



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI

Școala Doctorală Chimie Aplicată și Știința Materialelor



*Compozite pe bază de substanțe biologic active cu
aplicații în medicină*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

Prof. Dr. Ing. Daniela BERGER

AUTOR

Ing. Mihaela DEACONU

Cuvinte-cheie: silice mezoporoasă, silice coloidală, degradare silice, sisteme cu eliberare controlată, cinetică de eliberare, modele matematice, antibiotice, doxiciclină, lomefloxacină, norfloxacină

CUPRINS

I. STUDIU DE LITERATURĂ	8
I.1. INTRODUCERE	9
I.2. SINTEZA TRANSPORTORILOR DE TIP SILICE MEZOPOROASĂ	9
I.3. FUNCȚIONALIZAREA NANOPARTICULELOR DE SILICE MEZOPOROASĂ	12
<i>Funcționalizarea post-sinteză</i>	13
<i>Funcționalizarea prin co-condensare</i>	14
I.4. INFLUENȚA PARAMETRIILOR DE SINTEZĂ ASUPRA MORFOLOGIEI ȘI STRUCTURII PARTICULELOR DE SILICE MEZOPOROASĂ.....	15
<i>Mediul de reacție</i>	17
<i>Agentul de direcționare a structurii</i>	19
<i>Precursorul de silice</i>	20
<i>Temperatura</i>	20
<i>Viteza de agitare</i>	21
<i>Co-surfactanți/Agenți de dispersare</i>	21
I.5. BIOCOMPATIBILITATEA ȘI TOXICITATEA NANOPARTICULELOR DE SILICE MEZOPOROASĂ	22
<i>Dimensiunea particulelor</i>	23
<i>Forma particulelor</i>	24
<i>Proprietățile suprafeței</i>	25
I.6. DEGRADAREA NANOPARTICULELOR DE SILICE MEZOPOROASĂ	27
<i>Morfologia particulelor</i>	30
<i>Suprafața specifică</i>	30
<i>Funcționalizarea suprafeței</i>	31
<i>Mediul de degradare</i>	32
<i>Compoziția chimică</i>	34
I.7. COMPOZITE CU ANTIBIOTICE PE BAZĂ DE SUPTURI DE SILICE MEZOPOROASĂ	36
<i>Îmbunătățirea solubilității medicamentelor cu ajutorul nanoparticulelor de silice mezoporoasă</i>	40
I.8. MODELE MATEMATICE PENTRU EVALUAREA CINETICII DE ELIBERARE A MEDICAMENTELOR.....	43
<i>Modelul Higuchi</i>	45
<i>Modelul Weibull</i>	46
<i>Modelul cu trei parametri</i>	46
BIBLIOGRAFIE	48

II. CONTRIBUȚII ORIGINALE	59
II.1. JUSTIFICAREA ALEGERII TEMEI	60
II.2. METODE DE CARACTERIZARE A SILICEI MEZOPOROASE COLOIDALE ȘI STUDIUL DEGRADĂRII ACESTEIA	61
II.3. NANOPARTICULE DE SILICE MEZOPOROASĂ COLOIDALĂ.....	63
II.3.1. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE SILICE MEZOPOROASĂ PURĂ ȘI FUNCȚIONALIZATĂ	64
<i>Influența utilizării polietilenglicolului în sinteza nanoparticulelor de silice</i>	66
<i>Influența surfactantului în sinteza nanoparticulelor de silice mezoporoasă</i>	68
<i>Influența tratamentului termic în sinteza nanoparticulelor de silice mezoporoasă</i>	69
<i>Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de silice mezoporoasă funcționalizată</i>	70
II.3.2. COMPORTAREA NANOPARTICULELOR DE SILICE COLOIDALĂ PURĂ ȘI FUNCȚIONALIZATĂ ÎN FLUIDE BIOLOGICE	73
<i>Degradarea nanoparticulelor de silice mezoporoasă pură</i>	75
<i>Degradarea nanoparticulelor de silice mezoporoasă funcționalizată</i>	80
II.3.3. EFECTELE NANOPARTICULELOR DE SILICE COLOIDALĂ LA NIVEL CELULAR	85
II.3.4. CONCLUZII CU PRIVIRE LA SINTEZA ȘI DEGRADAREA NANOPARTICULELOR DE SILICE COLOIDALĂ	88
BIBLIOGRAFIE	91
II.4. TEHNICI DE OBTINERE ȘI CARACTERIZARE A COMPOZITELOR CU SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE	93
II.5. COMPOZITE CU ANTIBIOTICE UȘOR SOLUBILE PE BAZĂ DE SUPORTURI DE SILICE MEZOPOROASĂ.....	97
II.5.1. COMPOZITE CU DOXICICLINĂ.....	97
<i>Obținerea suporturilor de tip MCM-41</i>	98
<i>Caracterizarea suporturilor de tip MCM-41</i>	100
<i>Obținerea compozitelor cu doxiciclină pe bază de suporturi de tip MCM-41</i>	105
<i>Caracterizarea compozitelor cu doxiciclină pe bază de suporturi de tip MCM-41</i>	105
<i>Determinarea cineticii de eliberare a doxiciclinei din suporturi de tip MCM-41</i>	107
<i>Evaluarea activității antibacteriene a compozitelor cu doxiciclină</i>	109
<i>Concluzii cu privire la compozitele de tip silice-doxiciclină</i>	110
II.5.2. COMPOZITE CU LOMEFLOXACINĂ	110
<i>Obținerea suporturilor de tip MCM-41 funcționalizate</i>	112
<i>Caracterizarea suporturilor de tip MCM-41 funcționalizate</i>	113
<i>Obținerea compozitelor cu lomefloxacină pe bază de suporturi de tip MCM-41</i>	116
<i>Determinarea cineticii de eliberare a lomefloxacinei din suporturi de tip MCM-41</i>	118
<i>Evaluarea activității antibacteriene a compozitelor cu lomefloxacină</i>	124
<i>Concluzii cu privire la compozitele de tip silice-lomefloxacină</i>	126
BIBLIOGRAFIE	128
II.6. COMPOZITE CU ANTIBIOTICE GREU SOLUBILE PE BAZĂ DE SUPORTURI DE SILICE MEZOPOROASĂ.....	133

II.6.1. COMPOZITE DE TIP NORFLOXACINĂ-SBA-15.....	134
<i>Obținerea suporturilor de tip SBA-15.....</i>	135
<i>Caracterizarea suporturilor de tip SBA-15.....</i>	135
<i>Obținerea compozitelor cu norfloxacină pe bază de suporturi de tip SBA-15.....</i>	139
<i>Caracterizarea compozitelor cu norfloxacină pe bază de suporturi de tip SBA-15.....</i>	139
<i>Determinarea cineticii de eliberare a norfloxacinei din suporturi de tip SBA-15.....</i>	141
II.6.2. COMPOZITE DE TIP NORFLOXACINĂ-MCM.....	143
<i>Obținerea suporturilor de tip MCM.....</i>	144
<i>Caracterizarea suporturilor de tip MCM.....</i>	145
<i>Obținerea compozitelor cu norfloxacină pe bază de suporturi de tip MCM.....</i>	149
<i>Caracterizarea compozitelor cu norfloxacină pe bază de suporturi de tip MCM.....</i>	149
<i>Determinarea cineticii de eliberare a norfloxacinei din suporturi de tip MCM.....</i>	152
<i>Evaluarea activității antibacteriene a compozitelor cu norfloxacină.....</i>	154
II.6.3. CONCLUZII CU PRIVIRE LA COMPOZITELE DE TIP SILICE-NORFLOXACINĂ.....	155
II.7. CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE	157
BIBLIOGRAFIE	164
ANEXE	167
ANEXA 1 – FITĂRILE DIFRACTOGRAMELOR DE RAZE X LA UNGHIURI MICI ALE PROBELOR DE SILICE MEZOPOROASĂ	168
ANEXA 2 – PARAMETRII DETERMINAȚI DIN FITĂRILE DIFRACTOGRAMELOR DE RAZE X LA UNGHIURI MICI	177

