

Contractor: INCDFM
Cod fiscal : RO9068280

anexa la procesul verbal de avizare interna nr.

De acord,
DIRECTOR GENERAL
Dr. Ionut Enculescu

Avizat,
DIRECTOR DE PROGRAM
Dr. Lucian Pintilie

RAPORT DE ACTIVITATE AL FAZEI

Contractul nr.10N/10.03.2016

Proiectul PN16480102: Sinteza si caracterizarea materialelor nanostructurate, straturilor subtiri si heterostructurilor

Faza nr. 4: Obtinerea si caracterizarea fizico-chimica a unor straturi bioceramice cu proprietati antimicrobiene.

Termen: 15.06.2016

1. Obiectivul proiectului:

Prezentul proiect isi propune sa desfasoare studii detaliate privind sinteza materialelor multifunctionale, a nanomaterialelor si nanocompozitelor, a straturilor subtiri si heterostructurilor precum si caracterizari aprofundate privind proprietatile lor structurale, electrice, magnetice, optice, etc. cu scopul declarat de a identifica potentiale aplicatii de interes economic sau societal.

2. Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului:

Scopul este de a obtine noi cunostinte si de a dezvolta noi aplicatii in domenii de interes ridicat cum ar fi industriile de inalta tehnologie (electronica, optoelectronica, telecomunicatii, spatiu si securitate, senzoriala, auto, etc.), energetica (in special surse regenerabile si stocare) si medicina. Avand la dispozitie o infrastructura diversificata pentru depuneri de straturi subtiri, multistraturi si compozite complexe (PLD, pulverizare RF, diverse metode chimice, MAPLE, CVD, SPS), proiectul isi propune sa combine diverse materiale functionale, sub forma de straturi subtiri sau nano-obiecte, in arhitecturi complexe care sa duca la caracteristici imbunatatite sau la noi functionalitati derivate din diferite tipuri de cuplaje la interfete. Dintre materialele functionale se au in vedere cele cu proprietati semiconductoare, dielectrice/ feroelectrice/ multiferice/

piezoelectrice/piezoelectrice si supraconductoare. Un accent aparte va fi pus pe anduranta in exploatare, cost redus, flexibilitate, abundenta naturala a elementelor constitutive si amprenta redusa asupra mediului inconjurator

3. Obiectivul fazei:

Unul dintre obiectivele majore ale acestui studiu este de a dezvolta un material care ar putea imbunatati viata pacientilor care sufera interventii chirurgicale ortopedice majore, prin reducerea riscului aparitiei infectiilor postoperatorii. Astfel, principalul obiectiv al fazei a constat in obtinerea unui material bioceramic pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint (AgHAp) si tetraciclina sau ciprofloxacina printr-o metoda simpla si la costuri mici ce poate fi folosit pentru aplicatii medicale. Obtinerea prin metoda sol-gel a straturilor bioceramice antimicrobiene pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint cu tetraciclina si/sau ciprofloxacina a fost unul dintre obiectivele majore. Caracterizarea fizico-chimica a acestor straturi a reprezentat cel de-al doilea obiectiv major al acestei faze. Mai mult, speram ca imbinarea metodei traditionale pentru tratarea infectiilor cu antibiotice sintetice si a metodei de tratament cu ajutorul antibioticelor naturale va creste sansa de a lupta impotriva infectiilor bacteriene.

4. Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului fazei:

Rezultatele acestei cercetari vor contribui cu noi informatii la posibila prevenire a infectiilor in domeniul medical. Astfel, se preconizeaza a fi obtinute la costuri mici straturi bioceramice pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint si antibiotice care sa posede proprietati antimicrobiene. De asemenea, se preconizeaza obtinerea unei distributii uniforme a tuturor elementelor constitutive pe toata suprafata. S-a urmarit atat obtinerea unor straturi bioceramice cu proprietati antimicrobiene la costuri mici cat si o complexa caracterizare a acestora

5. Rezumatul fazei: (maxim 5 pagini)

Efectele inhibitoare si antimicrobiene ale particulelor de argint sunt cunoscute inca din cele mai vechi timpuri. In ultimii ani, o problema majora de sanatate a aparut datorita cresterii rezistentei bacteriilor patogene la agenti antimicrobieni. Activitatea antibacteriana ale noilor materiale pe baza hidroxiapatita dopata cu argint (Ag: HAp) si diferite tipuri de antibiotice, cum ar fi tetraciclina (T-Ag: HAp) sau ciprofloxacina (C-Ag: HAp) nu au fost studiate pana in prezent. In acest studiu sunt prezentate, pentru prima data, prepararea si caracterizarea diferitelor straturi subtiri pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint cu tetraciclina sau ciprofloxacina. Caracterizarea structurala si chimica a straturilor subtiri de hidroxiapatita dopata cu argint a fost realizata prin spectroscopie in infrarosu cu transformata Fourier (FTIR). De asemenea, a fost studiat si morfologia straturilor de tip Ag: HAp, T-Ag: HAp si C-Ag. Pentru a studia compozitia chimica a straturilor s-au utilizat spectroscopia cu energie dispersiva de raze X (EDX) si spectroscopie de emisie optica prin descarcare luminoasa (GDOES), masuratori ce au furnizat informatii despre distributia elementelor componente in straturile subtiri. Studiile proprietatilor fizico-chimice au confirmat puritatea straturilor subtiri de hidroxiapatita dopata cu argint, obtinute din tinte de $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ cu $x_{\text{Ag}} = 0.2$ (Ag:HAp).

