



# *Studiul unor materiale compozite conținând agenți antimicrobieni*

*Doctorand: Szabolcs-Zsolt Benyey*

*Conducător științific: Prof. Dr. Viorica Simon*

CLUJ-NAPOCA, 2013

## Conținut

Conținut.....	2
Introducere.....	3
1 Interacțiuni sticlă bioactivă - suprafață de mediu biologic.....	4
1.1 Prepararea probei.....	5
1.2 Investigarea atașamentului de proteine.....	5
2 Studiul sticlelor bioactive încărcate cu tetraciclină.....	8
2.1 Pregătirea de sticle bioactive.....	8
2.2 Microsfere uscate prin pulverizare.....	8
2.3 Sticlă bioactivă preparată prin metoda sol-gel.....	12
3 Studiul sticlelor SiCaP încărcate cu diferite antibiotice.....	14
3.1 Prepararea sticlei bioactive.....	15
3.2 Xerogel de sticlă bioactivă.....	15
3.3 Aerogeluri.....	24
Concluzii generale.....	29
Referințe.....	31
Anexe.....	33

## Introducere

Sticlele calcofosfatice sau bioceramice sunt folosite frecvent în înlocuirea țesutului osos datorită biocompatibilității și osteoconductivității lor excelente. Numeroase studii arată că materialele apatitice favorizează formarea și regenerarea osoasă, având caracteristici optime de suprafață pentru aderența, proliferarea și diferențierea celulelor osteoblaste [1]. Dacă procedurile sunt realizate de chirurghi experimentați, implanturile ortopedice folosite la fixarea oaselor sau la înlocuirea articulațiilor prezintă o incidență scăzută a infecțiilor (< 1 – 2%) [2], dar numărul absolut de aceste infecții este anticipat să crească împreună cu creșterea numărului victimelor cu traumatisme și pacienților vârstnici care necesită fixare osoasă sau înlocuirea articulațiilor [3].

Aderența bacteriană pe dispozitivele medicale reprezintă primul pas în dezvoltarea infecțiilor și în ciuda tuturor eforturilor depuse, cum ar fi utilizarea de încăperi special sterilizate, curgerea laminară a aerului și profilaxia sistemică cu antibiotice în cursul intervențiilor, ele nu pot fi prevenite în întregime. Aceasta la rândul său duce la colonizarea bacteriană a suprafeței care să conducă la formarea unui biofilm microbial [4]. Microfilmele bacteriene reprezintă o strategie de dezvoltare și supraviețuire naturală a bacteriei, fiind modalitatea preferată de existență față de forma planctonică. Biofilmul maturizat protejează bacteriile prin mai multe mecanisme de apărare legate de morfologia biofilmului, oferind un adăpost unic pentru bacterii în care să prospere, rezultând astfel într-o creștere a rezistenței bacteriilor la antibiotice cu până la mii de ori și la capacității de regenerare după atacurile cu acestea [5]. Ca o consecință a biofilmului, asociat cu alimentarea redusă cu sânge a rănilor chirurgicale, care de multe ori sunt greu accesibile și astfel îngreunează livrarea medicamentelor la implanturi, tratamentele sistемice cu antibiotice au o eficiență redusă în tratarea acestor infecții [6]. Tratamentul sistемic are, de asemenea, aspectul negativ de efecte secundare și de toxicitate pentru a menține o doză mare de antibiotic în sânge, peste concentrația terapeutică. Dacă însă concentrația antibiotică din sânge cade sub nivelul inhibitor, poate apărea rezistență în bacteriile contaminatoare. În unele cazuri, de exemplu în catetere și valve cardiace materialele pot fi adaptate în așa fel încât să reducă la minim adeziunea proteinelor și ulterior cea de bacterii. Dar în domeniul ortopedic se dorește atașarea țesutului gazdă, astfel încât metodele anti-aderente nu pot fi utilizate. În schimb eliberarea de antibiotic local poate fi o procedura promițătoare pentru livrarea de medicamente la locul dorit în mod eficient, acțiune continuă, fără ca ele să aibă efecte secundare sistемice [7, 8].

Având în vedere toate informațiile introduse mai sus scopul principal al acestei teze a fost de a dezvolta sticle bioactive încărcate cu antibiotic ca sistem de livrare locală a medicamentului în vederea posibilei aplicări în ingineria tisulară. Proiectarea de materiale, cu proprietăți de regenerare

osoasă, proprietăți mecanice și funcționale bune este o alternativă promițătoare la utilizarea de alografe, autografe și metale. Pentru această abordare au fost considerate materialele bioactive mezoporoase pe bază de dioxid de siliciu. Ele combină bioactivitatea cu o reactivitate mare care duce la formarea de cristale apatitice ca și faze similare cu componentă anorganică a oaselor. În plus, ele prezintă un volum mare al porilor, distribuție îngustă a dimensiunii porilor și suprafață specifică mare, care permit o încărcare și profil de eliberare bună. Adsorbția de medicamente în matricele mezoporoase este determinată de mărimea porilor, dar precum majoritatea medicamentelor utilizate în practica clinică care sunt în scara nanometrică, ele pot fi introduse cu ușurință în porii matricei mezoporoase. A fost demonstrat că o suprafață mai mare, crește capacitatea de încărcare a matricei [9].

Din punct de vedere al structurii, prezenta teză se compune din șase capitole, precedate de introducerea prezentată, lista de tabele și figuri și urmate de concluzii generale de asemenea prezentate aici, și referințe.

Primul capitol cuprinde o prezentare generală a biomaterialelor, a infecțiilor legate de acestea și a antibioticelor utilizate. Al doilea descrie metodele de sinteză folosite pentru prepararea mostrelor de sticlă bioactivă, a aerogelurilor și a microsferelor. Iar în capitolul al treilea sunt prezentate pe scurt metodele experimentale folosite în prezenta lucrare, cu descrierea aparatelor și a parametrilor de examinare folosite în lucrare. Primele trei capitole nu sunt prezentate în rezumat.

Rezultatele tezei sunt prezentate în ultimele trei capitole, de asemenea rezultatele selectate vor fi prezentate în acest rezumat, în ordinea în care au fost prezentate în teză. Capitolul patru prezintă absorbția proteinelor pe sticlele bioactive în diferite condiții, cu ajutorul spectroscopiei fotoelectronice de raze X și a unor analize de suprafață specifică. Capitolul cinci se împarte în două părți și descrie absorbția și profilul de eliberare a tetraciclinei din mirosfere și xerogeluri preparate după metoda sol-gel, cu compoziția asemănătoare sticlei 45S5Bioglass®. Ultimul capitol, se împarte și el în două părți: prima parte prezintă caracteristicile xerogelurilor, în timp ce a doua se ocupă cu caracteristicile aerogelurilor, ambele având la bază o sticlă bioactivă preparată prin metoda sol-gel cu compoziție 60%SiO<sub>2</sub> 30%CaO 10%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (molar %). Atât probele xerogel cât și cele aerogel sunt studiate ca sisteme potențiale de livrare locală de medicamente. În această privință, a fost evaluat profilul de încărcare și eliberare a patru antibiotice diferite atât pe xerogeluri cât și pe și aerogeluri.

## **1 Interacțiuni sticlă bioactivă - suprafață de mediu biologic**

Primul lucru cu care biomateriale vin în contact atunci când sunt introduse într-un mediu biologic sunt fluidele biologice și, în consecință proteinele din aceste fluide [10]. Este important să se

înțelegă interacțiunile dintre mediul biologic și biomateriale. Adsorbția proteinelor pe suprafață determină formarea de biofilme, un proces prezent în infecții asociate cu implanturi medicale, carii dentare, și tehnologii al mediului. Unul din factorii cunoscuți ce influențează adsorbția de proteine este concentrația ionică în lichidul în care proteinele se dizolvă [11], Ca și un model de proteine este ales methemoglobina de cal, fiindcă în cea mai mare parte este similară cu methemoglobina umană, dar este mult mai comună [12].

## 1.1 Prepararea probei

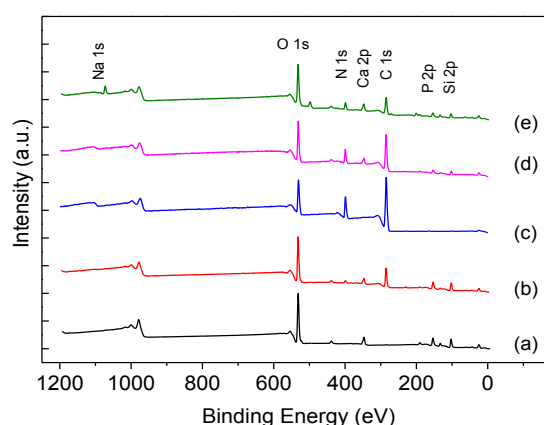
Matricea din sticlă bioactivă utilizată în acest studiu a fost pregătită utilizând metoda sol-gel (45% SiO<sub>2</sub>, 24.5% Na<sub>2</sub>O, 24.5% CaO 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Precursorii folosiți au fost tetraethoxysilane (TEOS), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> și Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. După gelare proba se maturează la temperatura camerei timp de 30 de zile, urmată de un tratament termic la 310 °C timp de 1 oră. Pentru a stimula în continuare adsorbția de proteine, suprafața de sticlă bioactivă a fost silanizată cu 3-aminopropil-trietoxisilan (APTS) și apoi tratat cu glutaraldehydă (GA), în calitate de agent de cuplare a proteinei [13]. pH-ul soluției a fost ajustat la 8 (folosind HCl 1M) menținând temperatura la 80 °C. După silanizare proba a fost spălată cu apă deionizată, apoi funcționalizată cu glutaraldehydă (GA) [CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>CHO)<sub>2</sub>] (1mol/L) timp de o oră, urmată de clătirea în apă deionizată. Pentru adsorbția de proteine pulberea de sticlă bioactivă funcționalizată GA a fost imersată în soluție de methemoglobina de cal, timp de 4 ore. Soluția de methemoglobina de cal se prepară cu soluție salină - fosfat tamponată (pH = 7,4, 2 mg / ml), folosind două concentrații diferite de sare (10 mM NaCl și 500 mM NaCl). Pentru ambele concentrații de sare cantitatea de methemoglobină de cal în soluție a fost de 25 mg / ml. Pentru a elimina proteinele neatașate la suprafață, probele au fost spălate de trei ori în soluții tampon și apoi liofilizate.

## 1.2 Investigarea atașamentului de proteine

### 1.2.1 Investigare de suprafață (XPS)

Pentru a evalua adsorbția methemoglobinei pe suprafața sticlei bioactive, măsurătorile XPS au fost efectuate pe sticla bioactivă (BG), după funcționalizarea cu glutaraldehydă (BG-GA) și după imersie în soluție de proteine în mediul sare mică și mare.

Folosind spectrele survey (Figura 1-1), compoziția elementară din primii 10 nm ai probelor poate fi stabilită cu exactitate. Sticla bioactivă, ca preparat, conține oxigen, siliciu, calciu, fosfor, sodiu cum era de așteptat din preparare și, de asemenea,



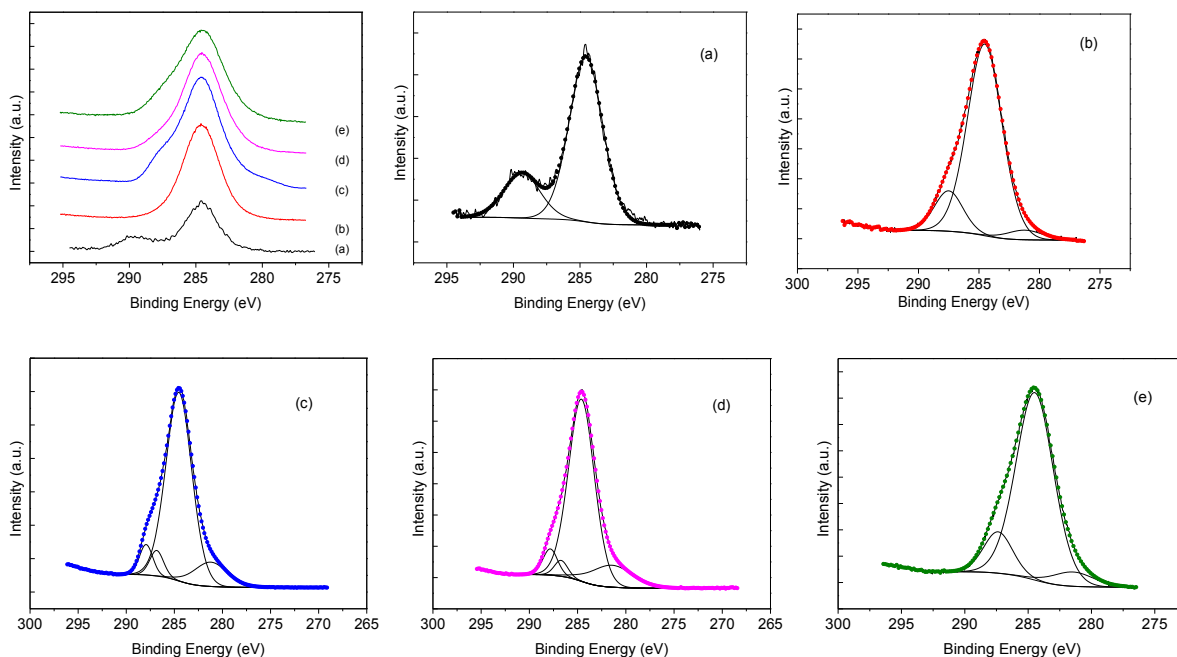
**Figura 1-1:** Spectrele XPS survey al BG (a), BG cu GA (b), methemoglobina de cal liofilizată (c), și BG-GA după imersie în soluție de proteine cu 10 mM NaCl (d) și 500 mm NaCl (e), respectiv,

mici cantități de carbon. Carbonul apare pe toate suprafețele expuse la aer și poate fi utilizat pentru a calibra compensarea de sarcini a probelor [14]. Concentrația atomică a fost calculată cu software-ul CasaXPS. Din aceste date (Tabelul 1-1) evoluția elementelor pe suprafața de sticlă poate fi urmată.