Introducere

Silicea mezoporoasă cu rețea de pori ordonată a fost prima dată obținută de cercetătorii companiei Mobil în 1992 și utilizată în cataliză ¹, iar aproximativ 10 ani mai târziu a fost folosită pentru prima dată ca suport la obținerea unui sistem cu eliberare controlată de substanțe biologice active ². Acesta a reprezentat punctul de pornire în dezvoltarea de sisteme cu eliberare controlată de compuși bioactivi pe bază de silice mezoporoasă, proprietățile acestora prezentând anumite avantaje. Cele mai întâlnite materiale de tip silice mezoporoasă sunt MCM-41, SBA-15 și MCM-48, primele două prezentând o geometrie a rețelei de pori hexagonală bidimensională, iar ultimul având o rețea cubică tridimensională de pori interconectați. Nanoparticulele de silice mezoporoasă prezintă valori ridicate ale suprafeței specifice și volumului de pori, având o capacitate excelentă de a adsorbi moleculele de interes, iar funcționalizarea suprafeței acestora oferă posibilitatea de a controla eliberarea agentului terapeutic prin modificarea interacțiilor medicament-transportor.

Studiile efectuate în cadrul acestei teze de doctorat se referă la sinteza și caracterizarea unor nanoparticule de silice coloidală cu dimensiuni sub 100 nm și proprietăți texturale corespunzătoare pentru utilizarea în transportul unor substanțe biologice active, a căror degradare în fluide biologice simulate s-a studiat. De asemenea, s-au obținut noi compozite silice mezoporoasă-antibiotic în vederea modulării cineticii de eliberare prin modificarea interacțiilor dintre transportorul de silice mezoporoasă și moleculele de agent antimicrobian. Astfel, au fost sintetizate și caracterizate suporturi de silice mezoporoasă funcționalizată cu grupări organice sau cu ioni de magneziu pentru a modula interacțiile dintre suport și antibiotic și a determina o cinetică de eliberare prelungită a antibioticului. De asemenea, au fost dezvoltate compozite pe bază de silice mezoporoasă cu dimensiuni ale porilor diferite pentru îmbunătățirea solubilității antibioticelor greu solubile.

Teza de doctorat este alcătuită din două părți: în prima parte constă într-un studiu de literatură ce constă în opt capitole, iar în cea de-a doua parte sunt prezentate contribuțiile originale în șase capitole. Studiul de literatură cuprinde în primul capitol noțiuni introductive despre silicea mezoporoasă, iar în următoarele două capitole sunt descrise sinteza și funcționalizarea nanoparticulelor de silice mezoporoasă. În capitolul trei a fost analizată influența parametrilor de sinteză asupra morfologiei și structurii nanoparticulelor de silice mezoporoasă, precum și date despre biocompatibilitatea nanoparticulelor în funcție de dimensiune, formă sau proprietățile suprafeței, și degradarea acestora în funcție de diferiți parametri semnificativi, precum mediul de degradare sau morfologia particulelor. De asemenea, în capitolul șapte au fost prezentate compozite pe bază de antibiotice în vederea modulării cineticii de eliberare sau a creșterii solubilității agenților terapeutici insolubili în mediu apos. De asemenea, sunt prezentate câteva caracteristici ale antibioticelor utilizate drept compuși biologici activi în cadrul tezei de doctorat, doxiciclină și lomefloxacină, medicamente ușor solubile, și norfloxacină, antibiotic greu solubil în mediu apos. În ultimul capitol al studiului de literatură sunt prezentate modele matematice pentru fitarea datelor experimentale ale pofilelor de eliberare a compușilor biologici activi cu ajutorul cărora se poate evalua cinetica de eliberare a medicamentelor din transportorii utilizați.

În partea a II-a a tezei, *Contribuții originale*, este justificată alegerea temei, urmată de capitolele de sinteză, caracterizare și comportare a nanoparticulelor de silice coloidală în fluide biologice simulate. În capitolul 4 și 5 sunt prezentate compozitelor pe bază de antibiotice ușor solubile (doxiciclină și lomefloxacină), respectiv pe bază de antibiotic greu solubil (norfloxacină), și analiza cineticii de eliberare a antibioticelor din suporturile de silice mezoporoasă dezvoltate în cadrul tezei de doctorat.

Rezultatele obținute prezentate în această teză pe parcursul studiilor de doctorat au fost diseminate prin publicarea a 5 articole, din care 4 cotate ISI și unul în Buletinul UPB-seria B,

a unui capitol de carte și prin prezentarea a 7 lucrări la conferințe, din care 6 prezentări orale și un poster.

II.1. Justificarea alegerii temei

În cadrul tezei de doctorat, *Compozite pe bază de substanțe biologice active cu aplicații în medicină*, au fost aplicate cunoștințe din domeniul ingineriei chimice în medicină, mai precis în tratamentul infecțiilor bacteriene.

Scopul acestei lucrări a constat în prepararea unor nanoparticule de silice coloidală și silice mezostructurată în vederea dezvoltării unor compozite cu agenți antimicrobieni pe bază de silice mezoporoasă pură și funcționalizată. Noile sisteme dezvoltate au fost utilizate pentru modularea cineticii de eliberare a unor antibiotice ușor solubile în apă, doxiciclina din clasa tetraciclinelor, și lomefloxacină, o fluorochinolonă, ambele clase de antibiotice fiind antitice utilizate în tratarea infecțiilor grave. În plus, au fost dezvoltate sisteme cu eliberare controlată pentru a îmbunătăți solubilitatea antibioticelor greu solubile sau insolubile în apă, precum norfloxacină. Obiectivele tezei au fost următoarele:

- ✓ Sinteza și caracterizarea unor nanoparticule de silice coloidală pură și funcționalizată;
- ✓ Studiul degradării nanoparticulelor coloidale în fluide biologice simulate;
- ✓ Sinteza și caracterizarea unor materiale mezostructurate pure de tip MCM-41 și SBA-15;
- ✓ Modificarea proprietăților suprafeței silice mezoporoase nanostructurate și caracterizarea acestora;
- ✓ Adsorbția agenților antimicrobieni în transportorii mezoporoși de silice pură și funcționalizată pentru obținerea unor sisteme cu eliberare controlată de agenți antimicrobieni;
- ✓ Studiul cineticii de eliberare a agenților terapeutici antibacterieni din porii transportorilor de tip silice mezoporoasă în fluide biologice simulate;
- ✓ Determinarea in vitro a activităților antibacteriene a sistemelor cu eliberare controlată de antibiotice dezvoltate.

II.2. Metode de caracterizare a silicei mezoporoase coloidale și studiul degradării acestora

Probele de silice coloidală pură și funcționalizată sintetizate au fost caracterizate prin metode fizico-chimice și a fost evaluată biocompatibilitatea acestora prin determinarea viabilității celulare atât pe o linie celulară normală, cât și pe una canceroasă. Metodele de caracterizare utilizate au fost spectroscopia FTIR, izoterme de adsorbție-desorbție, microscopie TEM, difracție de raze X la unghiuri mici, spectroscopie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES).

