numara UFC/ mL au fost necesare placi cu mediu solid. Fiecare proba a avut cate doua replici tehnice, ceea ce înseamna ca 5  $\mu\text{L}$  x 3, din fiecare dilutie pregatita, au fost pipetati în fiecare placa cu mediu. În final, placile au fost incubate pentru 24 de ore la  $37^{\circ}\text{C}$ , dupa aceea s-a realizat numararea coloniilor si calcularea UFC/ mL. Schema protocolului de lucru se regaseste în **Desenul 5**.

**5. Determinarea efectului antibacterian al polimerului testat.** După depunerea polimerului pe suprafețele de sticlă, acestea au fost sterilizate la UV în hota biologică și acoperite cu câte 1 mL de suspensie bacteriană, ulterior fiind incubate 24 de ore la 37°C. Experimentul a vizat validarea efectului antibacterian al MPC prin determinarea UFC/mL atât pentru o specie bacteriană Gram pozitiv (*S. aureus* ATCC 25923), cât și pentru o specie Gram negativ (*E. coli* ATCC 25922).

Aderența celulelor bacteriene depuse pe suprafețele tratate cu MPC a fost redusă drastic în comparație cu martorul pozitiv, care este reprezentat de o suspensie bacteriană simplă (Desen 7. Imagini ale dezvoltării de colonii pe suprafețele acoperite cu MPC. S-a marcat cu triunghi alb diluția de  $10^{-6}$ ). S-a urmărit evaluarea efectului antimicrobian rapid, la 24 de ore de la însămânțarea tulpinilor bacteriene pe suprafețele de interes. Intervalul de timp selectat a fost ales pentru a permite vizualizarea răspunsului antibacterian imediat, respectiv după un singur ciclu complet de creștere și multiplicare. În cazul *S. aureus* numărul coloniilor a fost redus până la  $6,66 \times 10^3$ , comparativ cu martorul,  $12,6 \times 10^6$ . Un efect sporit a fost observat în cazul speciei Gram negativ, *E. coli*, unde UFC/mL a fost doar  $5,5 \times 10^2$ , prin comparație cu rezultatul controlului ( $7,3 \times 10^6$ ).

În urma analizelor efectuate pe filmele obținute și a testelor efectuate cu 2 clase de microorganisme-gram pozitive și gram-negativ, putem concluziona:

- stratul de MPC are un efect semnificativ de reducere a dezvoltării de colonii microbiene pe suprafață.



**Referinte bibliografice**

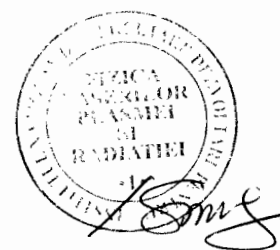
1. Gagner, J.E., Kim, W., Chaikof, E.L., Designing Protein-Based Biomaterials for Medical Applications, *Acta Biomaterials*, 10(4), 1542-1557, 2014.
2. Goda, T., Kjall, P., Ishihara, K., Richter-Dahlfors, A., Miyahara, Y., Biomimetic interfaces reveal activation dynamics of C-reactive protein in local microenvironments, *Advanced Healthcare Materials*, 3(11), 1733-1738, 2014.
3. Berkowitz, M.L., Vacha, R., Aqueous solutions at the interface with phospholipid bilayers, *Accounts of Chemical Research*, 45, 74-82, 2012; Schlenoff, J.B., Zwitteration: coating surfaces with zwitterionic functionality to reduce nonspecific adsorption, *Langmuir*, 30, 9625-9636, 2014.
4. Iwasaki, Y., Aiba, Y., Morimoto, N., Nakabayashi, N. and Ishihara, K. (2000) Semi-interpenetrating polymer networks composed of biocompatible phospholipid polymer and segmented polyurethane. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 701–708.].
5. Ishihara, K., Ueda, T. and Nakabayashi, N. (1990) Preparation of phospholipid polymers and their properties as hydrogel membrane. *Polym. J.* 22, 355–360.].
6. Ishihara, K., Fukumoto, K., Iwasaki, Y. and Nakabayashi, N. (1999) Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 2. Protein adsorption and platelet adhesion. *Biomaterials* 20, 1553–1559.].
7. Goda, T., Ishihara, K., Miyahara, Y., Critical update on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer science, *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 41766,2015;
8. Ishihara, K., Mu, M., Konno, T., Inoue, Y., Fukazawa, K., The unique hydration state of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine), *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10–12, 884–899, 2017;
9. Yuan, B., Chen, Q., Ding, W.-Q., Liu, P.-S., Wu, S.-S., Lin, S.-C., Shen, J., Gai, Y., Copolymer coatings consisting of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine and 3-methacryloxypropyl trimethoxysilane via ATRP to improve cellulose biocompatibility, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4, 4031-4039, 2012.; ].
10. Lopez-Lopez, G., Pascual, A. and Perea, E.J. (1991) Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J. Med. Microbiol.* 34, 349–353.