Aceasta cercetare a fost axata pe realizarea unui biomaterial nou și complex, care combină proprietățile biocompatibile ale hidroxiapatitei cu efectele unor antibiotice bine cunoscute, cum ar fi tetracilină și ciprofloxacina, precum și cu efectele antimicrobiene naturale ale ionilor de argint. Studiul structurii, a morfologiei și a activității antimicrobiene a noilor biomateriale ne va ajuta să înțelegem mai bine efectele lor împotriva diferiților agenți microbieni.

6. Rezultate, stadiul realizării obiectivului fazei, concluzii și propuneri pentru continuarea proiectului

Odată cu dezvoltarea bioingineriei, biomateriale noi și îmbunătățite au fost create și perfecționate pentru a fi utilizate în diferite aplicații biomedicale. Unul dintre cele mai promițătoare biomateriale este hidroxiapatita (HAp). Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), face parte din familia fosfaților de calciu și este un constituent major al oaselor și dinților umani [1-3]. Datorită asemănării sale cu țesuturi osoase naturale, hidroxiapatita sintetică a fost deja utilizată pe scară largă pentru diverse aplicații, cum ar fi ca material pentru implant sau ca și material pentru acoperirea implanturilor metalice [4-5]. Studii recente au arătat că HAp are proprietăți de osteoconductivitate și osteoinductivitate remarcabile, fiind capabilă să formeze legături cu țesutul dur natural uman [6-9]. Clinic, HAp a fost folosită ca material de umplură pentru obstrucționarea cariilor dentare sau a fracturilor osoase [1]. Cu toate acestea, datorită faptului că hidroxiapatita sintetică are o rezistență mecanică foarte mică, aceasta este de obicei folosită ca material de acoperire pentru diverse implanturi metalice, facilitând osteointegrarea, crescând astfel rata de succes a implanturilor ortopedice [10-15]. Având în vedere biocompatibilitatea acesteia, hidroxiapatita este un bun candidat pentru aplicații medicale.

Recent, cercetătorii au descoperit că diferite substanțe organice, cum ar fi proteine sau aminoacizi adsorbite la suprafața, transformă HAp într-un mediu ideal pentru replicare bacteriană [4]. Aceste bacterii conduc la apariția unor infecții post-chirurgicale și pot determina formarea unui biofilm bacterian [16]. Microorganismele care produc biostraturi sunt de cele mai multe ori rezistente la agenți antimicrobieni [16]. În majoritatea cazurilor, o consecință a infecțiilor postoperatorii este necesitatea unor intervenții chirurgicale suplimentare și, în cazuri extreme, îndepărtarea implantului [16]. O soluție la aceste probleme ar putea fi combinarea antibioticelor cu HAp, în scopul de a lupta împotriva bacteriilor la nivel local, împiedicând reproducerea acestora. Aceasta este o înșă o soluție pe termen scurt, deoarece antibioticele absorbite sunt eliminate, destul de repede prin fluidele corpului [16]. Pentru a asigura un efect antimicrobian pe termen lung împotriva infecțiilor bacteriene post-chirurgicale, structura hidroxiapatitei trebuie să conțină și un agent antimicrobian. În acest scop, ioni metalici, cum ar fi Ag^+ , Zn^{2+} or Cu^{2+} care sunt deja utilizați în medicină ca și agenți antimicrobieni, pot fi înglobați în structura HAp. Studii anterioare au demonstrat că argintul are o activitate antimicrobiană ridicată, menținând în același timp un nivel scăzut de citotoxicitate [16-19]. Mai mult decât atât, există studii care au demonstrat că ionii de argint au un efect oligodinamic împotriva bacteriilor Gram negative și Gram positive [16-17, 20-23].

Straturile subțiri de hidroxiapatita dopată cu argint (Ag:HAp), hidroxiapatita dopată cu argint cu tetraciclina (T-Ag:HAp) și hidroxiapatita dopată cu argint cu ciprofloxacina (C-Ag:HAp) au fost obținute prin metoda sol-gel (imersarea substratului de Si). O cantitate potrivită de nitrat de argint și fosfat acid de diamoniu a fost dizolvată în etanol. Soluția a fost agitată puternic timp de 24h la temperatura camerei (RT)). Concomitent, o cantitate stoichiometrică de nitrat de calciu și tetraciclina sau ciprofloxacina (dizolvate anterior în apă) a fost dizolvată în etanol și agitată puternic timp de 24h la RT. Raportul $[\text{Ca} + \text{Ag}]/\text{P}$ a fost ajustat la 1.67 iar concentrația de argint a fost stabilită la $x_{\text{Ag}} = 0.2$ [24-26]. Soluția care conține Calciu a

fost picurata peste solutia care continea fosfor. Solutia astfel rezultata, a fost agitata puternic timp de 72h la RT. Maturarea solutiei finale pe baza de Ag:HAp cu sau fara antibiotic (tetraciclina (T-Ag:HAp) sau ciprofloxacina (C-Ag:HAp)) s-a realizat la RT timp de alte 72h.

Discurile de Si pur au fost spalate si curatate cu acetona si apa distilata. Ulterior, acestea au fost imersate in solul de Ag:HAp, T-Ag:HAp sau C-Ag:HAp si uscate la 40 °C. Aceasta etapa a fost repetata de trei ori. In final, straturile subtiri obtinute (Ag:HAp, T-Ag:HAp si C-Ag:HAp) au fost uscate la 60 °C.