II.3. Nanoparticule de silice mezoporoasă coloidală

II.3.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de silice mezoporoasă pură și funcționalizată

În acest capitol a fost stabilită o metodă de sinteză pentru a obține nanoparticule (NP) de silice coloidală cu un diametru sub 100 nm și porozitate ridicată pentru a putea fi utilizate drept transportori pentru substanțe biologice active. De asemenea, au fost obținute nanoparticule de silice coloidală funcționalizată prin co-condensare cu grupări organice.

II.3.2. Comportarea nanoparticulelor de silice coloidală pură și funcționalizată în fluide biologice

Nanoparticulele de silice coloidală obținute au fost supuse unui tratament de degradare pentru a urmări stabilitatea rețelei de pori a acestora în timp, prin utilizarea drept mediu de degradare, două soluții tampon fosfat cu pH diferit: pH 7,4 pentru a simula mediul celular sănătos și pH 5,7 pentru simularea mediului celulelor tumorale.

II.3.3. Efectele nanoparticulelor de silice coloidală la nivel celular

II.3.4. Concluzii cu privire la sinteza și degradarea nanoparticulelor de silice coloidală

S-a elaborat o metodă de obținere a unor particule de silice mezoporoasă cu stabilitate coloidală prin urmărirea morfologiei și a structurii NP. S-a urmărit influența condițiilor de sinteză, precum natura agentului de direcționare a structurii, utilizarea unui agent pentru prevenirea aglomerării NP, precum și aplicarea tratamentelor termice. Utilizarea polietilenglicolului a avut un efect benefic asupra morfologiei particulelor, împiedicând aglomerarea acestora, însă creșterea raportului față de TEOS a determinat micșorarea gradului de ordonare a rețelei de pori. Tratamentele termice, deși determină o ușoară îmbunătățire a gradului de ordonare a rețelei de pori hexagonale, conduc la aglomerarea NP și lărgirea curbei de distribuție a dimensiunii porilor.

Au fost obținute NP de silice mezoporoasă funcționalizată cu diferite grupări organice hidrofiele și hidrofobe, prin co-condensare pentru a obține o distribuție uniformă a grupărilor organice pe suprafața internă și externă a particulelor de silice. NP funcționalizate au avut formă sferică, cu diametrul particulelor ce a depins de natura grupărilor organice legate de suprafața silicei și valori ale suprafeței specifice de la 675 m²/g până la 1157 m²/g.

NP de silice mezoporoasă pură și funcționalizată sintetizate au fost utilizate pentru studiul degradării acestora în soluție tampon fosfat (PBS) pH 7,4 și pH 5,7, care simulează mediul celular pentru celulele sănătoase, respectiv tumorale. Studiul a reliefat un comportament diferit atât în funcție de pH, cât și de modificarea suprafeței cu grupări funcționale. În PBS pH 5,7, hidroliza particulelor de silice este mai lentă, mult diminuată pentru NP funcționalizate utilizate față de cele pure, iar rețeaua hexagonală de mezopori este mai stabilă, diametrul porilor fiind în general apropiat de cel al materialului inițial. În PBS pH 7,4, hidroliza silicei este rapidă, diferența între cantitatea de silice hidrolizată după 6 h și respectiv după 24 h fiind mică, atât pentru probele de silice pură, cât și pentru probele de silice funcționalizată. După 24 h în PBS pH 7,4, diametrul porilor se mărește considerabil, curbele de distribuție fiind mult mai largi decât cele ale probelor degradate în PBS pH 5,7. S-a observat că în mediul de degradare cu pH 7,4 are loc o reorganizare a rețelei de pori susținută de apariția în difractogramele de raze X la unghiuri mici a unui al doilea peak de difracție intens, deplasat către valori mai mici ale vectorului q față de reflexia Bragg (100), caracteristică silicei de tip MCM-41, ceea ce indică distanțe mai mari între planele rețelei de pori.

Investigarea probelor prin TEM a demonstrat că nanoparticulele de silice sunt degradate atât la suprafață, cât și în interiorul canalelor mezoporiilor. Legarea de suprafața internă a pereților porilor a unor grupe hidrofobe, precum metil sau vinil, nu modifică comportamentul silicei funcționalizate față de cel al silicei pure, în timp ce prezența grupărilor aminopropil determină o hidroliză accentuată în ambele medii și totodată o degradare importantă a rețelei de pori probabil datorită interacțiilor electrostatice puternice între grupările aminice, care sunt protonate în ambele fluide, și ionii fosfat. Nu s-a putut evidenția o influență a dimensiunii particulelor nici asupra gradului de hidroliză, nici asupra stabilității rețelei hexagonale de pori caracteristică silicei de tip MCM-41.

Biocompatibilitatea nanoparticulelor de silice mezoporoasă pură și funcționalizată a fost testată prin determinarea viabilității celulare (metoda MTT) pe două linii celulare una sănătoasă, celulele epiteliale HaCat și una tumorală, MelJuso, prin utilizarea mai multor concentrații, în domeniul 50-250 μg/mL. S-a constatat că viabilitatea celulară depinde de concentrație. Cea mai bună biocompatibilitate a fost observată pentru probele MSN-CH₃ și MSN-CN, iar cea mai mică viabilitate celulară a fost obținută pentru probele MSN-SH și MSN-CH=CH₂, care însă împiedică proliferarea celulelor tumorale.

II.4. Tehnici de obținere și caracterizare a compozitelor cu substanțe biologice active

Compozitele suport mezoporos–medicament au fost obținute prin metoda impregnării prin umectare incipientă. S-a utilizat o soluție concentrată de medicament, apropiată de limita

de solubilitate a acestuia, iar solventul utilizat pentru solubilizare este evaporat în vid. Toate compozitele cu antibiotice au prezentat un conținut de antibiotic de 20% (gr.).

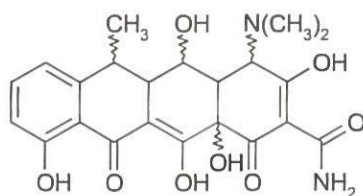
Profilele de eliberare *in vitro* a antibioticelor studiate au fost determinate la 37°C, sub agitare magnetică (150 rpm), în fluide biologice simulate, soluție tampon de fosfat (PBS) cu pH 7,4 sau pH 5,7.

II.5. Compozite cu antibiotice ușor solubile pe bază de suporturi de silice mezoporoasă

II.5.1. Compozite cu doxiciclină

Datele prezentate în acest capitol au fost publicate în articolul *Tailored doxycycline delivery from MCM-41-type silica carriers*, în jurnalul *Chemical Papers* ³.

Doxiciclina (Doxy), un antibiotic din clasa tetraciclinelor cu un spectru larg de activitate ⁴, a fost prima substanță activă, model, folosită în cadrul tezei de doctorat, în vederea dezvoltării unor compozite pe bază de silice mezoporoasă de tip MCM-41. Pentru a modela interacțiile dintre transportorul de silice și molecula de doxiciclină, s-au ales mai mulți transportori de tip MCM-41 funcționaliizați cu diferite grupări organice sau cu ioni de magneziu.



Schema 1. Structura doxiciclinei

În cadrul tezei de doctorat s-au utilizat drept transportori pentru doxiciclină, șase materiale de tip MCM-41 cu proprietăți texturale și structurale diferite: două probe de silice pură, cu pori de dimensiuni diferite care au fost sintetizate în prezența unor agenți de direcționare a structurii diferiți, trei materiale MCM-41 funcționaliizate cu grupări fenil, mercaptopropil și propilsulfonice, și un suport de tip MCM-41 modificat cu magneziu.

În difractogramele de raze X la unghiuri mici se poate observa că toate suporturile prezintă rețea ordonată de pori (Fig. 1), iar analiza de difracție la unghiuri mari (Fig. 2, imagine inserată) a demonstrat lipsa formării unei faze cristaline de MgO pe suprafața particulelor de silice.