11. Thiol-ene Photocrosslinking of Cytocompatible Resilin-Like Polypeptide-PEG Hydrogels., McGann CL, Dumm RE, Jurusik AK, Sidhu I, Kiick KL, *Macromol Biosci.* 2016 Jan; 16(1):129-38.
12. Cytocompatible click-based hydrogels with dynamically tunable properties through orthogonal photoconjugation and photocleavage reactions. DeForest CA, Anseth KS, *Nat Chem.* 2011 Oct 23; 3(12):925-31.]
13. Goda, T., Ishihara, K., Miyahara, Y., Critical update on 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) polymer science, *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 41766, 2015.
14. Materials for biocompatible medical devices-brevet nr: JP2890316B2
- 15- Method of producing a film coating by matrix assisted pulsed laser deposition, Robert Andrew McGill, Douglas Brian Chrisey -brevet nr. US6025036A
16. Dinca V., Mocanu A., Isopencu G., Busuioc C., Brajnicov S., Vlad A., Icriverzi M., Roseanu A., Dinescu M., Stroescu M., Stoica-Guzun A., Sucheana M., Biocompati-ble pure ZnO nanoparticles-3D bacterial cellulose biointerfaces with antibacterial properties, *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 13, Issue 1, Pages 3521-3533 (2020).
17. Icriverzi, M.; Bonciu, A.; Rusen, L.; Sima, L.E.; Brajnicov, S.; Cimpean, A. Evans, R.W., Dinca, V., Roseanu, A. Human Mesenchymal Stem Cell Response to Lactoferrin-based Composite Coatings. *Materials*, 12, 3414. -*Materials* 1996-1944 1, 405 (2019)
18. Dinca V., Viespe C., Brajnicov S., Constantinoiu I, Moldovan A., Bonciu A., Toader C.N., Ginghina R.E., Grigoriu N., Dinescu M., Scarisoreanu N.D, MAPLE assembled acetylcholinesterase– Polyethylenimine hybrid and multilayered interfaces for toxic gases detection, *Sensors* 18(12): 4265 (2018).
19. Icriverzi, M; Rusen, L; Sima, LE; Moldovan, A; Brajnicov, S; Bonciu, A; Mihailescu, N; Dinescu, M; Cimpean, A; Roseanu, A; Dinca, V; "In vitro behavior of human mesenchymal stem cells on poly(N-isopropylacrylamide) based biointerfaces obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation"; *APPLIED SURFACE SCIENCE* 440, 712-724 (2018).
20. Dinca, V; Zaharie-Butucel, D; Stanica, L; Brajnicov, S; Marascu, V; Bonciu, A; Cristoclea, A; Gaman, L; Gheorghiu, M; Astilean, S; Vasilescu, A; "Functional *Micrococcus lysodeikticus* layers deposited by laser technique for the optical sensing of lysozyme"; *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES* 162, 98-107 (2018).