Imaginile MEB ale straturilor subtiri de Ag:HAp, T-Ag:HAp si C-Ag:HAp sunt prezentate in Fig. 1. In imagini se poate observa ca substratul (Si) a fost bine (uniform) acoperit de catre straturile depuse. De asemenea, se poate observa ca toate probele prezinta o morfologie granulata, cu o dimensiune a granurilor de aproximativ 100nm. Mai mult, imaginile MEB au aratat ca morfologia suprafetei a fost usor influentata de prezenta antibioticelor (tetraciclina (T-Ag:HAp) si ciprofloxacina (C-Ag:HAp)).

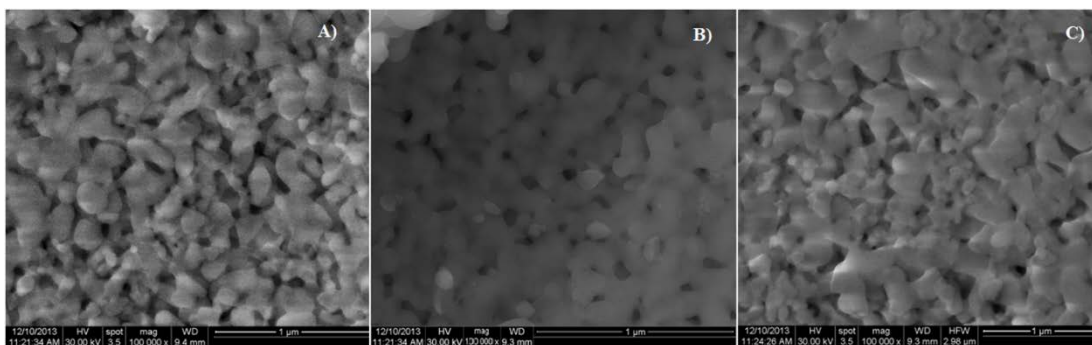


Fig. 1. Imagini MEB ale straturilor subtiri de Ag:HAp (A), T-Ag:HAp (B) si C-Ag:HAp (C).

Compozitia elementala a probelor studiate este prezentata in Fig. 2. Spectrul EDX al straturilor subtiri de Ag:HAp (Fig. 2A) confirma prezenta Ca, O, P, Ag si Si. De asemenea, prezenta elementelor constitutive ale straturilor de T-Ag:HAp (Ca, O, P, Ag, N si Si) a fost evidentiata in spectrul EDX asociat (Fig. 2B). Mai mult, in Fig. 2C este prezentat spectrul EDX al straturilor de C-Ag:HAp. Acesta confirma prezenta Ca, O, P, Ag, F, N si Si in probe (Fig. 2C). Picul Si (prezent in toate spectrele EDX) este dat de substratul straturilor. Compozitia omogena si continua a straturilor de Ag:HAp a fost confirmata de catre cartografiile obtinute pe aceste straturi (Fig. 3). Mai mult, se poate observa distributia uniforma precum si buna dispersie a elementelor componente (Ca, P, O si Ag) pe suprafata straturilor.

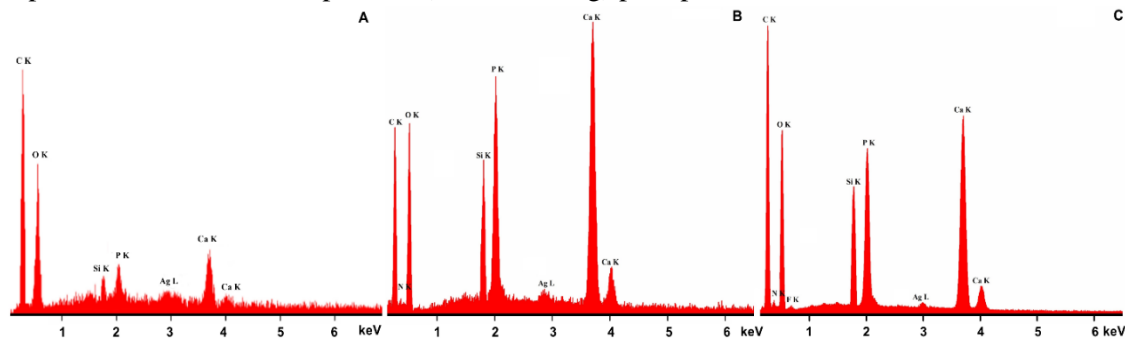


Fig. 3. Spectrele EDX ale straturilor subtiri de Ag:HAp (A), T-Ag:HAp (B) si C-Ag:HAp (C).

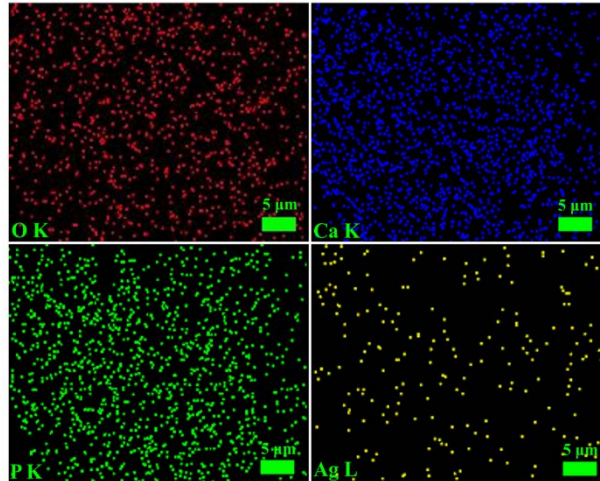


Fig. 3. Cartografiile ale stratului de Ag:HAp.