**Tabelul 1-1:** Compoziția elementală de sticlă bioactivă înainte și după modificarea suprafeței cu methemoglobină în 10 mM și în 500 mM NaCl soluții tampon

Probă	Compoziție elementală (at %)									
	Si	Ca	P	Na	C	O	N	S	Cl	
<b>BG</b>	32.6	5	2.3	1.4	5.6	53	-	-	-	
<b>BG-GA</b>	18	2.9	1.5	-	40.5	33.6	3.4	-	-	
<b>MetHb</b>	-	-	-	-	64.8	18.4	16.7	0.1	-	
<b>BG-GA MetHb (10 mM)</b>	5.8	2.1	1	0.1	58.1	21.4	11.5	-	-	
<b>BG-GA MetHb (500 mM)</b>	10	3.5	3	2.6	38	33	7.7	-	2	

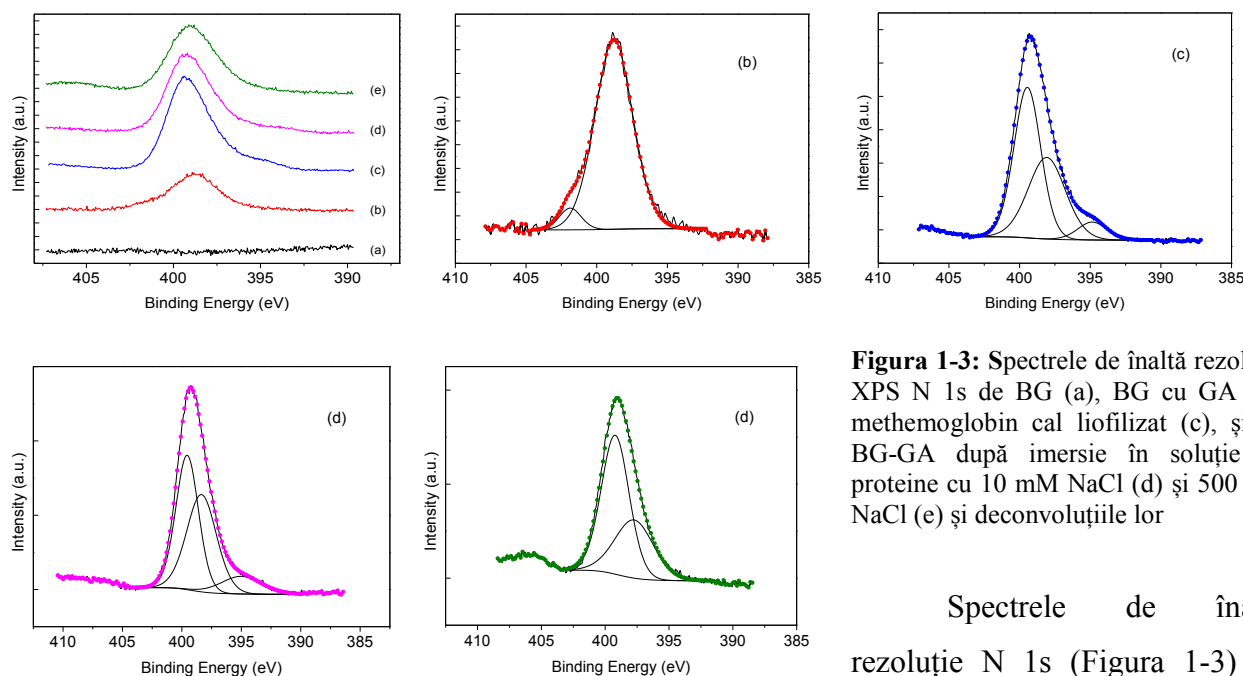
După silanizare și tratament GA, concentrația vârfului de carbon crește în mod semnificativ, de asemenea, apare o concentrație mică de azot. Acestea sunt de asemenea însoțite de o scădere mică în celelalte componente ale BG, ceea ce înseamnă că o modificare a suprafeței a fost atinsă cu succes. Methemoglobina conține în cea mai mare parte carbon, oxigen și azot (Tabelul 1-1). Concentrația ridicată de carbon și azot în ambele probe imersate în soluție de methemoglobină dovedește atașarea proteinei, fapt susținut de rapoartele apropiate de C și N în ambele probe comparativ cu proteina liofilizată. Deși atașarea de proteine este evidentă în ambele concentrații de sare, efectul este mai pronunțat pentru tamponul cu conținut de sare mai mic. Atât vârfurile de carbon cât și cele de azot apar aproape de două ori mai intense, comparativ cu probele obținute în soluție de sare de mare.



**Figura 1-2:** Spectrele de înaltă rezoluție de XPS C 1s pentru BG (a), BG cu GA (b), methemoglobină de cal liofilizată (c), și de BG-GA după imersie în soluție de proteine cu 10 mM NaCl (d) și 500 mM NaCl (e) și deconvoluțiile lor.

Spectrele de înaltă rezoluție oferă informații despre starea chimică a elementelor. Spectrele de înaltă rezoluție C 1s (Figura 1-2) înregistrate pentru probele încărcate cu proteine, în comparație cu probele goale au vârfuri mai intense și asimetrice, confirmând prezența de noi tipuri de legături de carbon [15, 16].

Deconvoluția spectrelor de înaltă rezoluție de carbon prezintă pentru substratele non-funcționalizate un vârf la 284,6 eV, corespunzând legăturii C-C și C-H provenind din contaminarea din aer, precum și unul la 289 eV reprezentând carbon din carbonatul care rămâne încă de la precursorii din sticlă bioactivă. Pentru probele funcționalizate și acoperite cu proteine vârful din carbonați dispare. Componente suplimentare apar pentru probe care conțin proteine, similar proteinelor pure: la 287.5 eV și 285.6 eV atribuită respectiv NH-CHR-CO și-C (= O)-NH<sub>2</sub>. Datorită efectului de încărcare vârfurile au un umăr la energii de legătură mai mică (aproximativ 281 eV).



**Figura 1-3:** Spectrele de înaltă rezoluție XPS N 1s de BG (a), BG cu GA (b), methemoglobin cal liofilizat (c), și de BG-GA după imersie în soluție de proteine cu 10 mM NaCl (d) și 500 mm NaCl (e) și deconvoluțiile lor

Spectrele de înaltă rezoluție N 1s (Figura 1-3) nu prezintă azot în matricea goală de sticlă bioactivă. Deconvoluțiile N1s pe probele care conțin proteine prezintă două componente principale la aproximativ 400 de eV și 397.8 eV, care pot fi atribuite ca azot în matricele organice, referitoare la legături N-C [17]. Un vârful mic apare la aproximativ 395 eV, pentru proteine în sine și proteine absorbite din soluția de sare scăzută.

### 1.2.2 Analiză de suprafață specifică (BET)

Suprafață specifică BET și volumul de pori sunt arătate în Tabelul 1-2. Suprafața a crescut semnificativ după adsorbția de proteine pentru probele preparate cu joasă, și înaltă concentrație de sare. Volumul porilor scade odată ce suprafață este încărcată, acest efect fiind și mai accentuată pentru proba imersată în soluție îmbogățită cu proteine cu concentrație scăzută în sare. Măsurarea suprafeței specifice și volumului de pori sugerează o cantitate mai mare de proteină adsorbită în cazul concentrației scăzute de sare, care expune o suprafață mai mare și sporește porozitatea suprafeței.

Sample	BET surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Pore volume (ml/g)
BG	98.6	0.46
BG-GA	106.0	0.38
BG GA MetHb (10 mM NaCl)	133.2	0.22
BG GA MetHb (500 mM NaCl)	121.7	0.23

**Tabelul 1-2:** Suprafața specifică și volumul porilor înregistrate înainte și după adsorbție de methemoglobină

## 2 Studiul sticlelor bioactive încărcate cu tetraciclina

Pentru a diminua riscul bacteriologic asociat cu un implant, un sistem local de eliberare a antibioticelor este dorit. Tetraciclina este un antibiotic cu spectru larg [18] cu o acțiune anti-inflamatoare, care, în plus, prezintă activitate anti-colagenază, inhibă resorbția osoasă, și are capacitatea de a promova atașamentul și proliferarea de fibroblaste [19, 20]. Tetraciclina este, de asemenea, un inhibitor al activității de proteinaze și, prin urmare, poate fi utilizat pentru tratamentul sau prevenirea bolilor, cum ar fi metastaza cancerului, artrita reumatoidă și osteomielite [21].

### 2.1 Pregătirea de sticle bioactive

Au fost preparate xerogeluri cu o compoziție apropiată de cea a 45S5Bioglass®. Folosind metoda sol-gel descrisă mai sus cu materii prime TEOS, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·HPO<sub>4</sub> și Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ca și SiO<sub>2</sub>, CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> respectiv Na<sub>2</sub>O sub formă de precursori, pentru a forma matricea de sticlă cu o compoziție 45SiO<sub>2</sub>·24.5CaO·24.5Na<sub>2</sub>O·6P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (mol %). După pregătirea solului uscarea a fost realizată în două moduri diferite: prin procesul de uscare prin pulverizare și prin maturare, urmată de un tratament termic.

### 2.2 Microsfere uscate prin pulverizare

#### 2.2.1 Prepararea microsferelor

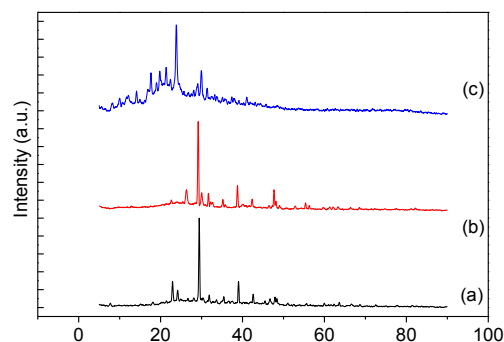
Pentru a produce microsfele uscate prin pulverizare încărcate cu tetraciclina, tetraciclina (achiziționată de la Sigma-Aldrich) a fost dizolvată în soluție tamponată de fosfat salin (PBS) și a fost amestecată în sol cu concentrația 1mg/ml, omogenizat timp de o jumătate de oră. Solul omogen care conține antibioticul a fost alimentat în aparatul Buchi Mini Spray Dryer B-290.



## 2.2.2 Caracterizarea Microsferelor

### 2.2.2.1 Difrakție de raze X (XRD)

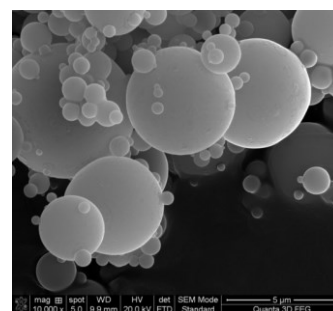
Figura 2-1 evidențiază difractogramele de sticlă bioactivă uscată prin pulverizare, SD45 TCL și pur TCL. Deoarece tetraciclină a fost încorporată în interiorul probelor SD45-TCL tratamentul termic nu a fost efectuat în scopul păstrării structurii antibioticului. Această lipsă de tratament termic poate cauza ca precursorii și solvenții din materiale să rămână prinși în interiorul sferelor, precum și a impurităților sub formă de  $\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_2\text{N}_4$  și  $\text{NaNO}_3$  cum au fost identificate ca cele mai mari vârfuri situate la  $29^\circ$  și  $39^\circ$  prezente în biosticlă simplă și cea încărcată cu tetraciclină. Eșantionul încărcat cu tetraciclină arată și unele dintre vârfurile antibioticului, precum în jurul valorii de  $31^\circ$ .



**Figura 2-1:** Difractogramele XRD de sticlă bioactivă uscată prin pulverizare (a), SD45 TCL (b), și pur TCL (c).

### 2.2.2.2 Caracterizarea morfologică (SEM)

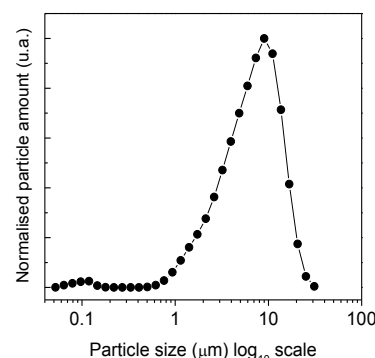
Imaginile SEM înregistrate după pulverizare (Figura 2-2) arată că s-au obținut microsferice cu două distribuții de mărime, majoritatea microsferelor fiind în intervalul de 5-10  $\mu\text{m}$ , dar există, de asemenea, particule mai mici în intervalul de 0,1-0,3 micrometri. Suprafața microsferelor, de asemenea, pare netedă și ele par a fi în cea mai mare parte intacte.



**Figura 2-2:** Imagine SEM; mărime 10000X

### 2.2.2.3 Determinarea dimensiunii particulelor și suprafeței specifice

Distribuția diametrului mediu pentru microsfericele de sticlă bioactivă este în jur de 10  $\mu\text{m}$ , dar o distribuție de particule mai mici în jurul 0,1  $\mu\text{m}$  este de asemenea prezentă (Figura 2-3). Această constatare se corelează cu imaginile SEM care arată aceleași dimensiuni de particule, cu două distribuții separate. Studiile realizate pe microsferice de sticlă bioactivă în această gamă de dimensiuni prezintă o bioactivitate bună [22].



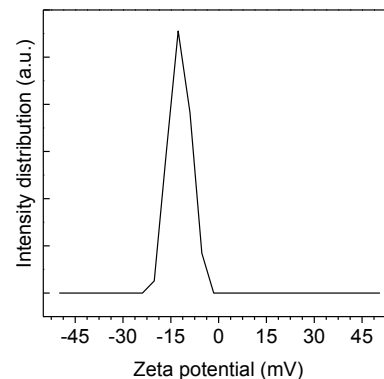
**Figura 2-3:** Particle size distribution of the microspheres.

Aria suprafeței materialului a fost determinată utilizând metoda BET prin adsorbție/desorbție de azot. S-a constatat că microsfericele au o suprafață mică în

jurul valorii de 4 m<sup>2</sup>/g și pentru ca valorile de volum de pori au fost sub limita de detecție a aparatului, volumul porilor nu a putut fi măsurat.