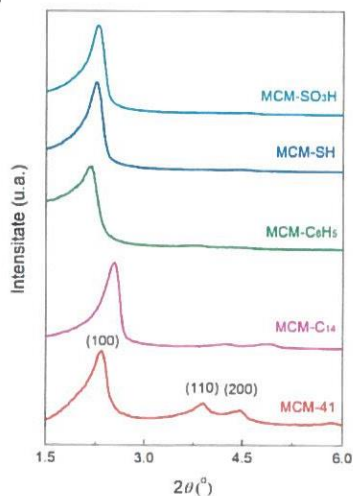


Fig. 1. Difractogramele de raze X la unghiuri mici ale transportorilor de tip MCM-41

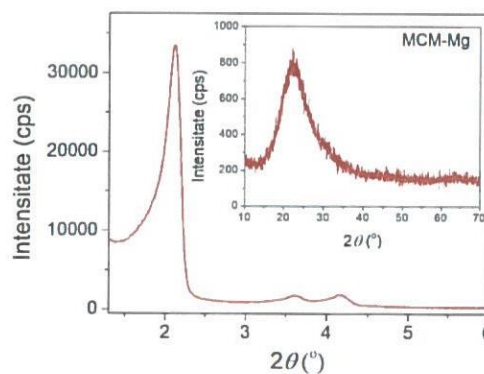


Fig. 2. Difractograma de raze X la unghiuri mici și cea la unghiuri mari (imagine inserată) ale transportorului MCM-Mg

Morfologia materialelor de tip MCM-41 a fost evaluată prin SEM și TEM. În general, particulele suporturilor MCM-41 sintetizate sunt sferice cu diametrul de 200-400 nm cu o ușoară tendință de aglomerare (Fig. 3). Investigarea TEM a transportorilor selectați a demonstrat formarea unei rețele ordonate de pori cu formare de canale cilindrice lungi, atât în cazul MCM-41 (Fig. 4a), cât și în cazul MCM-Mg (Fig. 4b).

Prezența moleculelor de doxiciclină în porii transportorilor a fost pusă în evidență prin spectroscopie FTIR (Fig. 5). Absența peak-urilor de difracție asociate cu faza cristalină a medicamentului în analizele XRD la unghiuri mari ale tuturor probelor cu doxiciclină (Fig. 6) demonstrează că medicamentul a fost adsorbit în porii suporturilor în stare amorfă.

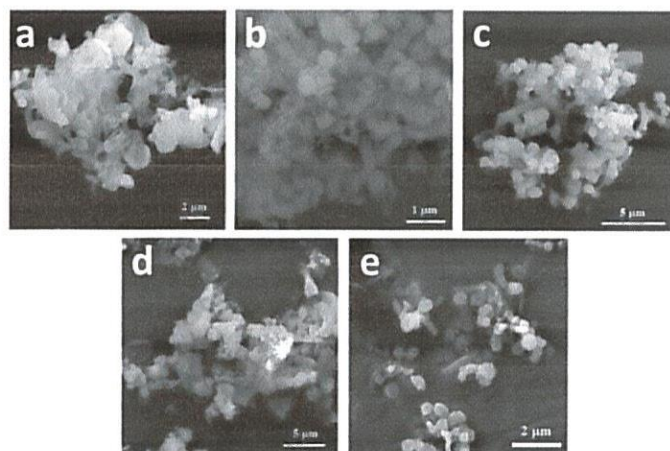


Fig. 3. Imaginile SEM ale probelor: MCM-C₁₄ (a), MCM-41 (b), MCM-Mg (c) MCM-C₆H₅ (d) și MCM-SO₃H (e)

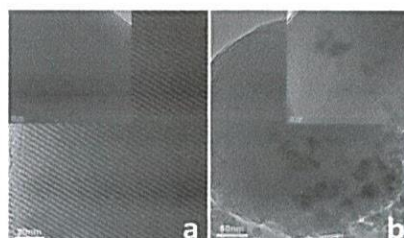


Fig. 4. Imaginile TEM ale MCM-41 (a) și MCM-Mg (b)

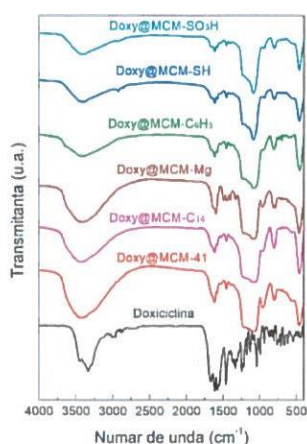


Fig. 5. Spectrele FTIR ale materialelor pe bază de doxiciclină

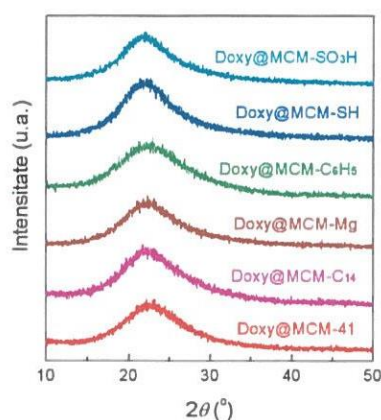


Fig. 6. Difractogramele de raze X la unghiuri mari ale probelor ce conțin doxiciclină

Doxiciclina a prezentat o cinetică de eliberare mai lentă din toate suporturile mezoporoase de tip MCM-41 studiate față de curba de solubilitate a acesteia (Fig. 7). Pentru toate compozitele cu doxiciclina s-au obținut valori ale parametrului $b < 0,75$, ceea ce indică un mecanism de difuzie fickiană a moleculelor de medicament din mezoporii transportorilor. Prezența magneziului în suportul MCM-Mg determină o eliberare mai lentă a antibioticului datorită bazicității mai mari, rezultată prin prezența particulelor de oxid de magneziu pe suprafața silicei.

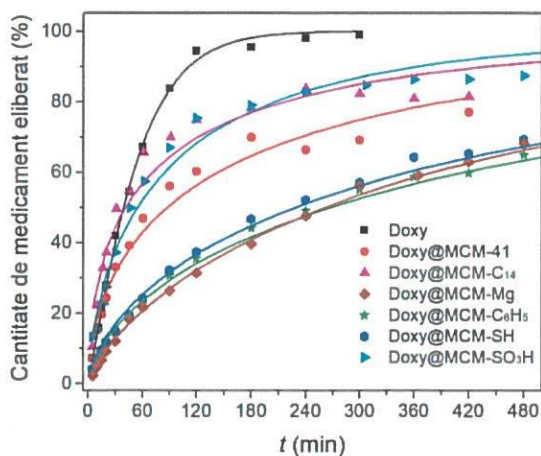


Fig. 7. Profilele de eliberare a doxiciclinei din suporturile de tip MCM-41 fitate cu funcția Weibull

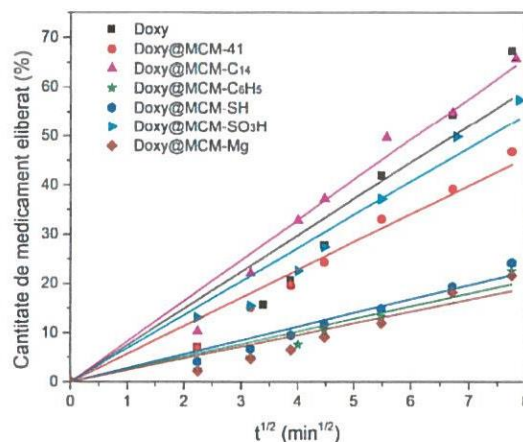


Fig. 8. Profilele de eliberare a doxiciclinei din suporturile de tip MCM-41 fitate cu modelul Higuchi