Fig. 4 prezinta spectrele de transmisie in infrarosu ale straturilor subtiri de hidroxiapatita dopata cu argint (Fig. 4D), precum si cele ale hidroxiapatitei dopate cu argint cu tetraciclina (Fig. 4A) si cu ciprofloxacin (Fig. 4C). spectrul hidroxiapatitei dopate cu argint (Fig. 4D) evidentiaza prezenta grupelor functionale de fosfat, carbonat si hidroxil in componenta probelor. Toate benzile vibrationale sunt caracteristice structurii hidroxiapatitei pure. Astfel, principalele benzi vibrationale asociate gruparii fosfat PO_4^{3-} au fost observate la 472 cm^{-1} , 561 cm^{-1} , 602 cm^{-1} si 1022 cm^{-1} , evidentiind modurile de incovoiere ale legaturilor O-P-O [27-30], in timp ce benzile de la 962 cm^{-1} si aproximativ 1087 cm^{-1} sunt caracteristice modului de intindere simetric nedegenrat al legaturii P-O si, respectiv, modului de intindere simetric triplu degenrat al legaturii P-O [27-31]. Gruparile functionale carbonat determina aparitia benzilor vibrationale in regiunea spectrala $870\text{-}880\text{ cm}^{-1}$ [32], iar modul vibrational asociat prezentei gruparii hidroxil din probele investigate determina aparitia benzii de la 631 cm^{-1} [27]. Se poate observa cu usurinta ca cele doua spectre ale straturilor subtiri de Ag:HAp ($x_{\text{Ag}}=0.1$) cu tetraciclina (Fig. 4A) si cu ciprofloxacin (Fig. 4C) sunt similar cu spectrul filmului subtire de Ag:HAp ($x_{\text{Ag}}=0.1$). Aproape toate benzile descrise anterior sunt caracteristice structurii apatitice. Cu toate acestea, in cazul filmului subtire pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint si tetraciclina (Fig. 4A), banda vibrationala de la 472 cm^{-1} a disparut, in timp ce in cazul filmului subtire pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint si ciprofloxacin (Fig. 4C), aceasta banda s-a deplasat la aproximativ 476 cm^{-1} , iar banda de la 862 cm^{-1} a disparut. Intre timp, benzile vibrationale suplimentare observate in componenta celor doua spectre sunt asociate gruparilor functionale caracteristice celor doua antibiotice. Avand structure chimice destul de complicate, ambele tipuri de antibiotic prezinta mai multe tipuri de moduri vibrationale. Asadar, in cazul filmului subtire de hidroxiapatita dopata cu argint cu tetraciclina (Fig. 4A), cele mai multe dintre benzile vibrationale suplimentare corespund vibratiilor de intindere ale inelului aromatic (1452 cm^{-1} , 1584 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} , 1668 cm^{-1}) [33]. Banda vibrationala observata la aproximativ 1358 cm^{-1} corespunde vibratiilor de intindere ale legaturilor C-O, modului de incovoiere simetric al legaturii CH_3 , sau modului vibrational de incovoiere al gruparii terminale dimetil [33], in timp ce banda de la aproximativ 1234 cm^{-1} corespunde modului vibrational de intindere C-N sau al modului vibrational de intindere al legaturii C-C [33]. De asemenea, influenta tetraciclinei este evidentiata de prezenta benzilor inregistrate intre 650 cm^{-1} si 900 cm^{-1} care sunt asociate deformarilor aromatice $=\text{C}-\text{H}$ [34]. Prin urmare, benzile vibrationale de la 489 cm^{-1} , 669 cm^{-1} si 693 cm^{-1} corespund deformarii

neplanare a inelului aromatic, in timp ce banda de la 634 cm^{-1} evidenziaza deformarea planara a inelului aromatic [34].

In cazul filmului subtire pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint si ciprofloxacin (Fig. 4C), benzile vibrationale aditionale observate in spectrul FTIR sunt caracteristice structurii chimice a antibioticului. Prin urmare, in regiunea spectrala $1000\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ pot fi observate benzile vibrationale caracteristice vibratiilor de intindere ale legaturii C-F din componenta gruparii fluorine. Intre 1250 cm^{-1} si 1300 cm^{-1} sunt prezente benzile vibrationale de incovoiere ale legaturii O-H din gruparile hidroxil, in timp ce in regiunea spectrala $1400\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ se regasesc benzile asociate vibratiilor de intindere ale legaturilor C-O din gruparile carbonil. Intre 1600 cm^{-1} si 1650 cm^{-1} se pot observa vibratiile de incovoiere ale legaturilor N-H [35]. Unele dintre benzile asociate structurii ciprofloxacinului din componenta filmului subtire pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint si ciprofloxacin (Fig. 4C) sunt usor deplasate fata de cele inregistrate in spectrul ciprofloxacinului. Acest comportament ar putea fi determinat de structura apatitica a hidroxiapatitei dopate cu argint.