#### 2.2.2.4 Măsurători de potențial Zeta

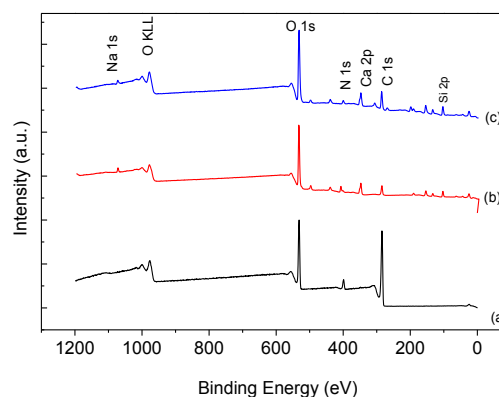
A fost demonstrat că potențialul negativ Zeta este benefic pentru fixarea și proliferarea celulelor osoase [23, 24]. Valoarea obținută prin măsurători a fost  $-12.1 \pm 1,5$  mV la un pH neutru (Figura 2-4). Aceasta se află sub pragul de stabilitate, ceea ce înseamnă că este posibil ca microsfele să agrege, fapt evidențiat și de imaginea SEM (Figura 2-2).



**Figura 2-4:** Potențial zeta la pH neutru a microsferelor

#### 2.2.2.5 Investigarea suprafeței (XPS)

Măsurătorile XPS au fost efectuate pe SD45 TCL și tetracilină pură. De asemenea măsurători XPS au fost efectuate pe microsfele din sticlă bioactivă după procedura de eliberare descrisă mai jos, pentru a evalua dacă există antibiotic pe suprafețele microsferelor după eliberare.



**Figura 2-5:** Studiul XPS a spectrelor de tetracilină pură (a), (b) SD45-TCL înainte de eliberare și (c) SD45-TCL după eliberare.

Concentrațiile atomice (Tabelul 2-1) de peste 20% de carbon, precum și concentrații de azot apropiate de tetracilină pură, arată în mod clar antibiotic disponibil pe suprafața sticlei. Cantitatea de carbon nu scade în totalitate, nici după studiul de eliberare, ceea ce arată că o parte din antibiotic este puternic atașată de matricea de sticlă, și va fi eliberată numai treptat odată cu bioabsorbția matricei. Acesta este un efect dorit și permite tratamentul local al locurilor de implantare pe termen lung.

**Tabelul 2-1:** Compoziția chimică a suprafeței pentru tetracilină pură și microsfele BG-TCL înainte și după eliberare

Proba	Compoziție elementară (at %)						
	C	N	O	Si	Ca	P	Na
TCL	72.9	5.4	21.6	-	-	-	-
BG-TCL	21.0	8.4	48.0	11.7	5.5	3.9	1.1
BG-TCL (după eliberare)	26.4	3.4	43.7	15.3	4.9	5.0	0.9

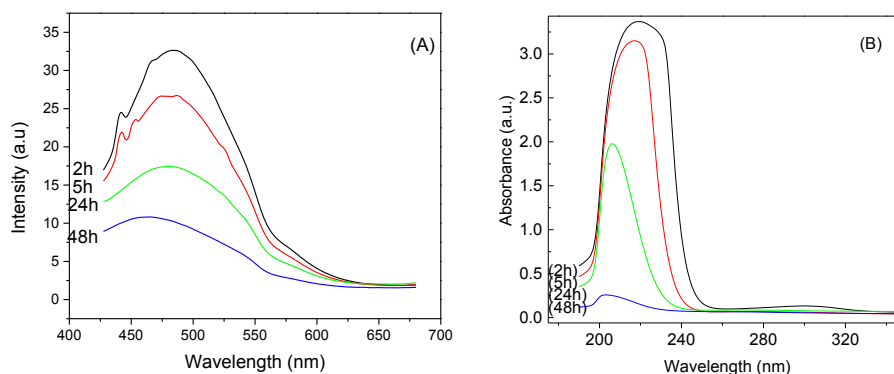
#### 2.2.3 Studiu de eliberare a tetracilinei

Pentru testele de livrare, sticlă uscată prin pulverizare (BG-TCL) (35 mg) a fost imersată în 5 ml fluid biologic simulat (SBF) preparat conform protocolului Kokubo, pH 7,4, și a fost păstrat la temperatura de 37 ° C, timp de 2, 5, 24 și 48 ore în tuburi Falcon, cu agitare continuă. După fiecare

perioadă, soluția SBF a fost complet eliminată din tubul de analiză și înlocuită cu alta proaspăt preparată.

### 2.2.3.1 Măsurători de spectroscopie fluorescență și UV-Vis

SBFul îndepărtat după cum a fost descris anterior, a fost analizat prin spectroscopie de fluorescență și UV-Vis. Spectrele de fluorescență și UV-Vis în Figura 2-6 nu sunt normalizate astfel sunt direct proporționale cu concentrațiile de antibiotice eliberate. Curba de eliberare arată unele tendințe exponențiale la început, dar se apropie liniar după un timp.



**Figura 2-6:** Fluorescența (A) și absorbanta UV-Vis (B) pentru spectrele de tetraciclină eliberate din sticlă bioactivă uscate prin pulverizare după 2, 5, 24 și 48 de ore

### 2.2.4 Inhibarea antimicrobiană

Testele de inhibiție antimicrobiană au fost efectuate pe *S. aureus* rezistent la meticilină tulpina UCLA 8076 cu o concentrație  $5 \cdot 10^5$  CFU/ml. Pentru această probă TCL SD45 a fost diluată în apă ultra pură (75 mg/ml) și răspândită pe jumătate de vas Petri iar bacteriile fiind răspândite pe toată suprafața. După incubare la 36.8 °C timp de 24 h, vasul a fost examinat. După cum se poate observa în Figura 2-7



**Figura 2-7:** Rezultate antimicrobiene inhibarea SD45 TCL

sunt în concentrații mai mari, dar nu reușesc să prevină formarea în totalitate a bacteriilor pe partea tratată cu microsferă. Deși concentrația de antibiotic și doza eliberată ar trebui să fie mai eficientă în inhibare, acest lucru nu se observă aici. Aceasta poate fi cauzată de căldură inițială în timpul pulverizării, care ar putea deteriora structura antibioticului, și care duce la inactivarea acestuia. Acest antibiotic deteriorat s-ar putea vedea în continuare în studiile de spectroscopie, dar va avea efect redus asupra bacteriilor în sine.

## 2.3 Sticlă bioactivă preparată prin metoda sol-gel

### 2.3.1 Pregătirea probei

Procedura de uscare convențională a implicat maturarea solului la temperatura camerei timp de 30 zile, urmată de tratament termic la 310 °C timp de 1 oră. Proba obținută în acest fel se va numi SG45. Încărcarea cu tetraciclină a SG45 a fost efectuată prin scufundarea în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) îmbogățită cu tetraciclină (7 mg / ml), și a fost numită SG45 TCL. Proba a fost analizată după imersie la 37 ° C timp de aproximativ 6 ore, în scopul stabilirii cantității de tetraciclină adsorbită. Pentru studiul de eliberare 35 mg de SG45 TCL au fost imersate în 10 ml SBF și ținute pentru 2, 5, 24 și 48 de ore. După fiecare perioadă de timp, SBF se colectează și este înlocuită cu una proaspătă. SG45 a fost tratată în conformitate cu aceeași procedură ca și SG45 TCL.

### 2.3.2 Caracterizarea probei.

#### 2.3.2.1 Caracterizarea morfologică (SEM)

Imaginile SEM ale biosticlei înainte și după încărcare cu antibiotic sunt prezentate în Figura 2-8. Imaginea înregistrată înainte de încărcare prezintă o structură lamelară a materialului și un caracter poros. După procesul de încărcare suprafața capătă un aspect pufos, care ar putea fi asociate cu adsorbția de tetraciclină [25].

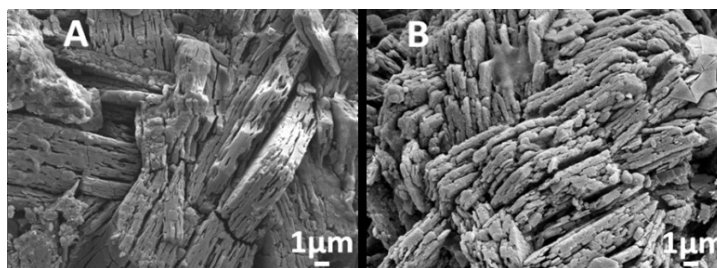


Figura 2-8: Imaginile SEM SG45 înainte de (A) și după (B) încărcare cu tetraciclină

#### 2.3.2.2 Analiză de suprafață (XPS)

Pentru a evalua compoziția suprafeței de SG45 înainte și după încărcare, a fost utilizată spectroscopia XPS. Cu ajutorul acestei tehnici poate fi determinată compoziția primilor 10 nm ai suprafeței pentru probele studiate. Analiza XPS a spectrelor de survey (Figura 2-9) înregistrate pentru tetraciclina pură, și probele cu și fără tetraciclină atât înainte cât și după imersia în SBF au avut scopul de a determina diferența de compoziție în stratul exterior. După cum se poate observa din Tabelul 2-2 carbonul și azotul pot fi utilizate ca și markere de tetraciclină adsorbită [23], deoarece cele două elemente nu sunt prezente în sticlă, chiar dacă contaminarea cu carbon este inevitabilă și imprevizibilă în practică.

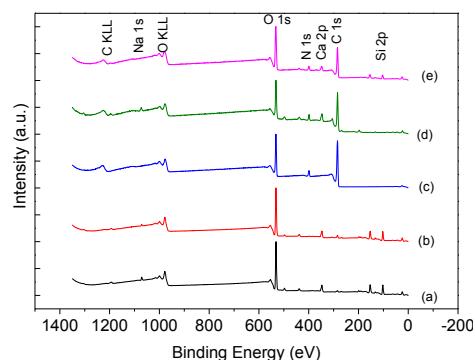


Figura 2-9: Spectrele XPS pentru SG45 (a), SG45 imersat în SBF (b), TCL pur (c), și SG45 TCL (d) și de SG45 TCL după 96 h imersie în SBF pentru eliberare de tetraciclina (e)

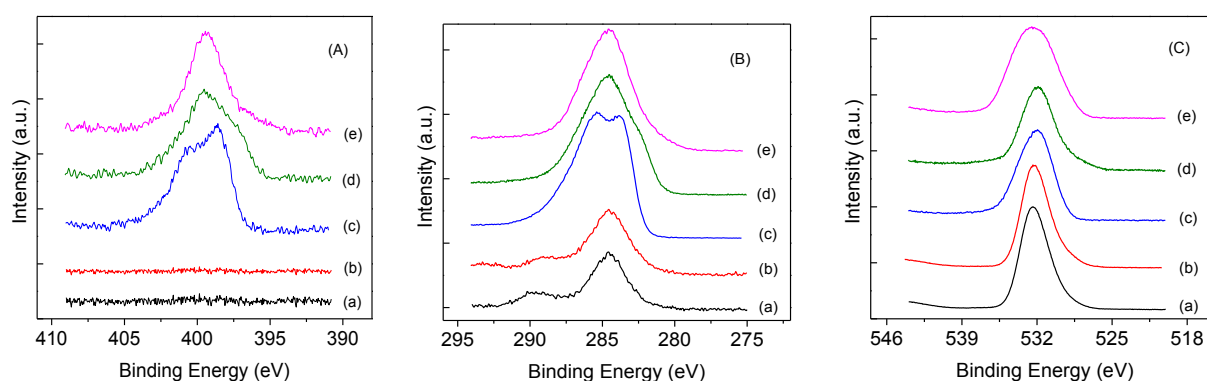
**Tabelul 2-2:** Compoziția chimică a suprafeței înainte și după imersie a SG45 în soluție de tetraciclină (TCL) și după 96 ore de imersie în SBF

Sample	Elemental composition (at %)						
	C	N	O	Si	Ca	P	Na
<b>SG45</b>	5.6	-	53	32.6	5	2.3	1.4
<b>SG45/SBF</b>	8.8	0.5	52.2	30.8	4.7	2.1	0.8
<b>TCL</b>	72.9	5.4	21.6	-	-	-	-
<b>SG45/TCL</b>	65.7	5.3	23.6	-	3.2	1	1.2
<b>SG45 after TCL release</b>	54.4	4.2	30.1	8.3	2.1	0.9	-

În timp ce carbonul este prezent la suprafața probei neîncărcate ca contaminare, analiza elementală indică de asemenea o creștere remarcabilă a conținutului de carbon după incubare, conținut aproape de valoarea obținută pentru tetraciclină însăși care dovedește adsorbția tetraciclinei.

Spectrele XPS de înaltă rezoluție N 1s, C 1s și O 1s (Figura 2-10) consolidează aceste rezultate. Se poate observa o intensitate ridicată a spectrelor de azot și carbon (Figura 2-10-A (d),B(d)) înregistrată pe sticla încărcată cu tetraciclină, comparabile cu cele corespunzătoare tetraciclinei (Figura 2-10-A (c),B(c)). După imersia în soluție cu tetraciclină, vârful O 1s scade în intensitate și se deplasează către energii de legătura mai mică iar intensitatea este comparabilă cu valoarea înregistrată pe tetraciclină pură, care este mai puțin bogată în atomi de oxigen.

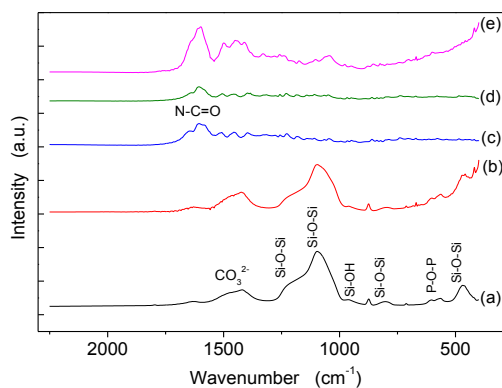
După procesul de eliberare valorile de C și N scad ușor, în timp ce O crește împreună cu siliciul, care este observat la suprafața probei din nou. Acest lucru înseamnă că tetraciclină a fost eliberată în cantitate mare, dar o cantitate importantă este încă detectată la suprafața sticlei, care poate fi considerată legată ireversibil.