21. Mitran, V; Dinca, V; Ion, R; Cojocaru, VD; Neacsu, P; Dinu, CZ; Rusen, L; Brajnicov, S; Bonciu, A; Dinescu, M; Raducanu, D; Dan, I; Cimpean, A; "Graphene nanoplatelets-sericin surface-modified Gum alloy for improved biological response"; RSC ADVANCES 8 (33) 18492-18501 (2018).
22. Shaojun Peng, Yongzhi Men, Ruihong Xie, Yefei Tian, Wuli Yang, Biodegradable phosphorylcholine-based zwitterionic polymer nanogels with smart charge-conversion ability for efficient inhibition of tumor cells, *Journal of Colloid and Interface Science* 539 (2019) 19–29, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.12.035>;
23. Yihua Liu, Yuuki Inoue, Atsushi Mahara, Sachiro Kakinoki, Tetsuji Yamaoka and Kazuhiko Ishihara, Durable modification of segmented polyurethane for elastic blood-contacting devices by graft-type 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine copolymer, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2014.920172>.
24. Shuiian-Yin Lin, Vijaya Rohini Parasuraman, Shewaye Lakew Mekuria, Sydney Peng, Hsieh-Chih Tsai, Ging-Ho Hsiue, Plasma initiated graft polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine on silicone elastomer surfaces to enhance bio(hemo)compatibility, *Surface & Coatings Technology* 315 (2017) 342–349, <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.02.039>
25. Chen, S., Li, L., Zhao, C., and Zheng, J. (2010). Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer* 51, 5283–5293. doi: 10.1016/j.polymer.2010.08.022;
26. He, M., Gao, K., Zhou, L., Jiao, Z., Wu, M., Cao, J., et al. (2016). Zwitterionic materials for antifouling membrane surface construction. *Acta Biomater.* 40, 142–152. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.038
27. Owens, D. K., and Wendt, R. C. (1969). Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 1741–1747. doi: 10.1002/app.1969.070130815;
28. Kaelble, D. H. (1970). Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. *J. Adhes.* 2, 66–81. doi: 10.1080/0021846708544582
29. Yuan, Y., Hays, M. P., Hardwidge, P. R., and Kim, J. (2017). Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Adv.* 7, 14254–14261. doi: 10.1039/c7ra01571b