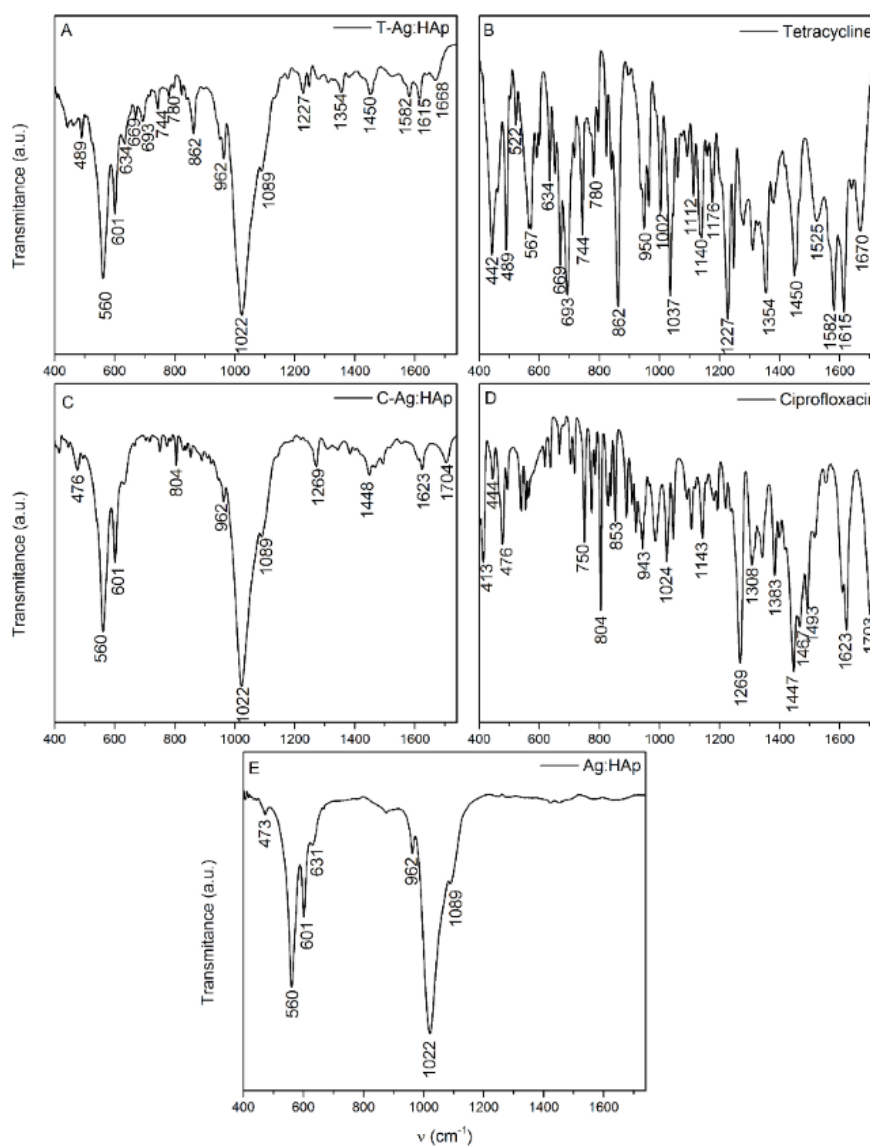


Fig. 4. Spectrele FTIR ale Ag:HAp (D), T-AG:HAp (A) si C-Ag:HAp (C), precum si spectrele celor doua antibiotic, Tetraciclina (B) si Ciprofloxacin (D).

Tinand cont de complexitatea structurilor chimice ale celor doua antibiotic studiate, uneori este dificil sa distingem benzile vibrationale asociate fiecarei grupari functionale, avand in vedere ca in aceeasi regiune spectrala pot fi regasite benzi caracteristice diferitelor legaturilor chimice.

Se poate observa cu usurinta ca cele doua antibiotic au influentat structura hidroxiapatitei dopate cu argint, determinand aparitia unor benzi vibrationale noi caracteristice compozitiei chimice specific. Aceste abenzi vibrationale sunt mult mai diminuate decat cele observate in spectrele individuale ale celor doua antibiotic, dar prezenta acestora sugereaza o buna interactie intre acestea si structura apatitica.

Analiza spectrala in infrarosu prezentata mai sus evidentiaza faptul ca benzile IR caracteristice structurilor tetraciclinei si ciprofloxacinului identificate in spectrele achizitionate pentru straturile pe baza de hidroxiapatita dopata cu argint si antibiotic (Fig.4) sunt deplasate comparative cu cele prezentate in spectrele IR ale antibioticelor (Fig. 4). O explicatie a acestui comportament ar putea fi schimbarea structurii apatitice a hidroxiapatitei dopate cu argint odata cu introducerea antibioticelor.

Tehnica GDOES a fost utilizată pentru analiza profilului in adancime a straturilor compozite de Ag:HAp, T-Ag:HAp si C-Ag:HAp depuse pe substraturi de siliciu. Aceste măsurători ne-au permis identificarea elementele chimice prezente in straturile subtiri cat si și distribuția acestora in straturile. O conversie exactă a timpului de pulverizare în adancime nu este simpla deoarece rata de pulverizare depinde de material și variază în timpul măsurării adâncimii profilelor [36-37]. Curbele pentru profilele de adâncime ale straturilor compozite Ag:HAp, T-Ag:HAp si C-Ag:HAp sunt prezentate în Figura 5A-C.