**Figura 2-10:** Spectrele XPS de înaltă rezoluție N 1s (A), C 1s (B), O 1s (C) ale SG45 (a), SG45 cufundat în SBF (b), tetraciclină (c), SG45 cu tetraciclină (d), și ale SG45 după 96 ore imersie în SBF pentru eliberarea de tetraciclină (e)

### 2.3.2.3 Spectroscopie în infraroșu cu transformată Furie (FTIR)

Figura 2-11 prezintă spectrele FTIR înregistrate pe sticlă și tetraciclină, precum și cele de sticlă imersat în SBF, sticlă încărcată cu tetraciclină înainte și după 7 zile de imersie în SBF pentru eliberarea tetraciclinei. În timp ce majoritatea benzilor pe spectrele SG45 corespund vibrațiilor materialelor cu conținut înalt de SiO<sub>2</sub> (1418 -1470 cm<sup>-1</sup> carbonat ;1200, 1090, 800, 466 cm<sup>-1</sup> vibrații Si-O-Si [26]; 960 cm<sup>-1</sup> vibrații Si-OH [27]; 606 și 564 cm<sup>-1</sup> vibrații PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> [28]), spectrele FTIR de tetraciclină și sticlă încărcată cu tetraciclină sunt foarte asemănătoare. Ele arată aceeași bandă de amida I în jurul 1600 cm<sup>-1</sup> [29] datorată adsorbției în cantitate mare a tetraciclinei.

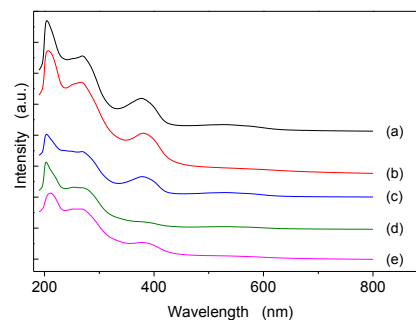


**Figura 2-11:** Spectre de FT-IR pentru SG45 (a), SG45 imersat în SBF (b), tetraciclină (c), SG45 cu tetraciclină (d) și de SG45 după 96 ore imersiune în SBF pentru eliberare de tetraciclină (e).

## 2.3.3 Studiul de eliberare a antibioticului

### 2.3.3.1 Evaluarea concentrației (UV-Vis)

Spectroscopia de absorbție în ultraviolet-vizibil a fost folosită pentru a estima cantitatea de tetraciclină eliberată ca urmare a evoluției vârfurilor de absorbție a tetraciclinei. Eliberarea medicamentului se constată a fi rapidă în primele 2 h, devine mai lentă pentru următoarele 5 și 24 h și, în final eliberarea devine constantă pentru perioade mai lungi de timp (Figura 2-12)



**Figura 2-12:** Spectrele UV-Vis înregistrate după 2 (a), 5 (b), 24 (c), 48 (d) și 96 (e) ore de eliberare de tetraciclină din proba de sticlă

## 3 Studiul sticlelor SiCaP încărcate cu diferite antibiotice

Această parte a lucrării prezintă studiul unei matrice de sticlă bioactivă cu compoziție 60% 60%SiO<sub>2</sub> 30%CaO 10%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (molar %) încărcată cu diferite tipuri de antibiotice. Antibioticele luate în considerare pentru acest studiu au fost ampicilina, ciprofloxacina, streptomicina și tetraciclină. Aceste antibiotice au fost selectate, în scopul de a evalua afinitatea diferită față de matricea de sticlă bioactivă, împreună cu profilul lor de eliberare. Aceste materiale sunt studiate ca potențiali candidați pentru eliberare a medicamentelor locale, cu posibile aplicații în implanturi de reparații osoase.

### 3.1 Prepararea sticlei bioactive

Precursorii folosiți pentru prepararea de sticlă bioactivă sunt TEOS,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  și trietil fosfat (TEP) pentru a obține un gel de compoziție 60% $\text{SiO}_2$  30% $\text{CaO}$  10% $\text{P}_2\text{O}_5$  (molar %). Ulterior gelul se usucă în două moduri diferite pentru a obține probe xerogel și aerogel.

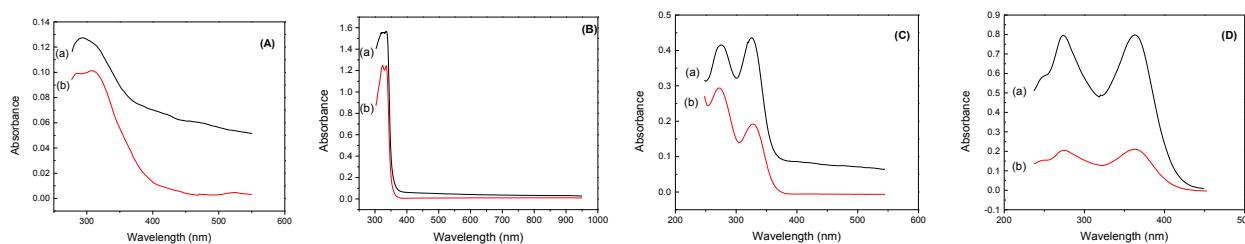
### 3.2 Xerogel de sticlă bioactivă

O parte din gelul obținut se usucă la 110 ° C timp de câteva ore, urmată de tratament termic la 550 °C timp de 2 ore. Tratamentul termic a fost efectuat (conform măsurătorilor DTA) pentru a îndepărta orice componentă organică nereacționată și a stabili rețeaua de sticlă. Sticla rezultată a fost măcinată într-o pulbere și apoi cernută pentru a obține o dimensiune maximă de particule de 40  $\mu\text{m}$ . Această probă va fi în continuare numită BG60.

#### 3.2.1 Încărcare cu antibiotice

După de 24 ore de pretratare în SBF sticla bioactivă a fost imersată în soluție PBS care conține 10 mg/ml antibiotic și se păstrează patru ore. După 4 h, soluția PBS se îndepărtează și se păstrează pentru o analiză ulterioară, iar sticla bioactivă se spală de trei ori cu PBS proaspăt pentru a îndepărta orice antibiotic nelegat. Probele încărcate cu antibiotice vor fi în continuare numite cu ajutorul antibioticelor încărcate ca: BG60 AMP, BG60 CIP, BG60 STR, și BG60 TCL

Pentru a evidenția încărcarea antibioticelor în probele de bioceramică poroasă, spectrele de UV-Vis ale soluțiilor inițiale de PBS cu antibiotice au fost comparate cu spectrele UV-Vis ale soluțiilor colectate după 4 ore de imersie.



**Figura 3-1:** Spectrele UV-Vis de PBS îmbogățit cu antibiotic în concentrație inițială (a) și de PBS îmbogățit cu antibiotic după procedura de încărcare (b) pentru ampicilina (A), ciprofloxacin (B), streptomycină (C) și tetraciclină (D).

Diferența de intensități pe toate cele patru eșantioane (Figura 3-1) arată că o parte din antibiotice lipsește din soluția inițială de PBS, indicând o atașare cu succes pe suprafața de sticlă - ceramică bioactivă, cu un efect mai pronunțat pentru probele care conțin tetraciclină și mai puțin pentru eșantionul încărcat cu ampicilină. Cât timp tetraciclină are o afinitate mare și capacitatea de a forma legături chimice cu ioni  $\text{Ca}^{2+}$  din matricea bioactivă [30], ampicilina are o afinitate redusă spre suprafețele de sticlă bioactivă datorate efectelor de încărcare. Cu ampicilina și biosticla încărcate negativ ele se resping reciproc, așa cum a fost raportat de El-Fiqi et al. [31]. Afinitatea streptomycină

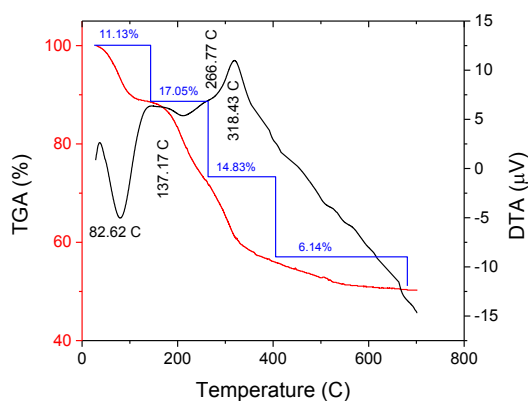


față de aceste matrici bioactive de sticlă - ceramică sa dovedit a fi între celelalte două. Ciprofloxacina are, de asemenea, capacitatea de a forma complexul Ca [32]. Deși afinitatea sa față de matricea de sticlă bioactivă nu este la fel de mare ca a tetraciclinei, aceasta este un antibiotic mult mai puternic, care necesită concentrații mai mici pentru a atinge inhibare bacteriană sau efectul bactericid [33].

### 3.2.2 Caracterizarea probei

#### 3.2.2.1 Analiza termică

Pentru a stabili tratamentul termic pentru probele BG60 analiza termică a fost evaluată (Figure 3-2). Vârful endotermic în jurul 82°C împreună cu pierderea în greutate pot fi asociate cu evaporarea solvenților din material. Vârful exotermic mic cu o pierdere în greutate poate fi asociat cu descompunerea reziduurilor organice, în timp ce vârful exotermic mare,



**Figure 3-2:** DTA/TG analysis of BG60 sample

cu pierderea în greutate poate fi atribuită cu descompunerea de nitrați și dehidroxilarea materialului. Nici o schimbare semnificativă nu se observă după 550°C în curbe sau TG, DTA, astfel încât pentru temperatura de tratament a probelor a fost aleasă această valoare.

#### 3.2.2.2 Analiza suprafeței specifice (BET)

Studiul de adsorbție/desorbție de azot (BET) înainte și după încărcare cu antibiotice (Tabelul 3-1) arată că suprafața mostrelor încărcate crește pentru toate cele patru compozite. Acest fenomen este de așteptat și a fost observată, de asemenea, în studiile de adsorbție de proteine descrise în capitolele anterioare. Suprafața crescută poate fi atribuită rugozității suprafeței suplimentare oferite de antibioticul atașat, ceea ce reprezintă o dovadă de modificare a suprafeței de sticlă bioactivă, în urma procesului de adsorbție a antibioticului.

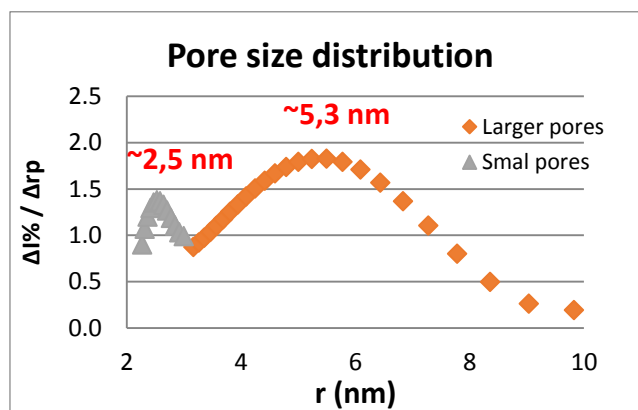
**Tabelul 3-1:** Suprafață specifică și volumul porilor mediu BG60 înainte și după încărcare cu antibiotice

	BG60	BG60 AMP	BG60 CIP	BG60 STR	BG60 TCL
<b>Suprafață specifică (m<sup>2</sup>/g)</b>	52.63	67.65	67.52	69.85	67.98
<b>Volum mediu de pori (ml/g)</b>	0.11	0.35	0.33	0.29	0.33



### 3.2.2.3 Distribuția pe dimensiunea porilor cu criporometrie RMN

Pentru evaluarea porozității prin criporometrie RMN proba de sticlă bioactivă a fost imersată în apă de puritate mare pentru mai mult de 24 ore, pentru a permite apei să se infiltreze în porii materialului. Pentru că tehnica se bazează pe diferența de temperaturi de tranziție de fază, măsurătorile sunt efectuate cu o secvență de spin-ecou calibrată astfel încât numai



lichidul va da semnal. Aceasta permite determinarea precisă a cantității de lichid (Figura

Figura 3-3: Distribuția porilor calculată prin criporometrie RMN

3-4), care, împreună cu valorile temperaturii de măsurare permit determinarea tranzițiilor de fază, din care se calculează distribuția mărimii porilor. S-a constatat că razele porilor au două distribuții distincte, și anume o distribuție dominantă cu raza medie situată în jurul valorii de 5.3 nm și o distribuție slab pronunțată cu raza medie a porilor de aproximativ 2 nm (Figura 3-3).

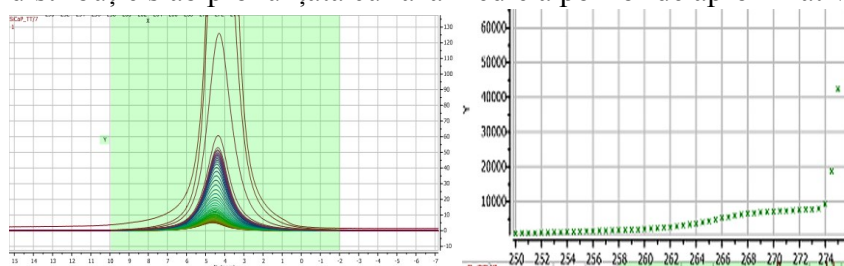


Figura 3-4: Spectrele RMN înregistrate pentru măsurătorile criporometrie (stânga), și intensitatea a vârfurilor în raport cu temperaturile la care au fost efectuate măsurătorile (dreapta)

### 3.2.2.4 Măsurarea potențialului Zeta

Potențialul Zeta arată diferența de sarcină dintre stratul de lichid staționar atașat de particule și restul lichidului. Din punct de vedere a biocompatibilității la nivelul osului și atașarea țesutului pe material, potențialul Zeta negativ poate fi benefică [24]. Tabelul 3-2. prezintă potențialul Zeta de sticlă bioactivă înainte și după încărcare cu antibiotic. Cum era de așteptat suprafața BG60 este încărcată negativ. Antibioticele sporesc sarcina negativă a suprafeței, în special ampicilina, care are de asemenea o sarcină negativă. Singura excepție este streptomicina încărcată pozitiv, care neutralizează suprafața probei [34]. Ca o consecință a acestei măsurători putem presupune că legarea la suprafața a streptomicinei este ajutată de interacțiuni electrostatice. Dimensiunea particulelor de probă în formă de pulbere a fost în intervalul microni.