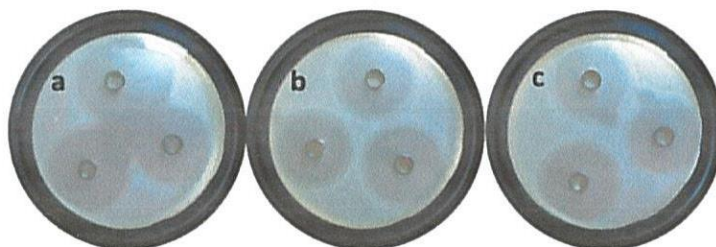


Fig. 9. Testarea antimicrobiană în triplicat a doxiciclinei (a), Doxy@MCM-41 (b) și Doxy@MCM-SH (c)

Concluzii cu privire la compozitele de tip silice-doxiciclina

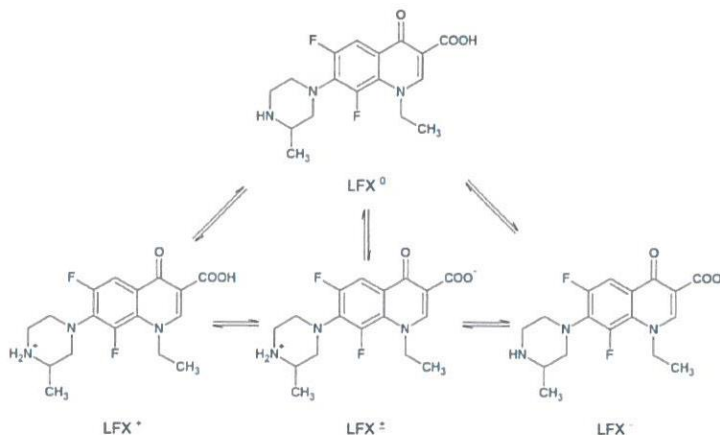
Drept transportori pentru doxiciclina s-au studiat materiale mezostructurate de tip MCM-41 pure și funcționalizate cu proprietăți structurale și texturale diferite. S-a demonstrat că cinetica de desorbție a antibioticului poate fi modificată prin funcționalizarea suprafeței transportorilor de tip silice mezoporoasă. O viteză de eliberare mai lentă a fost observată pentru transportorii a căror suprafață a fost funcționalizată cu grupări hidrofobe sau când a fost introdus magneziu sub formă de oxid de magneziu amorf în matricea de silice. De asemenea, viteza de eliberare a doxiciclinei poate fi controlată prin modificarea proprietăților suprafeței silicei tip MCM-41 fără a fi afectată activitatea antimicrobiană. Activitatea antibacteriană a materialelor compozite ce conțin doxiciclina a fost testată pe o tulpină standard *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (Fig. 9) și aceasta este similară cu cea a antibioticului aflat în aceeași cantitate sub formă de pulbere.

II.5.2. Compozite cu lomefloxacină

Rezultatele prezentate în acest capitol se regăsesc în articolele *Exploiting the zwitterionic properties of lomefloxacin to tailor its delivery from functionalized MCM-41 silica*

și *Heteroatom modified MCM-41-silica carriers for Lomefloxacin delivery systems*, ambele publicate în *Microporous and Mesoporous Materials* ^{5,6}.

Lomefloxacină (LFX) are două grupări funcționale ce pot fi ionizate, gruparea carboxil și restul piperazinil, astfel încât există patru forme ale medicamentului (Schema 2). După administrare, medicamentul este prezent sub formă de amfion (LFX^{\pm}) și în formă neutră (LFX^0) ⁷, raportul dintre cele două forme influențând biodistribuția și biodisponibilitatea acestuia.



Schema 2. Structura chimică a LFX

În acest capitol sunt prezentate *sisteme cu eliberare de lomefloxacină pe bază de silice pură și modificată cu magneziu*, care au demonstrat că prezența nanoparticulelor de oxid de magneziu în pereții interiori ai silicei încetinește viteza de eliberare a lomefloxacinii. În paralel, pentru a exploata natura amfionică a lomefloxacinii și pentru a simplifica sistemele, *s-au proiectat noi sisteme cu eliberare prelungită pentru lomefloxacină pe bază de silice de tip MCM-41 funcționalizată cu diferite grupări funcționale organice, acide sau bazeice*, pentru a modula cinetica de eliberare a lomefloxacinii, evitându-se astfel introducerea heteroatomilor, care pot reduce mai accentuat porozitatea transportorului, deci și capacitatea acestuia de a acomoda o cantitate mai mare de medicament.

Proprietățile structurale ale transportorilor de silice funcționalizată au fost determinate prin difracție de raze X la unghiuri mici (Fig. 10), spectroscopia FTIR a fost utilizată pentru a demonstra prezența grupărilor organice legate pe suprafața silicei, iar caracteristicile texturale au fost determinate din izotermele de adsorbție-desorbție a azotului (Fig. 11 și Tabel 1).

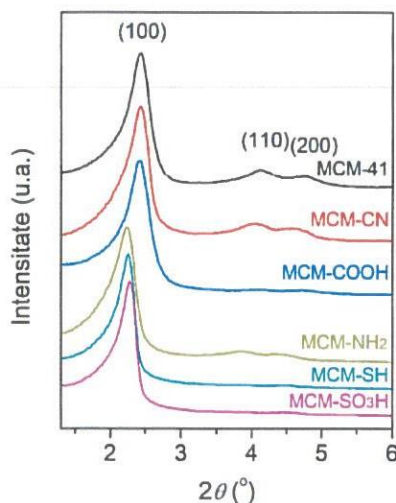


Fig. 10. Difractogramele de raze X la unghiuri mici ale transportorilor MCM-41 funcționalizați

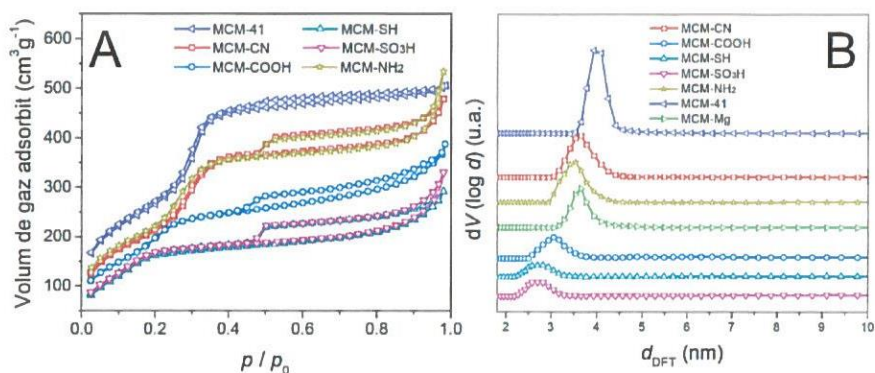


Fig. 11. Izotermele de adsorbție/desorbție a azotului (A) și curbele de distribuție a porilor calculate cu modelul DFT (B) ale suporturilor mezoporoase funcționalizate

Tabel 1. Parametrii texturali ai suporturile mezoporoase și ai compozitelor cu lomefloxacină

Suport	d_{BJH} (nm)	d_{DFT} (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_{p} (cm ³ /g)	GF:SiO ₂ raport molar	LFX@suport			
						d_{BJH} (nm)	d_{DFT} (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_{p} (cm ³ /g)
MCM-CN	2,52	3,66	793	0,71	0,087	2,39	3,54	330	0,35
MCM-COOH	2,13	3,06	678	0,57	0,055	2,00	3,06	131	0,18
MCM-NH ₂	2,38	3,54	830	0,78	0,105	2,26	3,42	69	0,07
MCM-SH	1,75	2,82	730	0,43	0,219	-	-	20	0,05
MCM-SO ₃ H	1,75	2,68	664	0,49	0,169	-	-	87	0,12
MCM-Mg	2,52	3,66	551	0,42	-	-	-	51	0,12
MCM-41	2,82	3,93	920	0,92	-	-	-	31	-

GF – grupare funcțională, d_{BJH} , d_{DFT} – diametrul mediu al porilor; S_{BET} – suprafața specifică; V_{p} – volum total de pori;

MCM-41 comercial: $d_{\text{BJH}} = 2,67$ nm; $d_{\text{DFT}} = 3,66$ nm; $S_{\text{BET}} = 976$ m²/g; $V_{\text{p}} = 0,74$ cm³/g.