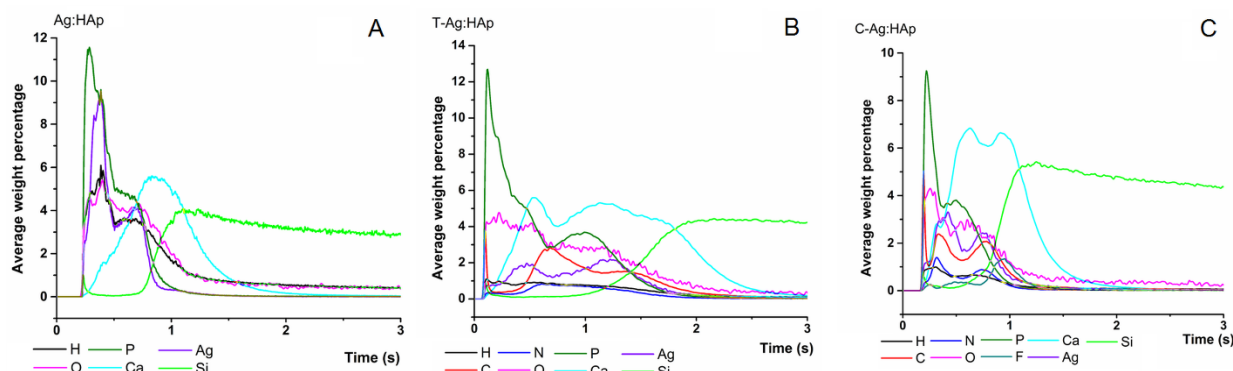


Fig. 5. Curbele profilelor de adancime ale straturilor Ag:HAp, T-Ag:HAp si C-Ag:HAp.

Curbele profilului de adancime pentru Ca, P, O, Ag și H au fost prezentate așa cum au fost identificate în straturile subtiri Ag:HAp în Figura 5A. Interfata Ag:HAp/Si a fost pusa in evidenta de o creștere a intensității curbei profilului de adâncime a Si și o scădere a intensității tuturor celorlalte elemente chimice.

In Figurile 5B-5C se poate observa că curbele profilului de adâncime ale elementelor identificate în straturile compozite T-Ag:HAp si C-Ag:HAp au avut un comportament similar.

Nu a existat o delimitare clară între curbele profilului de adancime pentru Ca, Ag, P, O și H, specific Ag:HAp, si curbele profilului de adancime pentru atomii de C, N, O, F și H, asociati cu structurile

celor două antibiotice. De obicei, aceste tipuri de rezultate ar putea indica rugozitatea interfeței (GD mediaza semnalele provenite de pe toata zona de eroziune.

Profilele de adâncime pentru Ca observate în Figurile 5B-5C sunt mai largi decât cele prezentate în Figura 5A. Acest lucru ar putea fi un indiciu de redistribuire a atomilor de Ca în straturilor subțiri care conțin antibiotic. Creșterea simultană a profilului Si cu diminuarea profilurilor tuturor celorlalte elemente indica interfata strat subțire/substrat [36-37]. Corelând aceste observații presupunem că în timpul procesului de depunere a straturilor subțiri de T-Ag:HAp și C-Ag:HAp, încorporarea antibioticelor în structura Ag:HAp a avut loc, formând astfel un strat compozit. Distribuția elementelor Ca, P, O, Ag, C, N, F, H prezente în straturile investigate, indicate de profilurile lor de adâncime din Figura 5 confirmă rezultatele obținute în urma analizei spectrale IR în ceea ce privește încorporarea antibioticelor în structura Ag:HAp.

Activitatea antimicrobiana a straturilor de T-Ag:HAp și C-Ag:HAp a fost investigata printr-un test de susceptibilitate antimicrobiana calitativ utilizand doua tulpini microbiene comune *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* 0364. După 48 ore de incubare, a straturilor Ag:HAp, T-Ag:HAp și C-Ag:HAp în prezența *E. coli* ATCC 25922 s-au obținut diferite zone de inhibiție (Tabelul 1). După 48 ore de incubare a straturilor Ag:HAp, T-Ag:HAp și C-Ag:HAp în prezența *S. aureus* 0364 s-a observat că diametrul mediu al zonei de inhibiție a crescut de la Ag:HAp la T-Ag:HAp (Tabelul 1).

Analiza activității antimicrobiene a straturilor de Ag:HAp, T-Ag:HAp și C-Ag:HAp împotriva *E. coli* ATCC 25922 și *S. aureus* 0364 a fost prezentată în tabelul 1 prin redarea diametrului mediu al zonei de inhibiție (mm).

Tabel 1. Activitatea antimicrobiana a straturilor Ag:HAp, T-Ag:HAp și C-Ag:HAp împotriva tulpinilor bacteriene *E. coli* ATCC 25922 și *S. aureus* 0364.

Tulpini bacteriene	Straturi	diametrului mediu al zonei de inhibiție (mm)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Si (control)	0
	Ag:HAp	23
	T-Ag:HAp	25
	C-Ag:HAp	28
<i>S. aureus</i> 0364	Si (control)	0
	Ag:HAp	30
	T-Ag:HAp	40
	C-Ag:HAp	35

Rezultatele obținute au sugerat că, în timpul procesului de depunere a straturilor de Ag:HAp, T-Ag:HAp și C-Ag:HAp, cele doua antibiotice au fost încorporate cu succes în structura Ag:HAp, formând astfel un strat compozit. Diferite straturi pe baza de hidroxiapatită dopata cu argint și antibiotice cum ar fi tetraciclină și ciprofloxacina au fost realizate printr-o metoda simpla și la costuri foarte mici.