**Tabelul 3-2:** Potențialului Zeta BG60 înainte și după încărcare antibiotice

	Potențialul Zeta (mV)	Diametru mediu (nm)
<b>BG60</b>	-21.53	973
<b>BG60 AMP</b>	-28	958
<b>BG60 CIP</b>	-27	964
<b>BG60 STR</b>	-0.175	868
<b>BG60 TCL</b>	-24.6	760

### 3.2.3 Evaluarea bioactivității

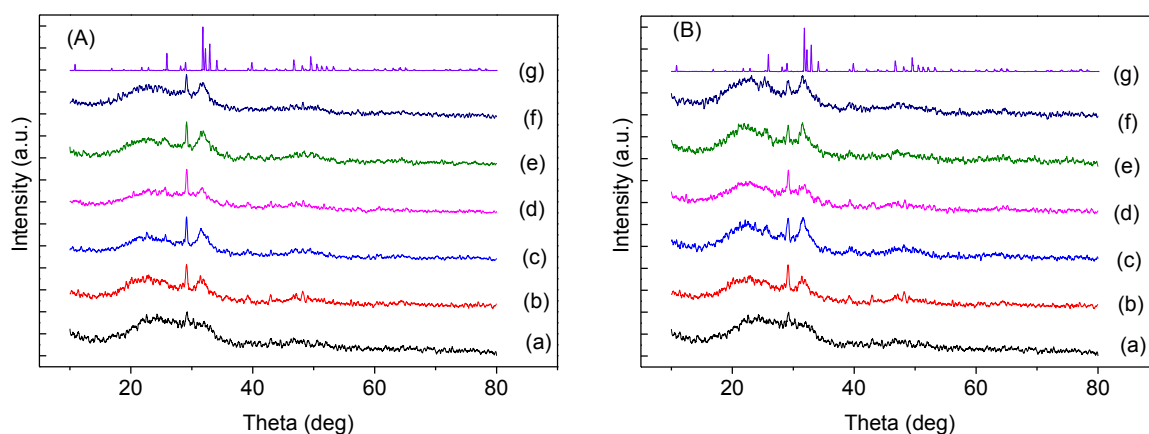
Pentru a investiga bioactivitatea BG60, atât goale cât și pe sticla încărcată cu antibiotice ele au fost imersate în SBF timp de 14 zile la temperatura de 37 °C, schimbând SBF la intervale regulate. După această perioadă de timp, probele au fost îndepărtate din SBF, spălate ușor cu apă ultra-pură, uscate la 37 °C și evaluate pentru formațiuni de fază apatitic. Influența antibioticelor asupra bioactivității sticlei a fost de asemenea evaluată.

#### 3.2.3.1 Studiu bioactivității pulberii cu difracție de raze X (XRD)

Difracția de raze X a pulberii a fost utilizată pentru a evalua structura matricei BG60 și arată faptul că încărcarea cu antibiotic nu scade bioactivitatea probelor. Difractograma cu raze X (Figura 3-5 (a)) a probei de sticlă ceramică bioactivă goală, obținută după tratamentul termic la 550 °C timp de 2 h arată picuri specifici pentru wolastonită ( $\text{CaSiO}_3$ ) și faze apatitice ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) 29.1° și respectiv 32° [35, 36].

Dimensiunea cristalitelor dezvoltate a fost estimată din lățimea la semiînălțime a vârfurilor de difracție folosind ecuația Sherrer, dimensiunea medie a fost între 30 și 50 nm. Prezența fazei cristaline atât de hidroxiapatită cât și de wolastonită este dorită pentru materiale bioactive luate în considerare ca și suport pentru ingineria țesutului osos [35-38].

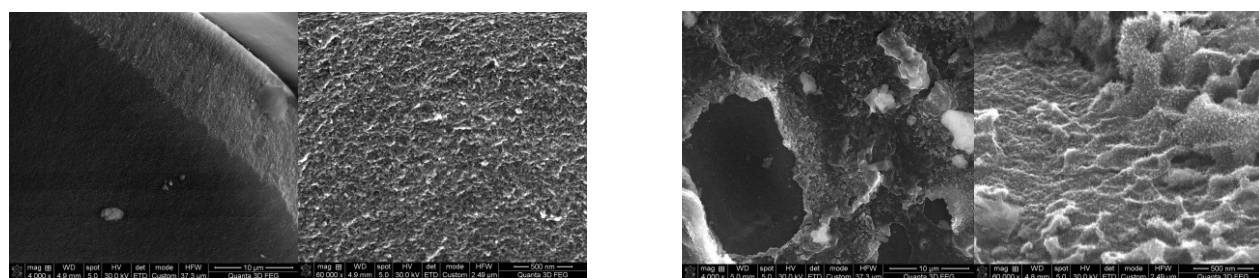
Pentru a dovedi formarea fazelor de tip apatită pe probe măsurătorile XRD înregistrate înainte și după imersia în SBF sunt comparate în Figura 3-5. O creștere a intensității vârfurilor corespunzătoare fazelor de tip apatită în jurul valorii de 28°, 32° și 45° indică o bioactivitate bună și capacitatea sticlei bioactive de a forma faze de tip apatitic, chiar și după încărcarea cu antibiotice.



**Figura 3-5:** Difractograme BG60 (a), BG60 după 14 zile de imersiune SBF (b), BG60 AMP (c), BG60 CIP (d), BG60 STR (e), BG60 SBF (f), hidroxiapatita referință (g) înainte de A, și după imersie în SBF (B)

### 3.2.3.2 Evaluarea bioactivității prin SEM

Prin intermediul SEM putem evalua topografia suprafeței probelor. Acestea sunt în majoritate compacte, omogene, cu microstructura poroasă. Dimensiunea porilor pare să fie în intervalul de zeci de nanometri, împreună cu nano rugozitatea suprafeței materialului. Imaginile SEM arată o schimbare în morfologia probelor după tratament SBF. Figura 3-6 arată imagini SEM de BG60 înainte și după SBF timp de 14 zile. Cristale cu caracteristici de apatită globulară sunt clar vizibile după tratamentul SBF. Aceste modificări pot fi atribuite fazelor apatitice care se formează pe suprafața probei BG60. Schimbările nanostructurate sunt bine dovedite de numeroasele mici cristale observate în imaginea cu cea mai mare mărire.

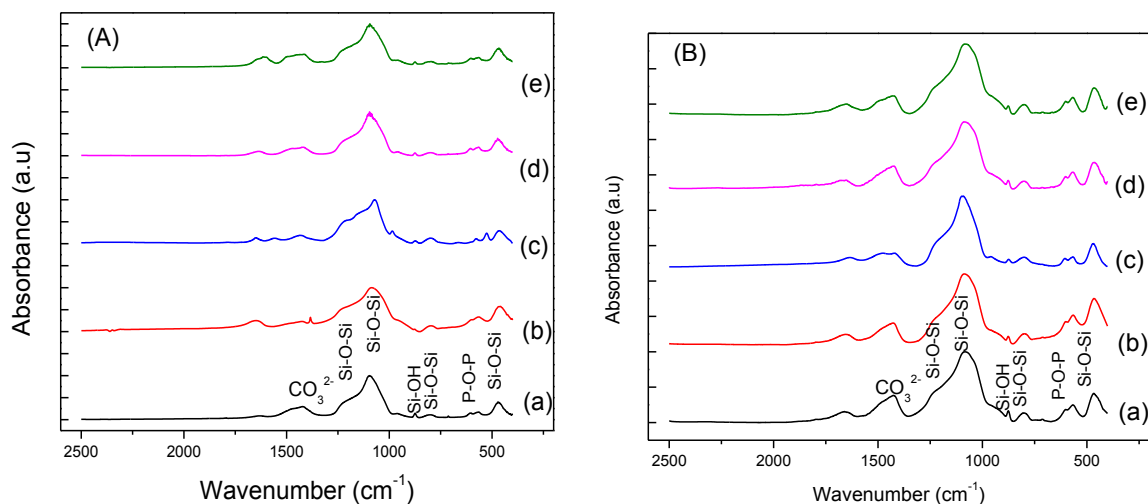


**Figura 3-6:** Imaginile SEM BG60 proba înainte (stânga) și după (dreapta) imersiune SBF înregistrate la mărimi diferite.

### 3.2.3.3 Spectroscopie în infraroșu cu transformată Furie (FTIR)

Figura 3-7 prezintă spectrele FTIR înregistrate pentru matrice goale de sticlă bioactivă și pentru matricea încărcată cu antibiotice înainte și după imersia în SBF timp de 14 zile. Se observă un dublet în jurul  $589-600\text{ cm}^{-1}$ , crescând în intensitate, ca urmare a imersiei în SBF, atribuite vibrațiilor  $[\text{PO}_4]$  corespunzătoare hidroxiapatitei cristaline [39]. Dubletul este evident, de asemenea, pentru proba goală care întărește declarația anterioară potrivit căreia sticla bioactivă conține chiar înainte de

imersie în SBF fază apatică. Rezultatele FTIR împreună cu datele XRD dovedesc că încărcarea matricei bioactive de sticla cu antibiotice nu va împiedica bioactivitatea probelor.

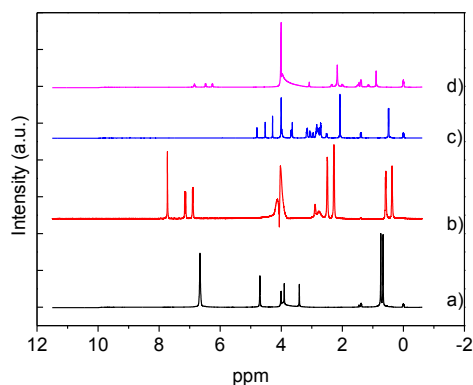


**Figura 3-7:** Spectrele FTIR BG60 (a) BG60 AMP (b), BG60 CIP (c), BG60 STR (d) și BG60 TCL (e), înainte (A) și după (B) imersiune SBF pentru 14 zile.

### 3.2.4 Studiul de eliberare a antibioticelor

#### 3.2.4.1 Evaluarea de concentrație (RMN)

Pentru evaluarea profilului de eliberare a fost considerată o soluție ce conține 0.1 mMol DSS. 100 mg de sticlă bioactivă încărcată cu fiecare antibiotic în parte au fost imersate în 700  $\mu$ l de soluție de D<sub>2</sub>O marcată. Soluția D<sub>2</sub>O a fost complet înlăturată după 1, 2, 3, 5 și 24 de ore respectiv, și înlocuită cu una proaspăt preparată. Soluțiile eliminate au fost păstrate pentru analiză și plasate în tuburi RMN. Ca referință, spectrele RMN de 2 mg/ml din fiecare antibiotic dizolvat în soluții D<sub>2</sub>O au fost înregistrate de asemenea (Figura 3-8).



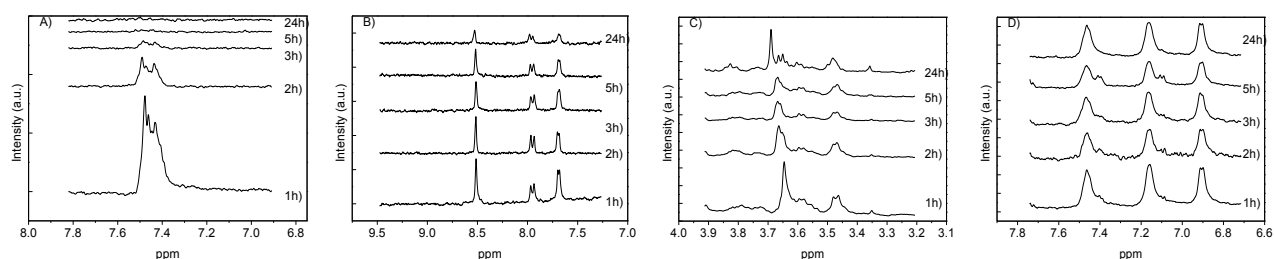
**Figura 3-8:** Spectre RMN de referință a antibioticelor cu o concentrație de 2mg/ml, ampicilina (a), ciprofloxacin (b), streptomycin (c) și tetracyclină (d).

După corecția de fază și deducerea fundalului, integrala vârfului de antibiotic predominant a fost calculată în raport cu integrala de DSS situat la 0 ppm. Datorită faptului că valorile maximelor principale integrate care corespund fiecărui antibiotic (Tabelul 3-3) sunt valori relative calibrate la DSS, ele devin comparabile și pot servi ca o estimare cantitativă. Această calibrare este necesară, deoarece în caz contrar, valorile pot varia în funcție de shim, sau alți factori care pot influența intensitatea întregului spectru.

**Tabelul 3-3:** Concentrația de antibiotice în D2O determinate din spectrele RMN

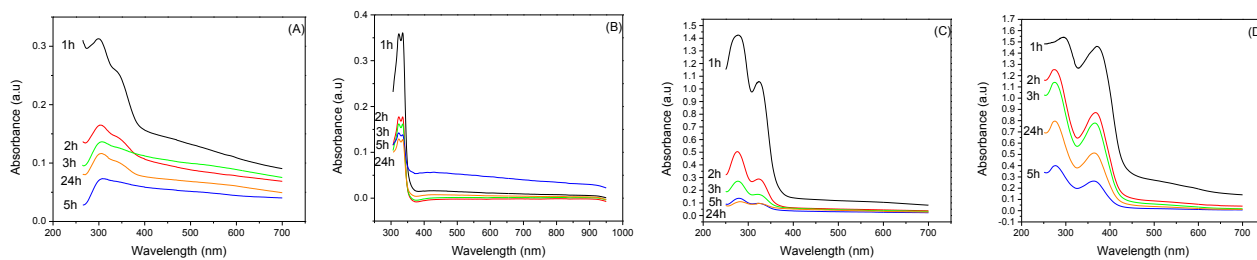
Timp de eliberare	Concentrații antibiotice ( mg/ml)			
	BG60 AMP	BG60 CIP	BG60 STR	BG60 TCL
1h	0.036	0.057	0.024	0.667
2h	0.012	0.053	0.016	0.447
3h	0.004	0.047	0.011	0.397
5h	0.001	0.034	0.006	0.294
24h	0.001	0.019	0.012	0.420

Vârfulurile folosite pentru integrare și pentru calculele de concentrație sunt prezentate în Figura 3-9, și sunt normalizate la vârful de DSS pentru a servi la o estimare vizuală a cantității de antibiotic eliberată. Concentrația de antibiotic calculată folosind aceste date arată comportamentul de eliberare al probelor BG60. Diferența în intensitățile vârfulurilor este proporțională cu concentrațiile eliberate.

**Figura 3-9:** Vârfuluri de antibiotic RMN eliberate în D<sub>2</sub>O pentru BG60 AMP (A), BG60 CIP (B), BG60 STR (C), și BG60 TCL (D); spectrele s-au normalizat la vârfulurile de DSS.