Compozitele pe bază de lomefloxacină au fost caracterizate prin difracție de raze X la unghiuri mari (Fig. 12), pentru a identifica starea în care au fost adsorbite moleculele de fluorochinolonă, spectroscopie FTIR (Fig. 13), precum și de izoterme de adsorbție-desorbție a azotului (Fig. 14) pentru a evalua adsorbția medicamentului în porii suporturilor.

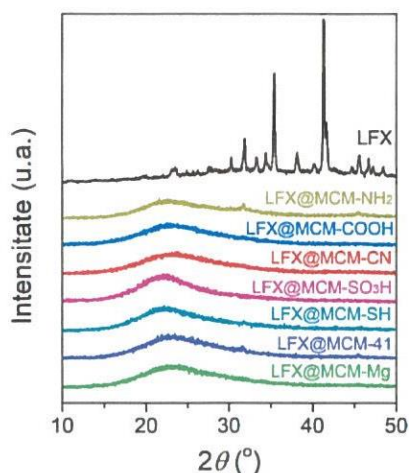


Fig. 12. Difractogramele de raze X la unghiuri mari ale compozitelor tip MCM-41 cu lomefloxacină

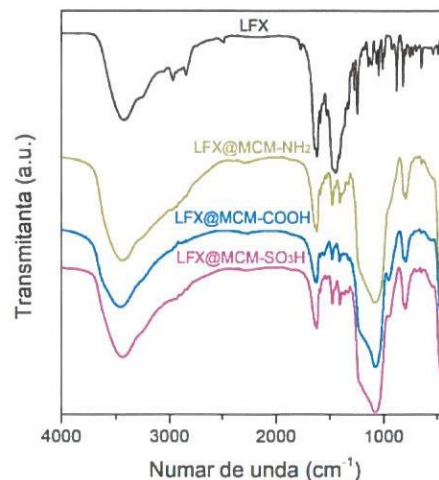


Fig. 13. Spectrele FTIR ale compozitelor tip MCM-41 cu lomefloxacină

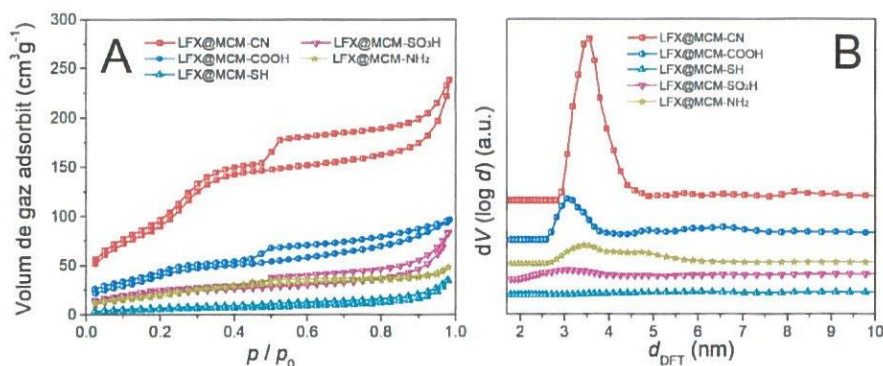


Fig. 14. Izotermele de adsorbție-desorbție a azotului (A) și curbedele de distribuție a dimensiunii porilor calculate cu modelul DFT (B) pentru compozitele pe bază de lomefloxacină

Datele experimentale au fost fitate cu mai multe modele matematice: modelul cu trei parametri ⁸ (Fig. 15), modelele Weibull ⁹ (Fig. 17 și Fig. 18) și Higuchi ¹⁰ (Fig. 19 și Fig. 20), toate fitările având coeficienți de corelare mari. Cea mai lentă cinetică de eliberare a lomefloxacină a fost obținută în cazul compozitului LFX@MCM-CN, suportul având grefate cele grupări funcționale cu caracterul bazic cel mai puternic, deși diametrul mediu al porilor este mai mare decât al suporturilor MCM-SH și MCM-SO₃H. Diametrul porilor nu are o influență semnificativă asupra cineticii de eliberare a lomefloxacină. Procesul de eliberare a antibioticului din suporturile de silice funcționalizată este influențat de valorile pK_a ale grupărilor organice grefate pe suprafața pereților porilor silicei (Fig. 16).

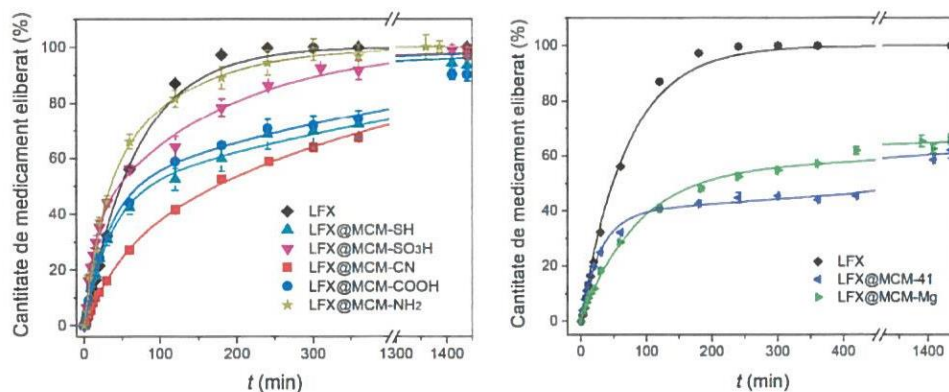


Fig. 15. Datele experimentale de la eliberarea lomefloxacină fitate cu modelul cu trei parametri.

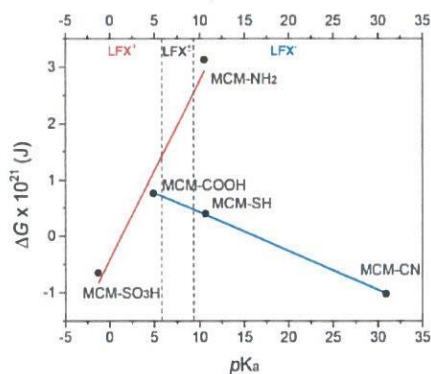


Fig. 16. Dependența parametrului ΔG de valoarea pK_a a grupărilor funcționale organice ale suporturilor mezoporoase

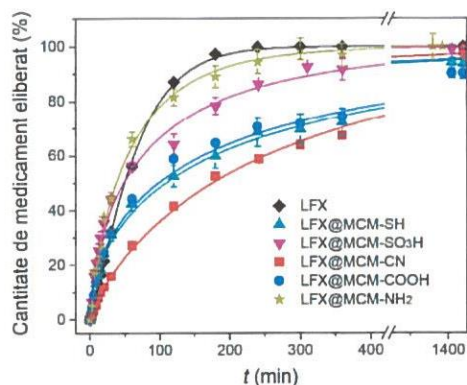


Fig. 17. Profilele de eliberare a lomefloxacinii din suporturile funcționalizate de tip MCM-41 fitate cu modelul Weibull