Studiile morfologice reprezentate prin micrografii SEM au sugerat că toate probele studiate au forme granulare, și ca suprafața probelor T-Ag:HAp și C-Ag:HAp a fost influențată de prezența antibioticelor. Mai mult decât atât, o cartografie elementală a probelor a arătat o distribuție uniformă a tuturor elementelor constitutive ale probelor studiate pe toată suprafața filmului. Compoziția elementală a

straturilor de Ag:Hap, T-Ag:Hap și C-Ag:HAp a fost, de asemenea, investigată prin măsurători EDX. Rezultatele au sugerat că toate elementele găsite sunt asociate cu structurile hidroxiapatitei dopate cu argint și a celor două antibiotice utilizate. De asemenea, grupările funcționale prezente în fiecare probă au fost identificate cu ajutorul spectroscopiei FTIR. Principalele benzi vibraționale identificate în spectrele înregistrate pentru cele trei straturi (Ag:Hap, T-Ag: Hap și C-Ag: HAp) au fost asociate cu structura apatitei, cu mici modificări, în cele două spectre ale probelor care conțin antibiotice. Prezența antibioticelor a dus la apariția unor noi benzi de vibrație caracteristice compoziției lor chimice. Apariția acestor noi benzi sugerează încorporarea antibioticelor în structura apatitei.

Analize ale profilului de adâncime a straturilor subțiri de Ag:HAP, T-Ag:HAP și C-Ag:HAP depuse pe substraturi de siliciu au fost realizate prin tehnica GDOES punându-se astfel în evidență încorporarea celor două antibiotice în structura Ag:HAP, formând astfel un strat compozit.

Rezultatele noastre arată că prin combinarea hidroxiapatitei dopate cu argint cu unele dintre cele mai populare antibiotice, utilizate în tratamentul unui număr mare de infecții bacteriene la nivel mondial, ar putea fi produs un material compozit puternic, capabil de a eradica diferite tulpini bacteriene. De asemenea, activitatea antimicrobiană a ambelor antibiotice a fost stimulată de prezența ionilor de argint din compoziția straturilor studiate. Studiul nostru a creat premisele unui nou material care ar putea fi folosit în viitor pentru diferite aplicații biomedicale.

Prin prezentul studiu s-a reușit furnizarea de date concrete cu privire la realizarea straturilor bioceramice cu proprietăți antimicrobiene. Deși accentual cade pe aspectele specifice procesului de fabricare a acestor straturi s-a realizat și o corelare complexă a proprietăților fizico-chimice specifice acestor materiale. Scopul acestui studiu a fost acela de a explica rolul și necesitatea elaborării și caracterizării acestor noi materiale în vederea creșterii îmbunătățirii vieții. Rezultatele prezentate în cadrul acestui studiu confirmă îndeplinirea atât a tintelor stabilite cât și a indicatorilor asociați monitorizării și evaluării prin publicarea a două articole în reviste cotate ISI.

Rezultatele obținute în cadrul acestei etape s-au concretizat prin publicarea articolelor de mai jos:

[1]. Daniela Predoi, Carmen Steluta Ciobanu, Cristina Liana Popa, Rodica V. Ghita, *Structural Properties and Antifungal Activity against Candida albicans Biofilm of Different Composite Layers Based on Ag/Zn Doped Hydroxyapatite-Polydimethylsiloxanes*, *Polymers* 2016, 8, 131; doi:10.3390/polym8040131.

[2]. *Structural and biological assessment of zinc doped hydroxyapatite nanoparticles*, Cristina Liana Popa, Aurélien Deniaud, Isabelle Michaud-Soret, Régis Guégan, Mikael Motelica-Heino, Daniela Predoi, *Journal of Nanomaterials*, acceptat, iunie 2016.

Referințe

- [1] A. Rajendran, R.C. Barik, D. Natarajan, M.S. Kiran, D.K. Pattanayak, Synthesis, phase stability of hydroxyapatite–silver composite with antimicrobial activity and cytocompatibility, *Ceram.Internat.* 40 (2014) 10831–10838.
- [2] M. Jarcho, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clin. Orthop. Rel. Res.* 157 (1981) 259–278.
- [3] M. Supova, T. Suchy, *Handbook of Nanoceramic and Nanocomposite Coatings and Materials* Chapter 2: Bio-nanoceramics and Bio-nanocomposites, Elsevier 2015, 29-58.