#### 3.2.4.2 Evaluarea concentrației (UV-Vis)

Profilul de eliberare al antibioticelor în soluție de tampon fosfat (PBS) a fost de asemenea evaluat prin spectroscopie UV-Vis folosind aceleași condiții ca și pentru RMN. Aceste date pot fi așadar corelate cu studiul de eliberare RMN, singura diferență este pH-ul mediului de eliberare de (7,4 în acest caz), care poate induce unele modificări în comportamentul de eliberare ale antibioticelor. După cum se poate observa din Figura 3-10, principalele aspecte ale eliberării RMN se găsesc și aici. Pentru ampicilină o eliberare inițială mare este urmată de concentrații mici, care sunt mult mai aproape una de cealaltă. Acest comportament este puternic corelat cu capacitatea de legare slabă a ampicilinei pentru această matrice de sticlă bioactivă. Același lucru poate fi spus și pentru streptomycină: cu o afinitate ușor mai mică decât cea a tetraciclinei față de sticlă bioactivă și curba de eliberare aproape exponențială.



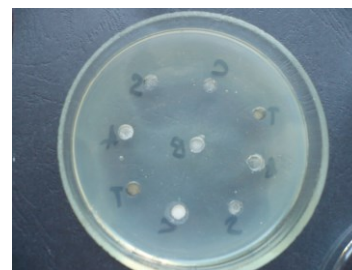
**Figura 3-10:** Spectrele UV-Vis de eliberare pentru antibiotice: ampicilina (A), ciprofloxacin (B), streptomicină c și tetraciclină (D)

### 3.2.5 Inhibarea antimicrobiană

Pentru a testa eficacitatea antibioticelor, au fost efectuate testele antimicrobiene pe probele încărcate, pe bacterii gram negative și gram pozitive, pentru inhibarea lor.

#### 3.2.5.1 Bacteriile Gram negative

Pentru a evalua efectul asupra bacteriilor gram negative tulpina *E. coli* Nr. 25922, cu o concentrație de  $3 \cdot 10^8$  CFU/ml a fost considerată. Probele încărcate cu antibiotice au fost diluate în apă distilată ultra pură și plasate în găuri de 5 mm în agar, apoi bacteriile au fost răspândite pe toată suprafața cutiei Petri, apoi incubate 24 ore la 36.8 °C pentru a forma coloniile bacteriene (Figura 3-11). Zonele de inhibiție în jurul probelor au fost evaluate și sunt prezentate în Tabelul 3-4.



**Figura 3-11:** Studiul de inhibare antimicrobiană pe E-coli

**Tabelul 3-4:** Zone de inhibare în jurul matricei încărcate cu antibiotice, testat pe E-coli (mm<sup>2</sup>)

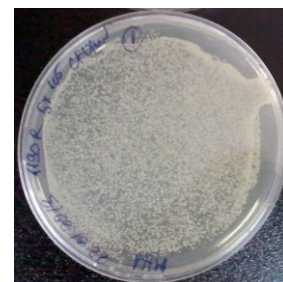
Farfurie	BG60 (mm <sup>2</sup> )	BG60 AMP (mm <sup>2</sup> )	BG60 CIP (mm <sup>2</sup> )	BG 60 STR (mm <sup>2</sup> )	BG 60 TCL (mm <sup>2</sup> )
1	0	0	33	21	16
2	0	0	32	16	21
3	0	0	35	24	26
4	0	0	30	22	20
5	0	0	32	18	20
<b>Medie</b>	0	0	32.4	20.2	20.6

Testele antimicrobiene pe E-coli prezintă un puternic efect de inhibare antimicrobiană pentru probe încărcate cu tetraciclină și streptomicină, care indică faptul că antibioticele eliberate păstrează eficacitatea lor, după ce au fost eliberate din BG60, iar ciprofloxacina le întrece pe toate. Aceasta este o consecință a eficacității ciprofloxacinei împotriva bacteriilor gram negative, și a profilului de eliberare care permite antibioticului să fie prezent pentru o durată lungă de timp. Nu a fost evidențiată nici un efect de inhibare pentru matricea de sticlă bioactivă goală sau încărcată cu ampicilină. Lipsa

de efect inhibitor în cazul probei încărcată cu ampicilina poate fi asociată cu cantitatea mică de ampicilină prezentă pe suprafața matricei de sticlă bioactivă și eliberarea foarte rapidă corespunzătoare acestui antibiotic.

### 3.2.5.2 Bacterii Gram pozitive

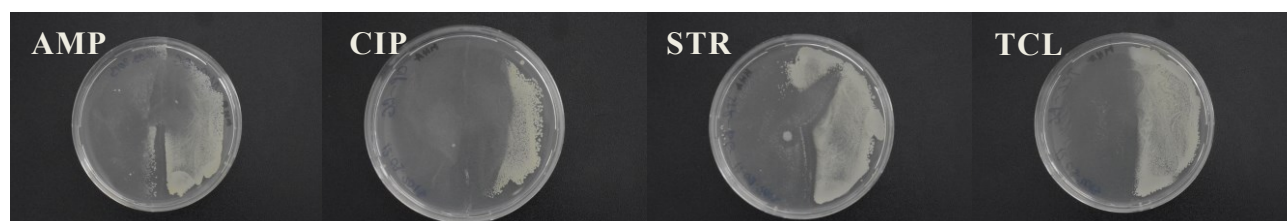
Pentru bacteriile gram pozitive a fost utilizată tulpina UCLA 8076 de *Staphylococcus aureus* rezistentă la meticilină. Probele BG încărcate cu antibiotic au fost mai întâi diluate în apă ultra pură având o concentrație de 70 mg / ml, apoi 100  $\mu$ l din această soluție diluată a fost aplicat la jumătate de farfurie Petri de 90 mm încărcată cu agar Mueller-Hinton. Apoi 100  $\mu$ l conținând soluția bacteriană de  $10^7$  UFC a fost răspândită pe întreaga farfurie, și lăsată 24 de ore la 36,8 °C pentru a forma colonii bacteriene.



**Figura 3-12:** Teste de inhibare antimicrobiană pe BG 60 pură efectuate pe *S. aureus*.

După 24 h farfuriile Petri au fost evaluate pentru activitate antimicrobiană. Pentru control BG 60 a fost, de asemenea, răspândit pe o placă Petri, în aceleași condiții ca cele descrise mai sus, și nu prezintă nici o inhibare (Figura 3-12).

Culturile antimicrobiene au fost poziționate astfel încât BG60 încărcate cu antibiotic să acopere partea stângă a vasului (Figura 3-13). Granița fiind trasă cu o pipetă sterilă în agar pentru a avea o referință pentru determinarea suprafeței tratate cu antibiotice și estimarea mai ușoară a zonei de inhibare.



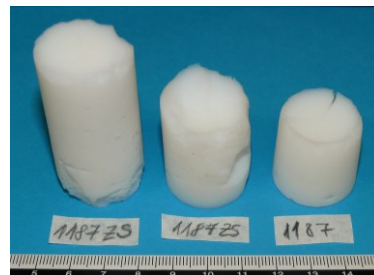
**Figura 3-13:** Teste antimicrobiene efectuate pe *S. aureus*

După cum se poate observa din testele antimicrobiene, antibioticele au puteri diferite de inhibare. În cazul în care ampicilina nu a avut nici un efect asupra *E-coli*, observăm unele zone de inhibiție create de ea pe culturile *S. aureus*. Totuși, acest efect este slab în comparație cu alte antibiotice. Pe când se observă unele colonii formate pe partea acoperită cu BG60 AMP, BG60 CIP are o zonă de inhibare mare ajungând și pe partea suprafeței netratate. Aceste efecte pot fi de asemenea observate pe BG60 STR precum și BG60 TCL, deși nu în aceeași magnitudine. Aceste antibiotice utilizate în mod obișnuit ar trebui să aibă un efect redus asupra tulpinelor bacteriene rezistente, totuși eliberarea prelungită și doza mare administrată local le face eficiente împotriva acestor tipuri de bacterii.



### 3.3 Aerogeluri

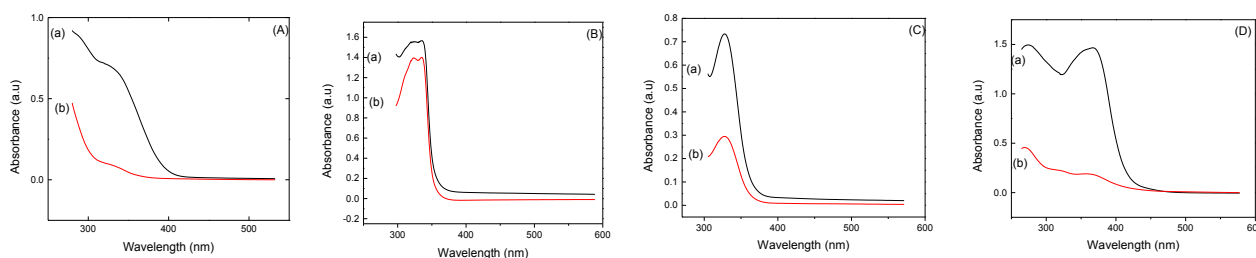
Pentru a obține structuri de aerogel monolitice (Figura 3-14), gelul preparat așa cum este descris la începutul capitolului este supus unui schimb de solvenți de la apă la etanol și apoi la acetona, și se usucă supercritic folosind CO<sub>2</sub>. Monoliți obținuți au fost apoi densificați printr-un tratament termic treptat până la 1050 °C



**Figura 3-14:** Monoliți obținuți prin uscare supercritică

#### 3.3.1 Încărcarea cu antibiotice

Procedura de încărcare cu antibiotice a fost similară cu cea utilizată pe xerogel. Probele au fost numite după antibiotice cu care au fost încărcate: AMP Aero pentru ampicilina, Aero CIP pentru ciprofloxacina, STR. Aero de streptomycină și Aero TCL pentru tetraciclina. Pentru a evalua atașarea de antibiotice pe aerogel PBSul a fost colectat după procesul de încărcare și au fost comparate cu soluțiile originale, folosind spectroscopie UV-Vis. Diferența de intensitate între soluție PBS conținând 10 mg / ml, și cea colectată arată că o parte din antibiotic a fost încărcată în aerogeluri (Figura 3-15). Cea mai puternică diferență din punct de vedere al intensității poate fi observată pe probele care conțin tetraciclina.



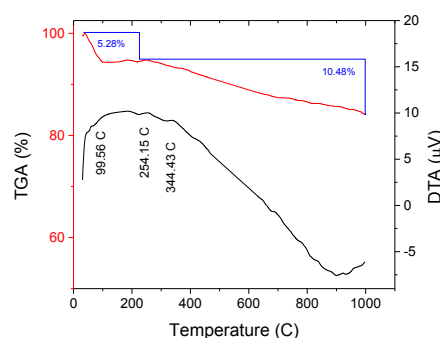
**Figura 3-15:** Spectrele UV-Vis: concentrația inițială de antibiotice (a) și antibiotic extras (b) pentru ampicilina (A), ciprofloxacina (B), streptomycină (C), tetraciclina (D).

#### 3.3.2 Caracterizare probe

##### 3.3.2.1 Analiză termică

Termografele DTA din eșantion nu prezintă evenimente majore (Figura 3-16). Eliberarea de apă absorbită la suprafața aerogelului și eliberarea de alcool rezidual apar între 20 și 250

°C. Micile vârfuri exoterme la aproximativ 250 °C cu o pierdere în masă, pot fi atribuite oxidării unor grupări alcoxi, în timp ce, cea din jurul valorii de 340 °C, eliminării unei cantități mici de contaminare (nitrați). Proba tinde să fie destul de stabilă, cu o pierdere totală în greutate de aproximativ 15,76%. Această stabilitate este consecința procesului supercritic de uscare, care elimină cea mai mare parte a



**Figura 3-16:** Analiza DTA/TG probei Aero 60



precursorilor nereacționați și a solvenților din întregul volum al sticlei, și este în concordanță cu studiile termo gravimetrice pe probe aerogel [40].

### 3.3.2.2 Analiza suprafeței specifice (BET)

Analiza suprafeței specifice și volumul mediu al porilor de aerogel goi și încărcăți cu antibiotice sunt prezentate în Tabelul 3-5. O suprafață specifică relativ mare (205,5 m<sup>2</sup> / g) și volumul porilor (0,64 ml / g) s-au înregistrat pentru aerogelul gol în ciuda unei temperaturi ridicate de tratament. Se poate observa că suprafața pentru probele încărcate cu antibiotice scade semnificativ, spre deosebire de proba de xerogel. Acest comportament poate fi asociat cu procedura de pre-tratare în SBF care duce la formarea unui strat de apatită pe suprafața probelor cu o porozitate mai scăzută. După cum se poate observa în imaginile SEM odată cu imersia SBF pentru acest eșantion (Figura 3-18), formarea stratului de apatită scade rugozitatea suprafeței și ulterior suprafața specifică. În plus, dimensiunea porilor permite o penetrare a antibioticelor în interiorul materialului închizând căile interconectate, ceea ce duce la o scădere suplimentară a suprafeței specifice și a volumului porilor.