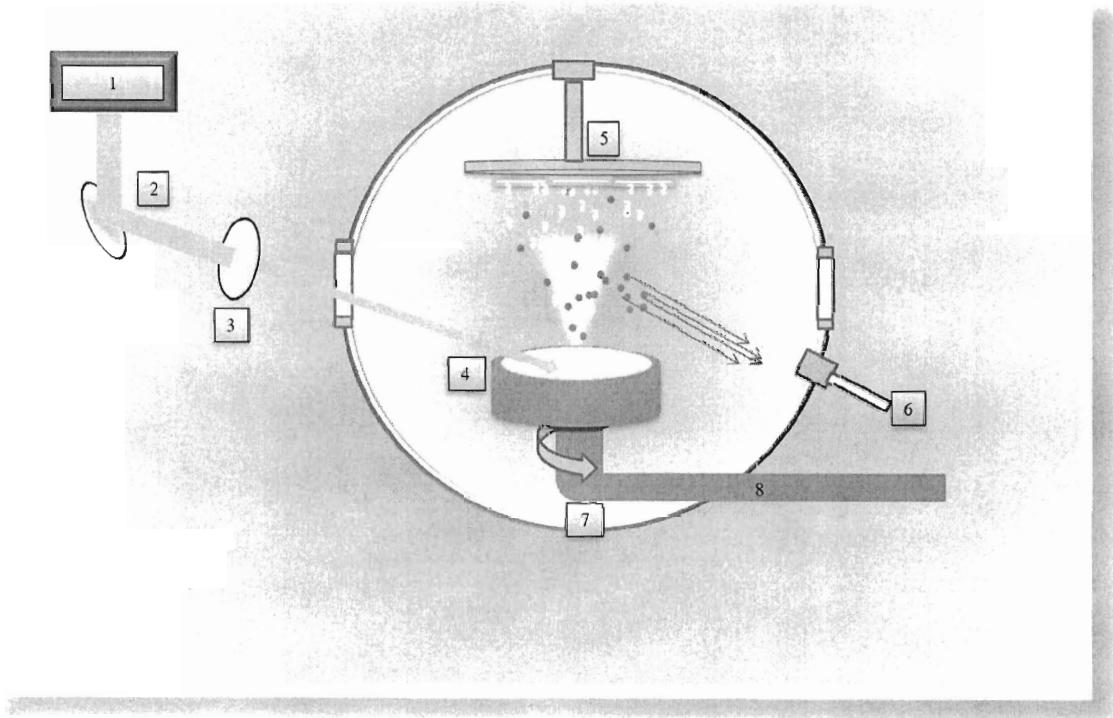


**Revendicari**

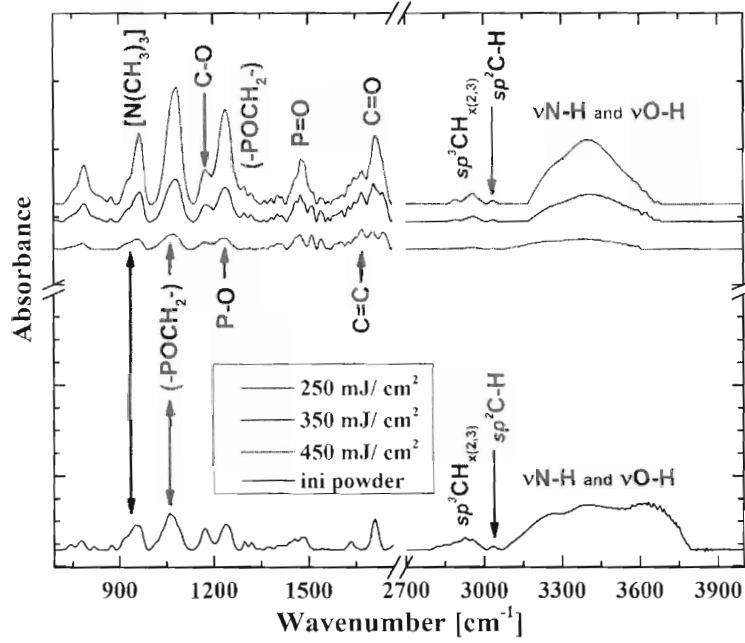
- 1. Straturile polimerice de MPC sunt caracterizate prin aceea ca pot fi obtinute sub forma de film subtire prin metoda MAPLE, pana in prezent fiind obtinute doar ca hidrogeluri.**
- 2. Noile straturi active obtinute în conditiile revendicarii 1, sunt caracterizate de imbunatatirea caracteristicilor de hidrofilicitate ale suprafetei in conditiile de evaporare cu fluenta maxima folosita ( $450 \text{ mJ/cm}^2$ ) fata de fluentele de 250, respectiv  $350 \text{ mJ/cm}^2$ .**
- 3. Straturile subtiri de MPC obtinute în conditiile revendicarii 1 sunt caracterizate prin aceea ca prezinta activitate antimicrobiana, atat pe o specie bacteriana Gram pozitiv (*S. aureus* ATCC 25923), cat si pentru o specie Gram negativ (*E. coli* ATCC 25922), acoperirile ducand la reducerea semnificativa a dezvoltarii de colonii microbiene pe suprafata.**