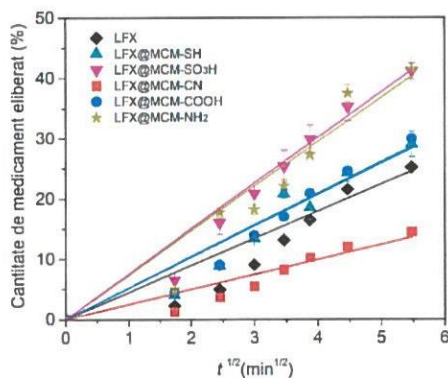


Fig. 19. Datele experimentale de eliberare a lomefloxacinii din transportorii MCM-41 funcționalizați cu grupări organice fitate cu modelul Higuchi

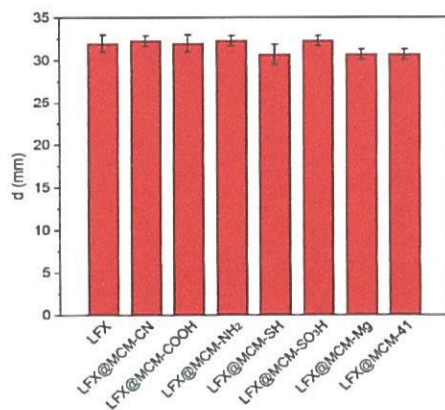


Fig. 21. Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii bacteriene a compozitelor cu LFX în comparație cu LFX pură

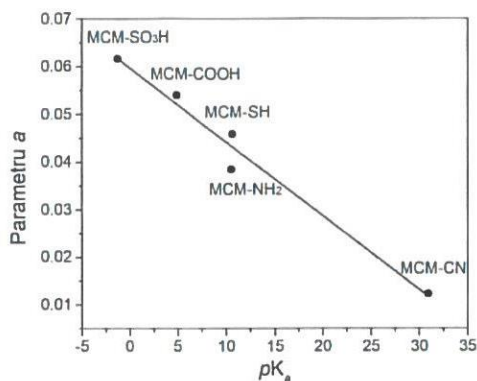


Fig. 18. Dependența parametrului a de valoarea pK_a a grupărilor funcționale organice ale suporturilor mezoporoase

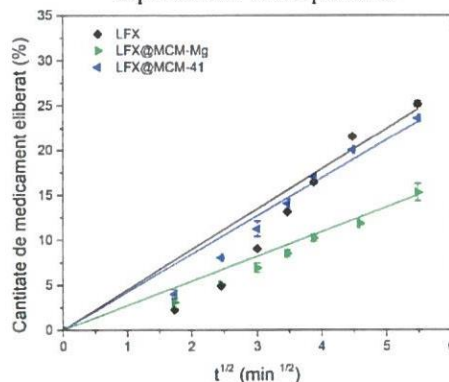


Fig. 20. Datele experimentale de eliberare a lomefloxacinii din transportorii MCM-41 și MCM-Mg fitate cu modelul Higuchi

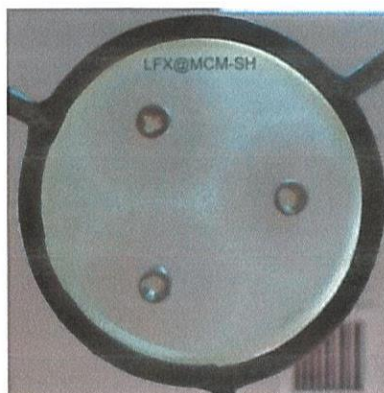


Fig. 22. Activitatea antibacteriană a compozitului LFX@MCM-SH împotriva *E.coli*

Concluzii cu privire la compozitele de tip silice-lomefloxacină

Cinci suporturi de silice mezoporoasă funcționalizate cu grupări organice (propionitril, acid propionic, aminopropil, mercaptopropil și acid propilsulfonic), un suport de silice pură și unul modificat cu magneziu au fost utilizate drept transportori pentru obținerea unor sisteme cu

eliberare controlată de lomefloxacină. Toate suporturile tip MCM-41 prezintă rețea de pori hexagonală ordonată cu porozitate ridicată.

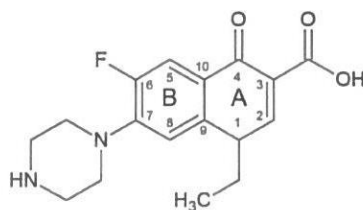
Moleculele de antibiotic au fost adsorbite în porii suporturilor mezoporoase sub formă deprotonată prin metoda impregnării prin umectare incipientă, compozitele rezultate având un conținut de medicament de 20 %(gr.). Difrakția de raze X la unghiuri mari a demonstrat prezența lomefloxacinii în mezoporii suporturilor de tip MCM-41 în stare amorfă, cu excepția materialului MCM-NH₂, care a conținut și lomefloxacină cristalină. Suporturile MCM-SO₃H și MCM-NH₂ interacționează cu lomefloxacina prin grupările piperazinil, iar MCM-CN și MCM-SH prin grupările carboxilat. Suportul MCM-COOH este singurul care ar putea interacționa cu ambele grupări funcționale ale medicamentului.

Datele experimentale obținute la eliberarea lomefloxacinii au fost fitate cu diferite modele matematice pentru a înțelege mai bine cinetica de eliberare a antibioticului. Aciditatea grupărilor funcționale legate de pereții interiori ai porilor silicei determină interacțiile dintre medicament și suportul de silice și astfel influențează profilul de eliberare a lomefloxacinii. Pentru suporturile de silice mezoporoasă funcționalizate cu grupări acide, transportul moleculelor de antibiotic în pori are loc prin difuzie fickiană, iar pentru suporturile cu grupări bazice, procesul de transport este mai complex. Viteza globală de eliberare a medicamentului obținută din modelul Weibull este invers proporțională cu valoarea pK_a a grupărilor funcționale ale suporturilor. Rezultatele obținute în acest capitol au stabilit că, datorită naturii amfionice a lomefloxacinii la pH fiziologic, grupările organice legate de silice cu bazicitate mare pot asigura interacții puternice între lomefloxacină și suport și, prin urmare, pot determina o cinetică de eliberare mai lentă atât în etapa „burst”, cât și în etapa de eliberare prelungită. Același lucru este valabil și în cazul modificării silicei cu oxid de magneziu, creșterea caracterului bazic al suportului fiind datorat prezenței oxidului de magneziu.

Toate compozitele cu lomefloxacină prezintă activitate antimicrobiană bună împotriva bacteriei *Escherichia coli* ATCC 8739 (Fig. 21 și Fig. 22), diametrul zonelor de inhibiție a creșterii bacteriene fiind similar cu cel al antibioticului pur.

II.6. Compozite cu antibiotice greu solubile pe bază de suporturi de silice mezoporoasă

Norfloxacină (NFX) (Schema 3) este greu solubilă în etanol și acetonă și practic insolubilă în apă ^{11, 12}, de aceea biodisponibilitatea acesteia este limitată ¹³. Datele experimentale prezentate în acest capitol au fost obținute prin utilizarea norfloxacinii preparate la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Chimico-Farmaceutică București conform metodei de obținere descrisă de Pintilie și colaboratorii săi ¹⁴ și a fost utilizată după recristalizare din *N,N*-dimetilformamidă.



Schema 3. Structura chimică a norfloxacinii

II.6.1. Compozite de tip norfloxacină-SBA-15

Datele experimentale din acest subcapitol au fost publicate în UPB Scientific Bulletin B, articolul *Solubility enhancement of poorly water-soluble norfloxacin by encapsulation into SBA-15-type silica carriers* ¹⁵.