- [4] A. Akhavan, N. Sheikh, F. Khoylou, F. Naimian, E. Ataeivarjovi, Synthesis of antimicrobial silver/hydroxyapatite nanocomposite by gamma irradiation, *Radiat. Phys. Chem.*, 98 (2014) 46–50.
- [5] L.L. Hench, *Bioceramics*, *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 1705–1728.
- [6] J.R. Woodward, A.J. Hildore, S.K. Lan, C.J. Park, A.W. Morgan, J.A.C. Eurell, S.G. Clark, M.B. Wheeler, R.D. Jamison, A.J.W. Johnson, The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity, *Biomaterials* 28 (2007) 45–54.
- [7] L. Lin, K.L. Chow, Y. Leng, Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *J. Biomed. Mater. Res. A* 89 (2009) 326–335.
- [8] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates in dentistry, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24(2013) 1335–1363.
- [9] N.A. Zakharov, I.A. Polunina, K.E. Polunin, N.M. Rakitina, E.I. Kochetkova, N.P. Sokolova, V.T. Kalinnikov, Calcium hydroxyapatite for medical applications. *Inorg.Mater.* 40 (2004) 641–648.
- [10] T. Hara, K. Hayashi, Y. Nakashima, T. Kanemaru, Y. Iwamoto, The effect of hydroxyapatite coating on the bonding of bone to titanium implants in the femora of ovariectomised rats, *J. Bone. Joint Surg. (Br)* 81 (1999) 705–709.
- [11] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications, *Mater. Sci. Eng.C.* 55 (2015) 272–326.
- [12] C.J. Tredwin, G. Georgiou, H. W. Kim, J.C. Knowles, Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method: bonding to titanium and scanning electron microscopy, *Dent. Mater.* 29 (2013) 521–529.
- [13] A. Oron, G. Agar, U. Oron, A. Stein, Enhancement of bony in-growth to metal implants by combining controlled hydroxyapatite coating and heat treatment, *J. Biomed. Mater. Res.* 100 (2012) 1668–1672.
- [14] U. Ripamonti, L.C. Roden, L.F. Renton, Osteoinductive hydroxyapatite-coated titanium implants, *Biomaterials* 33 (2012) 3813–3823.
- [15] H. Wang, N. Eliaz, Z. Xiang, H. P. Hsu, M. Spector, L. W. Hobbs, Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy, *Biomaterials* 27 (2006) 4192–4203.
- [16] F. E. Baplan, Y. Y. Özbek, Producing antibacterial silver-doped Hydroxyapatite powders with chemical Precipitation and reshaping in a spray dryer, *Mater. Tech.* 47 (2013) 431–434.
- [17] M. Supova, Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review, *Ceram. Int.* 41(2015) 9203–9231.
- [18] M. Singh, S. Singh, S. Prasad, I. S. Gambhir, Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles, *Dig. J. Nanomater. Bios.* 3 (2008) 115–122.
- [19] K. Gross, Hydroxyapatite – Synthesis of Hydroxyapatite Powders, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 228–236.
- [20] V. Stanic, D. Janackovic, S. Dimitrijevic, S. B. Tanaskovic, M. Mitric, M. S. Pavlovic, A. Krstic, D. Jovanovic, S. Raicevic, Synthesis of Antimicrobial Monophase Silver-Doped Hydroxyapatite Nanopowders for Bone Tissue Engineering, *Appl. Surf.Sci.* 257 (2011) 4510–4518.
- [21] L. Harris, R. Richards, Staphylococci and implant surfaces: a review, *Injury* 37 (2006) S3–S14.
- [22] C.F. Lypold, M. Reiher, G. Brehm, M.O. Schmitt, S. Schneider, P. Matousek, M. Towrie, Tetracycline and derivatives—assignment of IR and Raman spectra via DFT calculations, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5 (2003) 1149–1157.
- [23] B. Bhongade, S. Talath, S. Dhaneshwar, A Validated Method for the Quantitation of Ciprofloxacin Hydrochloride Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy, *Int. J. Spectrosc.* 2014 (2014) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/294612>.
- [24] C.S. Ciobanu, S.L. Iconaru, I. Pasuk, B.S. Vasile, A.R. Lupu, A. Hermenean, A. Dinischiotu, D. Predoi, Structural properties of silver doped hydroxyapatite and their biocompatibility, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 1395–1402.
- [25] C.S. Ciobanu, F. Massuyeau, L.V. Constantin, D. Predoi, Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100°C, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 613.

- [26] S.L. Iconaru, P. Chapon, P. Le Coustumer, D. Predoi, Antimicrobial activity of thin solid films of silver doped hydroxyapatite prepared by sol-gel method, *Sci. World J.* 2014 (2014) 1-8 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/165351>.
- [27] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 600-612.
- [28] B.O. Fowler, Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution, *Inorg. Chem.* 13 (1974) 194–207.
- [29] W.E. Klee, G. Engel, Infrared spectra of the phosphate ions in various apatites, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 32(1970) 1837–1843.
- [30] S.J. Joris, C.H. Amberg, Nature of deficiency in nonstoichiometric hydroxyapatites. II. Spectroscopic studies of calcium and strontium hydroxyapatites, *J. Phys. Chem.* 75 (1971) 3172–3178.
- [31] C.B. Baddiel, E.E. Berry, Spectra-structure correlations in hydroxyapatite and fluorapatite, *Spectrochim. Acta. A.* 22 (1966) 1407–1416.
- [32] L. Berzina-Cimdina, N. Borodajenko, Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Chapter 6 of *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology* edited by Theophile Theophanides, INTECH publishing, 2012.
- [33] S. Gunasekaran, S.R. Varadhan, N. Karunanidhi, Qualitative analysis on the infrared bands of tetracycline and ampicillin, *Proceed- Indian Nat Sci. Acad. Part A: Phys Sci.* 62 (1996) 309-316.
- [34] G. Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies – Tables and Charts*, Second edition, John Wiley & Sons publishing, Chichester, England 1994.
- [35] S. Sahoo, C. K. Chakraborti, P. K. Behera, Spectroscopic investigations of a ciprofloxacin / hpmc mucoadhesive suspension, *Int. J. Appl. Pharm.* 4 (2012) 1-8.
- [36] N. Trigoulet, T. Hashimoto, I.S. Molchan, P. Skeldon, G.E. Thompson, A. Tempez, P. Chapon, Surface topography effects on glow discharge depth profiling analysis, *Surf. Interface Anal.* 42 (2010) 328-333.
- [37] A. Groza, A. Surmeian, C. Diplasu, C. Luculescu, P. Chapon, A. Tempez, M. Ganciu, Physico-chemical processes occurring during polymerization of liquid polydimethylsiloxane films on metal substrates under atmospheric pressure air corona discharges, *Surf. Coat. Tech.* 212 (2012) 145-151.

Responsabil proiect :
Dr. Adrian Crisan

Responsabil faza :

Drd. Cristina Liana Popa,

Dr. Carmen Steluta Ciobanu,

Dr. Daniela Predoi