Desen 1



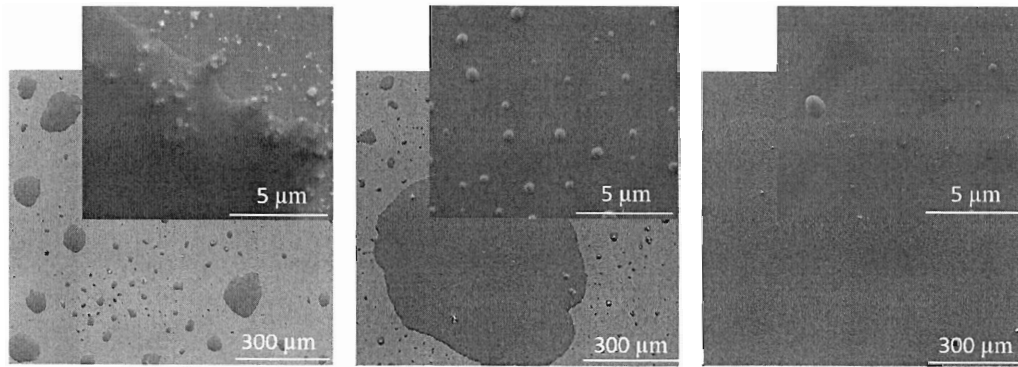
Desen 2



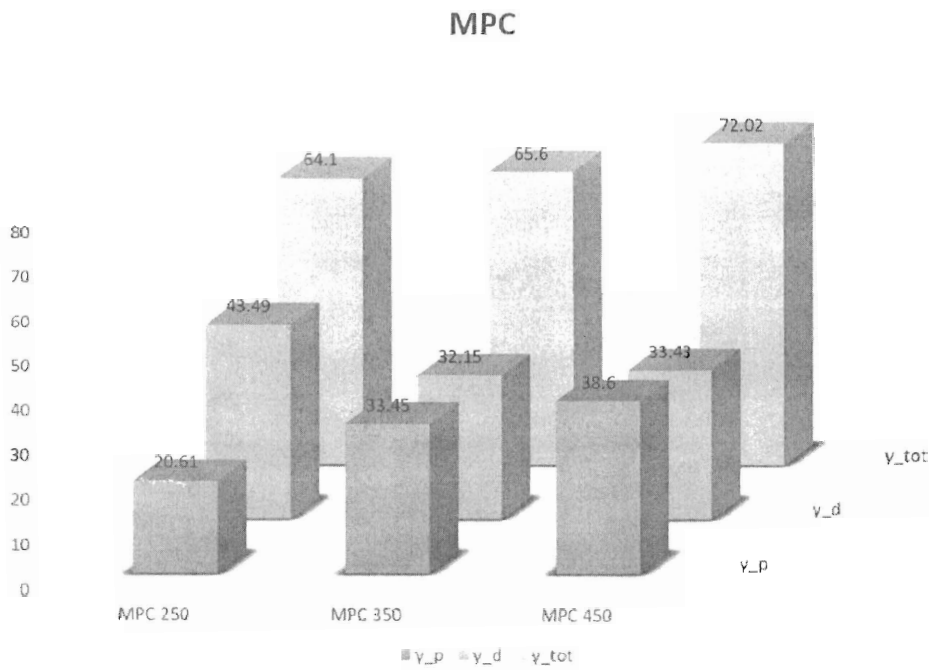
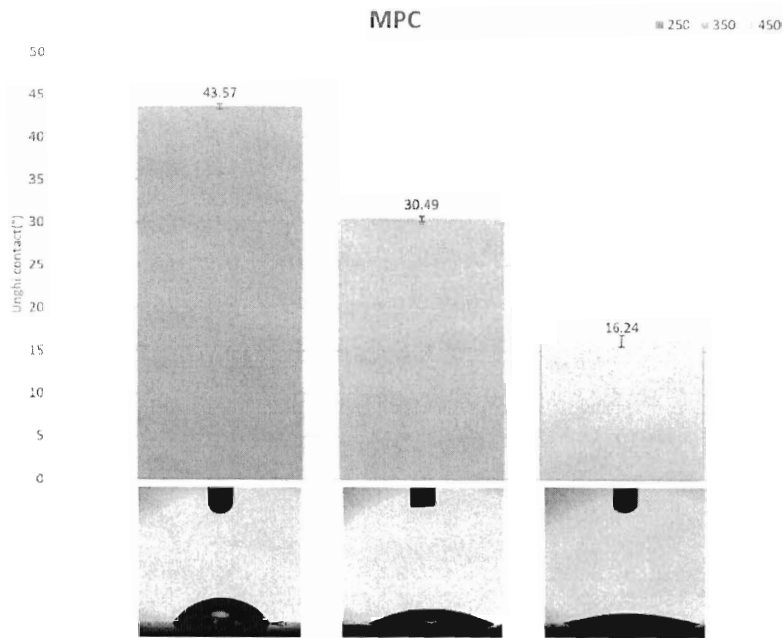
*Emil*