**Tabelul 3-5:** Suprafața specifică BET Aero60 înainte și după încărcare de antibiotice

	<b>Aero60</b>	<b>Aero60 AMP</b>	<b>Aero60 CIP</b>	<b>Aero60 STR</b>	<b>Aero60 TCL</b>
Suprafața specifică (m <sup>2</sup> /g)	205.56	133.79	144.56	141.69	146.73
Volum mediu de pori (ml/g)	0.64	0.52	0.54	0.51	0.56

### 3.3.3 Evaluarea bioactivității

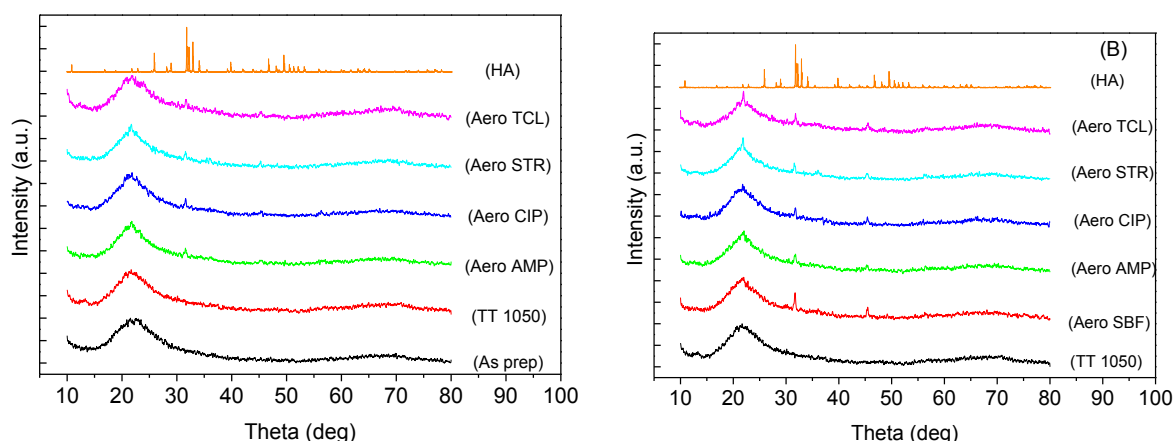
Pentru a evalua bioactivitatea probelor și efectul de antibiotice asupra bioactivității aerogelului, toate eșantioanele au fost introduse în SBF timp de 14 zile și păstrate la temperatura de 37 °C. Soluția SBF a fost schimbată de două ori pe săptămână, cu una proaspătă.

#### 3.3.3.1 Studiu bioactivitate cu difracție de raze X a pulberii (XRD)

Figura 3-17 introduce difractogramele aerogelurilor tratate termic, pentru aerogeluri înainte și după 14 zile de imersie în SBF, împreună cu difractogramele corespunzătoare încărcării cu antibiotice. Difractograma XRD specific hidroxiapatitei a fost, de asemenea, inclusă ca referință.

Primul lucru vizibil în probele încărcate cu antibiotice este un vârf mic în jurul valorii de 32°, care este tipic pentru fazele de tip apatitic, formate ca rezultat al imersiei în SBF pentru o singură zi, ca o pre-tratare. Pe matricea de aerogel goală, apatita apare ca vârf după imersie în SBF timp de 14 zile, deși bioactivitatea acestor probe ar trebui să fie redusă cumva datorită temperaturii ridicate de tratament, care este necesară pentru a stabiliza structura lor. Probele încărcate cu antibiotice

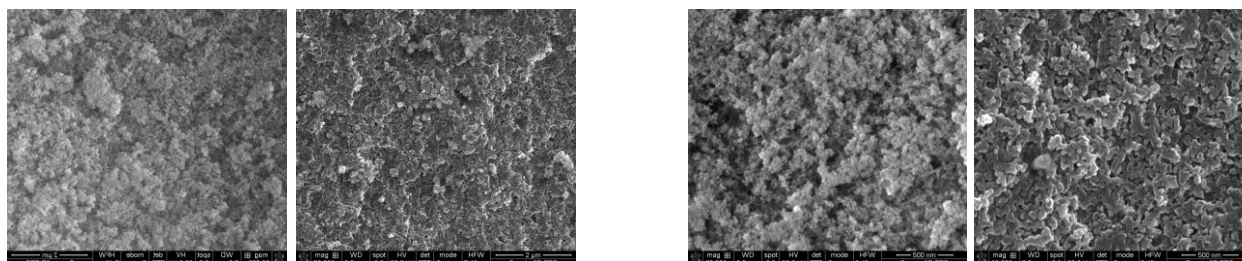
deasemenea arată această caracteristică crescută în comparație cu proba goale. Acest lucru tinde să arate că încărcarea cu antibiotice a aerogeluri nu împiedică bioactivitatea lor.



**Figura 3-17:** Difractograme de aerogeluri înainte de (A) și după imersie SBF (B)

### 3.3.3.2 Evaluare de bioactivitate prin SEM

Pentru a evalua în continuare bioactivitatea aerogelurilor, suprafața acestora a fost investigată prin microscopie SEM înainte și după imersia SBF. Probele de aerogel prezintă o morfologie poroasă interconectată, care se aseamănă puternic cu structura de gel în forma udă. Suprafața materialelor arată omogen și are caracter mezoporos. Putem vedea că suprafața este acoperită cu grad mare de porii probabil interconectați, ceea ce duce la suprafața mare de material.



**Figura 3-18:** Imagini SEM înainte (stânga) și după imersiune SBF (dreapta) la mărimi diferite.

Imaginile SEM (Figura 3-18) arată că după imersia în SBF un strat a fost depus pe suprafața aerogelurilor, care a devenit mai neted. Acest comportament pare să aibă un impact de asemenea, pe suprafața specifică ale aerogelurilor încărcate cu antibiotic. Mezoporozitatea rămâne, dar nanorugozitățile par să dispară de pe suprafața probei.

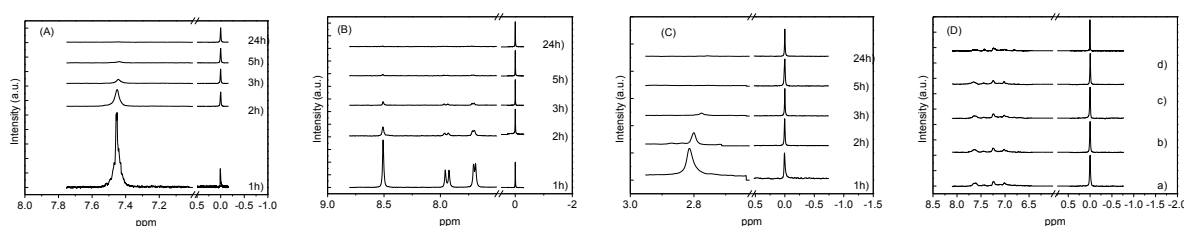
### 3.3.4 Studiul de eliberare a antibioticelor

Pentru a evalua cantitatea de antibiotic care poate fii eliberată din probele aerogel, 100 mg din probele încărcate cu fiecare antibiotic au fost plasate în 700  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O marcate cu 0.1 mMol/l DSS și menținute timp de 1,2,3,5 și 24 de ore. După fiecare perioadă de timp lichidul a fost îndepărtat și

înlocuit cu unul proaspăt. Lichidul îndepărtat a fost apoi analizat cu ajutorul RMN și spectroscopie UV-Vis.

### 3.3.4.1 Evaluarea concentrației (RMN)

Cu ajutorul spectroscopiei RMN putem aproxima cantitatea de antibiotice eliberate într-un anumit interval de timp. Pentru a face acest lucru, au fost înregistrate prima dată spectrele de referință de antibiotice (Figura 3-8). Din acestea, apoi a fost ales un vârf și au fost calculate integralele relative la markerul DSS. Pentru fiecare antibiotic diferit atunci primim o curbă de eliberare. Spectrele pentru fiecare antibiotice au fost toate tăiate, încât acestea să arate numai vârful selectat și au fost toate normalizate la vârful de referință DSS la 0 ppm (Figura 3-19).



**Figura 3-19:** Vârfuri antibiotice RMN pentru ampicilina (A), ciprofloxacin (B), streptomicină (C) și tetraciclină (D). Vârfurile au fost normate la vârful DSS la 0 ppm.

După acesta din integralele vârfurilor s-a calculat o concentrație aproximativă a antibioticelor eliberate. Deoarece același D<sub>2</sub>O marcat cu DSS a fost utilizat în totalitatea studiului de eliberare, concentrația DSS este aceeași în întregul experiment, fiind cunoscute concentrațiile antibioticelor de referință. Luând în vedere aceste condiții, concentrațiile antibioticelor au fost approximate ca diferență între integrala vârfului antibioticelor și vârful DSS, care a fost calibrat la 1 pentru toate spectrele (Tabelul 3-6).

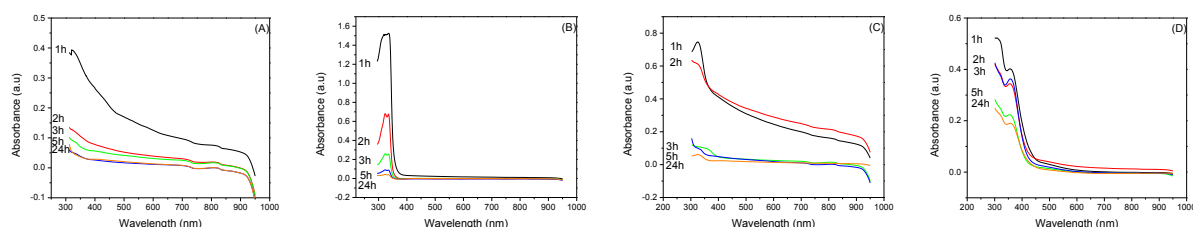
**Tabelul 3-6:** Concentrațiile calculate pentru eliberarea de antibiotice

Timp de eliberare	Concentrații de antibiotice reprezentate în mg/ml			
	Aero AMP	Aero CIP	Aero STR	Aero TCL
1h	0.523	0.150	1.127	1.559
2h	0.212	0.011	0.193	1.462
3h	0.072	0.010	0.171	1.452
5h	0.028	0.009	0.110	1.398
24h	0.017	0.006	0.011	1.280

După cum se poate observa, eliberarea antibioticelor este mai puternică în prima oră, urmată de o scădere constantă a concentrațiilor în timp. Acest lucru a fost de așteptat fiindcă concentrația antibioticului din interiorul aerogelurilor scade împreună cu doza eliberată de antibiotice.

### 3.3.4.2 Evaluarea concentrației (UV-Vis)

Pentru a se corela cu spectroscopia RMN, eliberarea este făcută pentru spectroscopia UV-Vis imitând aceleași condiții de pornire, dar folosind PBS ca solvent. Spectrele de absorbție UV-Vis arată o scădere în timp a concentrației de antibiotice, care pot fi corelate cu rezultatele RMN (Figura 3-20). Acest lucru confirmă profilul liniar de eliberare de tetraciclina, precum și scăderea bruscă în intensitatea de ciprofloxacina și ampicilina.



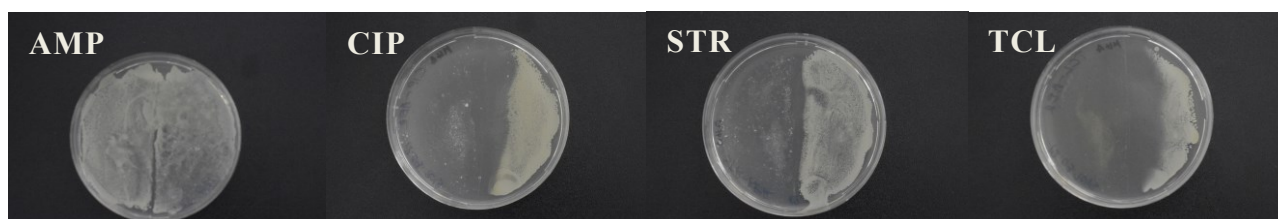
**Figura 3-20:** Spectra UV-Vis a antibioticului eliberat: ampicilina (A), ciprofloxacina (B), streptomicină (C) și tetraciclina (D)

### 3.3.5 Inhibarea antimicrobiană

Studiile de inhibiție asupra *S. aureus* rezistent la meticilină tulpina UCLA 8076 au fost efectuate în aceleași condiții ca și pentru BG 60. Proba de control pentru Aero 60 a fost, de asemenea, tratată în rutina descrisă mai sus, și nu prezintă nici un efect de inhibare antimicrobiană (Figura 3-21).

Se poate observa că aerogelurile încărcate cu ampicilină nu au nici un efect asupra inhibării acestei tulpini bacteriene (Figura 3-22). Acest lucru se poate datora faptului că ampicilina se leagă slab pe probele acestea, și are o eliberare foarte rapidă, reducând eficiența medicamentului. Pe de altă parte,

antibioticele care pot stabili o legătură puternică cu suprafața aerogelului ca și ciprofloxacina sau tetraciclina, și au o curbă de eliberare mai liniară, sunt mult mai eficiente și inhibă o mare parte a suprafeței netratate. Streptomicina este așa cum am văzut între efectul inferior al ampicilinei și performanțele puternice ale ciprofloxacinei și tetraciclinei. Aceasta inhibă formarea bacteriilor pe toată suprafața pe care a fost răspândită, dar este slabă în inhibarea dincolo de zona tratată.



**Figura 3-21:** Teste de inhibare antimicrobiene pe pur Aero 60 efectuate pe *S. aureus*



**Figura 3-22:** Studiu de inhibare antimicrobiană pe Aero AMP, Aero CIP, STR, Aero și Aero TCL.

## Concluzii generale

- Sinteza sol-gel a fost folosită pentru a crea materiale omogene silicaticice bioactive cu compoziție  $45\text{SiO}_2 \cdot 24.5\text{CaO} \cdot 24.5\text{Na}_2\text{O} \cdot 6\text{P}_2\text{O}_5$  (molar%).
  - Studiul de adsorbție pe proteine arată atașamentul hemoglobinei pentru diferite concentrații ionice și tratamente de suprafață care dovedesc receptivitatea materialului față de mediul biologic. Agenții de cuplare de proteine și concentrații mai mici de sare îmbunătățesc aderența a materialelor, după cum reiese din spectroscopia XPS. Suprafața materialelor de asemenea crește cu atașare de proteine.
  - Încorporarea de tetraciclină în microsferă bioactive din sticlă a fost realizat prin procesul de uscare prin pulverizare. Prin această metodă a rezultat obținerea microsferelor încărcate negativ cu un diametru mediu în jur de 10 micrometri, cu o suprafață specifică mică și suprafața netedă. Doza mare de antibiotic încorporată este dovedită de spectroscopia XPS. Profilul de eliberare a antibioticului este aproape liniar pe o perioadă de timp prelungită. Testele de inhibiție prezintă o activitate antimicrobiană slabă în ciuda dozei mari de antibiotic eliberat, indicând posibilă deteriorare a antibioticului în timpul procesului de uscare prin pulverizare.
  - Încărcarea tetraciclinei pe sticla bioactivă xerogel a fost analizată prin XPS și spectroscopia FTIR și profilul de eliberare a antibioticului a fost evaluat prin spectroscopie UV-Vis. Capacitatea tetraciclinei de a forma legături chimice cu ioni de  $\text{Ca}_2^+$  îi dăruiesc capacitate de încărcare mare, antibioticul fiind încă prezent pe suprafața de sticlă chiar și după 96 de ore de la eliberare..
  - Probe bioactive xerogel și aerogel au fost obținute prin procedeul sol-gel cu compoziție  $60\%\text{SiO}_2$   $30\%\text{CaO}$   $10\%\text{P}_2\text{O}_5$  (molar%), și încărcate cu diferite antibiotice
- I.
- Xerogelul arată faze de wollastonit ( $\text{CaSiO}_3$ ) și apatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) evidențiate prin XRD, o suprafață mare și mărimea porilor de aproximativ 10 nm.