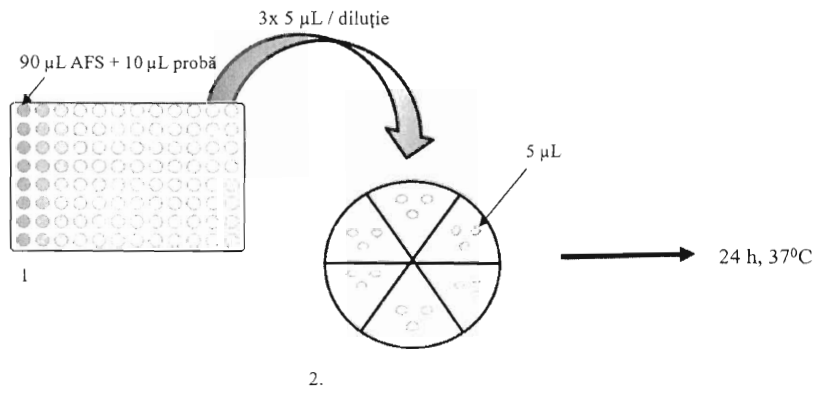
Desen 3



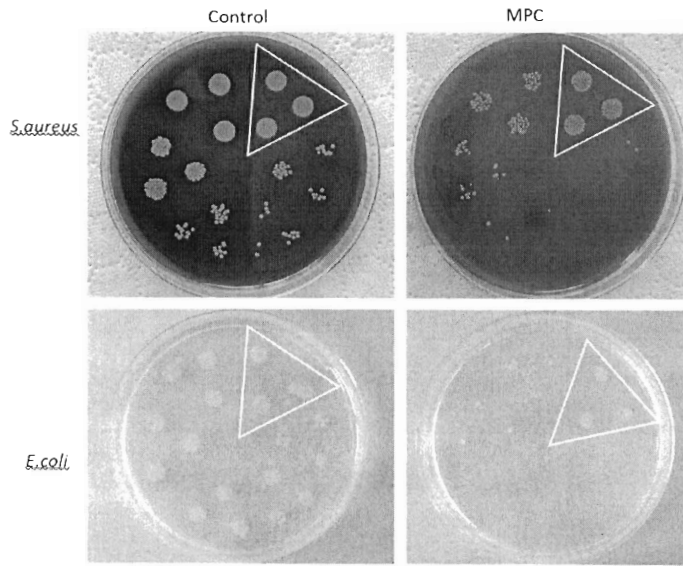
Desen 4



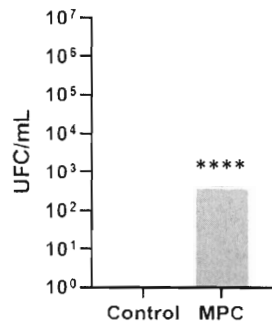
Desen 5



Desen 6



Desen 7

**A. *E.coli* ATCC 25922****B. *S.aureus* ATCC 25923**