- Încărcarea cu antibiotice nu influențează bioactivitatea xerogelului imersat în SBF, fapt susținut de creșterea fazei de tip apatită în XRD și creșterea dubletului în jurul 589-600  $\text{cm}^{-1}$  arătate de spectrele FTIR.
- Profilul de eliberare a antibioticelor din probele xerogel a fost evaluată prin RMN și spectroscopie UV-Vis respectiv.
- Antibioticele alese au dovedit caracteristici diferite de atașament și profil de eliberare :
  - Ampicilina a demonstrat atașamentul slab pe sticla bioactivă încărcată negativ din cauza sarcinii sale negative de ansamblu. Acesta a rezultat într-o foarte mare eliberare inițială, cu aproape întreaga cantitate de antibiotic eliberată într-o perioadă de timp scurtă.
  - Ciprofloxacina are capacitatea de a se lega chimic de Ca, de a forma complexe cu ea, rezultând într-o încărcare uniformă a antibioticului, un burst inițial moderat urmată de un profil de eliberare mai liniar.
  - Streptomicina este încărcată pozitiv și legarea acestuia este mediată de interacțiuni electrostatice. Acesta prezintă un profil de eliberare exponențială lentă.
  - Tetraciclină formează complecși de Ca, precum și atașându-se ferm de suprafața materialului. Acesta îi oferă o doză de antibiotic consistentă într-o rată de eliberare constantă .
- Studiile de inhibiție antimicrobiene pot fi corelate cu comportamentul de eliberare al antibioticelor. Ampicilina are cea mai slabă inhibiție, cu nici un efect asupra bacteriilor gram negative și efect slab asupra bacteriilor gram pozitive. Streptomicina inhibă întreaga suprafață pe care a fost aplicat eșantionului încărcat cu antibiotic, dar nu a fost evidențiat nici un efect de inhibare în afară de această zonă. Atât ciprofloxacina cât și tetraciclină au un efect de inhibare puternic asupra bacteriilor gram pozitive, chiar și în afara zonei tratate, ciprofloxacina are succes mai mare în inhibarea bacteriilor gram-negative .

## II.

- Eșantioanele de aerogel caracterizate arată că materialul este extrem de omogen, stabil și vitros, chiar și după tratamentele termice de la 1050 °C. Acesta dispune de asemenea de o suprafață mai mare decât omologul xerogel.
- Bioactivitatea probelor de aerogel nu suferă în urma încărcării cu antibiotice, pentru că faza de tip apatitic este evidențiată după imersia în SBF de către XRD și FTIR de asemenea.

- Capacitatea de încărcare cu antibiotice a probelor aerogel este mai bună comparativ cu omologul xerogel, datorită suprafeței mai mare a materialului.
  - Profilul de eliberare a antibioticelor este similar cu omologul xerogel. Singura diferență este comportamentul ciprofloxacinei care are un burst inițial puternic, urmat de un comportament de eliberare liniar.
  - Inhibarea antimicrobiană nu prezintă niciun efect antimicrobian pentru ampicilină. Streptomicina are numai un efect de inhibare locală așa cum se vede și pe proba xerogel, și iar ciprofloxacina cât și tetraciclina inhiba o regiune mai mare, dincolo de suprafața tratată.
- Materialele bioactive antimicrobiene prezentate în teză pot fi luate în considerare pentru restaurarea defectelor osoase, ca urmare a proprietăților avantajoase de bioactivitate și răspunsul lor promițător la inhibarea infecțiilor asociate cu implanturi osoase.

## Referințe

- [1] J. Zhao, Y. Liu, W.B. Sun, H. Zhang, Amorphous calcium phosphate and its application în dentistry, *Chemistry Central journal*, 5 (2011) 40.
- [2] W. Zimmerli, A. Trampuz, P.E. Ochsner, Prosthetic-joint infections, *New England Journal of Medicine*, 351 (2004) 1645-1654.
- [3] T. Shunmugaperumal, Rationale for Biofilm Eradication from Modern Medical Devices, in: *Biofilm Eradication and Prevention*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 36-72.
- [4] P.S.P. Gorman, D.S. Jones, Antimicrobial biomaterials for medical devices, *Microbiology*, 74 (1996) 195-205.
- [5] T. Shunmugaperumal, Biofilm Resistance–Tolerance to Conventional Antimicrobial Agents, in: *Biofilm Eradication and Prevention*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 87-115.
- [6] M. Miola, C. Vitale-Brovarone, C. Mattu, E. Verne, Antibiotic loading on bioactive glasses and glass-ceramics: An approach to surface modification, *Journal of biomaterials applications*, 28 (2012) 308-319.
- [7] D. Arcos, M. Vallet-Regí, Bioceramics for drug delivery, *Acta Materialia*, 61 (2013) 890-911.
- [8] L. Zhao, X. Yan, X. Zhou, L. Zhou, H. Wang, J. Tang, C. Yu, Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release, *Microporous and Mesoporous Materials*, 109 (2008) 210-215.
- [9] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regí, Confinement and Controlled Release of Bisphosphonates on Ordered Mesoporous Silica-Based Materials, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 8116-8117.
- [10] J. Xie, C. Riley, K. Chittur, Effect of albumin on brushite transformation to hydroxyapatite, *Journal of biomedical materials research*, 57 (2001) 357-365.
- [11] M. Vendruscolo, C.M. Dobson, Chemical biology: More charges against aggregation, *Nature*, 449 (2007) 555-555.
- [12] J. Baldwin, The structure of human carbonmonoxy haemoglobin at 2.7 Å resolution, *Journal of molecular biology*, 136 (1980) 103-128.
- [13] A. Dong, T.W. Randolph, J.F. Carpenter, Entrapping intermediates of thermal aggregation în alpha-helical proteins with low concentration of guanidine hydrochloride, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 27689-27693.

- [14] R. Michel, S. Pasche, M. Textor, D.G. Castner, Influence of PEG architecture on protein adsorption and conformation, *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 21 (2005) 12327-12332.
- [15] M.M. Browne, G.V. Lubarsky, M.R. Davidson, R.H. Bradley, Protein adsorption onto polystyrene surfaces studied by XPS and AFM, *Surface Science*, 553 (2004) 155-167.
- [16] J. Serra, P. González, S. Liste, C. Serra, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H.O. Ylänen, M. Hupa, FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 332 (2003) 20-27.
- [17] A.P. Serro, M.P. Gispert, M.C.L. Martins, P. Brogueira, R. Colaço, B. Saramago, Adsorption of albumin on prosthetic materials: Implication for tribological behavior, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 78A (2006) 581-589.
- [18] U.M. Wikesjö, P.J. Baker, L.A. Christlsson, R.J. Genco, R.M. Lyall, S. Hic, R.M. Diflorio, V.P. Terranova, A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces, *Journal of periodontal research*, 21 (1986) 322-329.
- [19] B.N. Vandekerckhove, M. Quirynen, D. van Steenberghe, The use of tetracycline-containing controlled-release fibers in the treatment of refractory periodontitis, *Journal of periodontology*, 68 (1997) 353-361.
- [20] J. Goodson, M. Cugini, R. Kent, G. Armitage, C. Cobb, D. Fine, M. Fritz, E. Green, M. Imoberdorf, W. Killoy, Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy: II. Clinical response, *Journal of periodontal research*, 26 (1991) 371-379.
- [21] M.G. Newman, K.S. Kornman, F.M. Doherty, A 6-month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planing in maintenance patients: clinical results, *Journal of periodontology*, 65 (1994) 685-691.
- [22] B. Lei, X. Chen, Y. Wang, N. Zhao, Synthesis and in vitro bioactivity of novel mesoporous hollow bioactive glass microspheres, *Materials Letters*, 63 (2009) 1719-1721.
- [23] E. Vanea, V. Simon, XPS study of protein adsorption onto nanocrystalline aluminosilicate microparticles, *Applied Surface Science*, 257 (2011) 2346-2352.
- [24] J. Cooper, J. Hunt, The significance of zeta potential in osteogenesis, in: ANNUAL MEETING-SOCIETY FOR BIOMATERIALS in CONJUNCTION WITH THE INTERNATIONAL BIOMATERIALS SYMPOSIUM, 2006, pp. 592.
- [25] Â.L. Andrade, D. Manzi, R.Z. Domingues, Tetracycline and propolis incorporation and release by bioactive glassy compounds, *Journal of non-crystalline solids*, 352 (2006) 3502-3507.
- [26] Â.L. Andrade, D. Manzi, R.Z. Domingues, Tetracycline and propolis incorporation and release by bioactive glassy compounds, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352 (2006) 3502-3507.
- [27] H. Yoshino, K. Kamiya, H. Nasu, IR study on the structural evolution of sol-gel derived SiO<sub>2</sub> gels in the early stage of conversion to glasses, *Journal of non-crystalline solids*, 126 (1990) 68-78.
- [28] L.J. Jha, S.M. Best, J.C. Knowles, I. Rehman, J.D. Santos, W. Bonfield, Preparation and characterization of fluoride-substituted apatites, *Journal of materials science. Materials in medicine*, 8 (1997) 185-191.
- [29] G. Falini, E. Foresti, I.G. Lesci, B. Lunelli, P. Sabatino, N. Roveri, Interaction of bovine serum albumin with chrysotile: spectroscopic and morphological studies, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 12 (2006) 1968-1974.
- [30] P. Neuvonen, Interactions with the absorption of tetracyclines, *Drugs*, 11 (1976) 45-54.
- [31] A. El-Fiqi, T.-H. Kim, M. Kim, M. Eltohamy, J.-E. Won, E.-J. Lee, H.-W. Kim, Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules, *Nanoscale*, 4 (2012) 7475-7488.
- [32] J. Al-Mustafa, Magnesium, calcium, and barium perchlorate complexes of ciprofloxacin and norfloxacin, *Acta Chimica Slovenica*, 49 (2002) 457-466.
- [33] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48 (2001) 5-16.
- [34] R. Brasseur, M. Carlier, G. Laurent, P. Claes, H. Vanderhaeghe, P.M. Tulkens, J.M. Ruyschaert, Interaction of streptomycin and streptomycylamine derivatives with negatively charged lipid layers: Correlation between binding, conformation of complexes and inhibition of lysosomal phospholipase activities, *Biochemical pharmacology*, 34 (1985) 1035-1047.



[35] M. Vallet-Regi, A.M. Romero, C.V. Ragel, R.Z. LeGeros, XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of *in vitro* growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses, *Journal of biomedical materials research*, 44 (1999) 416-421.

[36] R. Sreekanth Chakradhar, B. Nagabhushana, G. Chandrappa, K. Ramesh, J. Rao, Solution combustion derived nanocrystalline macroporous wollastonite ceramics, *Materials chemistry and Physics*, 95 (2006) 169-175.

[37] D.U. Tulyaganov, S. Agathopoulos, J.M. Ventura, M.A. Karakassides, O. Fabrichnaya, J.M.F. Ferreira, Synthesis of glass-ceramics in the CaO-MgO-SiO<sub>2</sub> system with B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Na<sub>2</sub>O and CaF<sub>2</sub> additives, *Journal of the European Ceramic Society*, 26 (2006) 1463-1471.

[38] X. Yang, L. Zhang, X. Chen, X. Sun, G. Yang, X. Guo, H. Yang, C. Gao, Z. Gou, Incorporation of B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioactive glass system for improving strength of low-temperature co-fired porous glass ceramics, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 358 (2012) 1171-1179.

[39] A. Vulpoi, C. Gruian, E. Vanea, L. Baia, S. Simon, H.J. Steinhoff, G. Göller, V. Simon, Bioactivity and protein attachment onto bioactive glasses containing silver nanoparticles, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100 (2012) 1179-1186.

[40] L. Kuchta, V. Fajnor, About the synthesis and thermal stability of SiO<sub>2</sub>-aerogel, *Journal of thermal analysis*, 46 (1996) 515-520.

## Anexe

### Lucrări științifice:

1. Z. Benyey, E. Vanea, T. Simon, S. Cavalu, V. Simon, Tetracycline loading and release from bioactive glass microspheres, *Studia Universitatis Physica*, 56 (2011) 15-24.
2. E. Vanea, S. Cavalu, F. Bănică, Z. Benyey, G. Göller, V. Simon, Adsorption and Release Studies of Tetracycline from a Bioactive Glass, *Studia Universitatis Chemia*, 56 (2011) 239-247.
3. Z. Benyey, E. Vanea, C. Gruian, V. Simon, XPS Study of Methemoglobin Adsorption onto Glutaraldehyde Functionalized Bioactive Glass at Different Ionic Strengths, *Studia Universitatis Physica*, 57 (2012) 5-15.
4. Z. Benyey, E. Vanea, M. Tăuțan, M. Spinu, V. Simon, Synthesis and characterization of new bioceramic/antibiotic composites, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, *in press* 15 (2013).

### Conferințe naționale și internaționale:

1. Z. Benyey, E. Vanea, S. Cavalu, V. Simon, Sol-Gel prepared bioactive glass for administration of antibacterial agents, in: *Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems*, Cluj Napoca, 2011.

2. Vulpoi, Z. Benyey, H. Ylanen, V. Simon, Characterisation of silver nanoparticles containing bioglass coated polymer fabrics, in: *Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems*, Cluj Napoca, 2011.
3. Z. Benyey, M. Tăuțan, M. Niculae, E. Vanea, C. Gruian, M. Spinu, V. Simon, Antibiotics loading of glass matrix with possible use as bone scaffolds for the prevention of infections, in: *31st European Congress on Molecular Spectroscopy*, Cluj Napoca, 2012.
4. Z. Benyey, M. Tăuțan, M. Niculae, E. Vanea, C. Gruian, M. Spinu, V. Simon, Preparation and characterization of antibiotic loaded bioactive glass matrixes for inhibition of biofilm formation at implant sites, in: *9th European Congress of Chemical Engineering*, The Hague, 2013.