În acest capitol sunt prezentate datele legate de utilizarea silicei de tip SBA-15 pură și funcționalizată în vederea creșterii vitezei de solubilizare a norfloxacinii, un antibiotic greu solubil, aceasta bazându-se pe faptul că prin adsorbția unui principiu activ farmaceutic greu

solubil în mediu apos, în stare amorfă, se îmbunătățește solubilitatea acestuia în fluide biologice.

Toate materialele de tip SBA-15 sintetizate prezintă o rețea de pori hexagonală cu un grad ridicat de ordonare, evidențiat în difractogramele de raze X la unghiuri mici de prezența reflexiei Bragg (100) intensă, urmată de cele două reflexii Bragg (110) și (200) cu mai puțin intense (Fig. 23). Funcționalizarea transportorilor a fost pusă în evidență prin spectroscopie FTIR (Fig. 24), iar parametrii texturali sunt prezentați în tabelul 2. În figura 25 sunt prezentate imaginile SEM ale transportorilor de tip SBA-15.

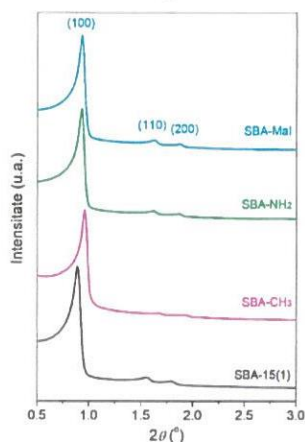


Fig. 23. Difractogramele de raze X la unghiuri mici ale transportorilor

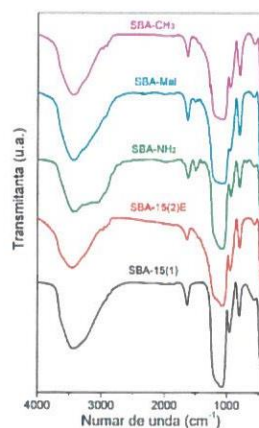


Fig. 24. Spectrele FTIR ale transportorilor

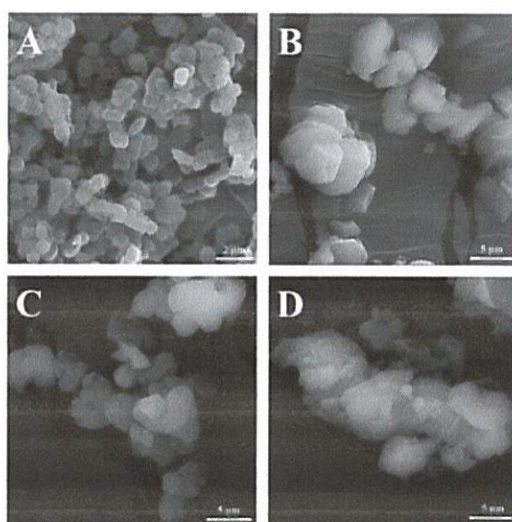


Fig. 25. Imaginile SEM ale transportorilor tip SBA-15: (A) SBA-15(1), (B) SBA-15(2)E, (C) SBA-Mal, (D) SBA-CH₃

Tabel 2. Parametrii structurali și texturali ai transportorilor

Proba	S_{BET} (m ² /g)	V_p (cm ³ /g)	d_{BJH} (nm)
SBA-15(1)	748	1,11	5,82
SBA-15(2)E	506	0,58	3,94
SBA-15(2)	712	0,81	3,94
SBA-Mal	595	0,94	5,42
SBA-CH ₃	631	0,96	4,74

În cazul materialelor compozite pe bază de transportori de silice se poate observa că o concentrație mai mare de medicament, precum și prezența grupărilor funcționale conduce la

cristalizarea parțială a antibioticului, evidențiată în difractograma de raze X la unghiuri mari (Fig. 26). În spectrele FTIR ale tuturor probelor sunt prezente benzile de vibrație caracteristice norfloxacinii ¹⁶ (Fig. 27).

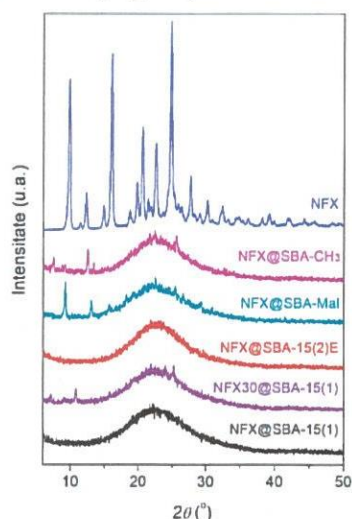


Fig. 26. Difractogramele de raze X la unghiuri mari ale compozitelor cu norfloxacină

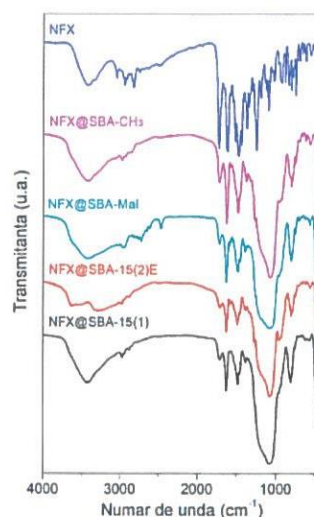


Fig. 27. Spectrele FTIR ale compozitelor pe bază de norfloxacină

Experimentele de eliberarea antibioticului din transportorii de tip SBA-15 au fost efectuate în fluid intestinal simulat, PBS pH 7,4. Profilele de eliberare a norfloxacinii (Fig. 28) au arătat că toți transportorii determină o creștere a solubilității norfloxacinii, iar profilele de eliberare sunt de tipul I după clasificarea lui Ye ¹⁷. În cazul transportorilor de silice pură, 90% din cantitatea de medicament adsorbită a fost solubilizată în primele 15-20 minute ale experimentului. În cazul transportorului de silice de tip SBA-15 funcționalizată cu grupări amidice, notat cu SBA-Mal, se poate observa o solubilizare aproape instantanee a antibioticului, 95% din conținutul total de medicament fiind desorbit în primele 3 minute.

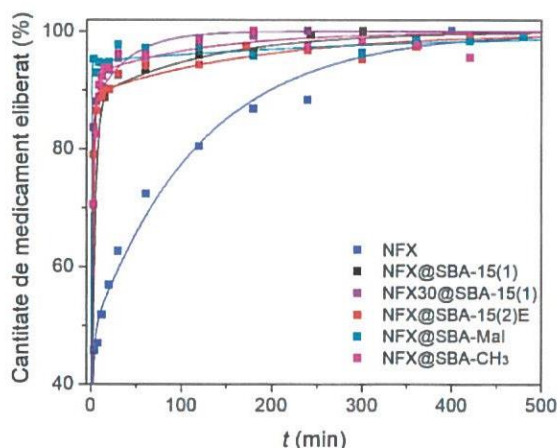


Fig. 28. Profilele de eliberare a norfloxacinii din transportorii de tip SBA-15

II.6.2. Compozite de tip norfloxacină-MCM

În subcapitolul 6.1, s-a demonstrat creșterea solubilității norfloxacinii adsorbite în porii silicei tip SBA-15, însă antibioticul a fost parțial cristalin în aceste sisteme. În continuare, atenția a fost îndreptată către transformarea completă în stare amorfă a antibioticului prin utilizarea unor transportori cu diametrul porilor mai mic, precum și reducerea dimensiunii particulelor, pentru a putea îmbunătăți permeabilitatea antibioticului prin membrana intestinală.

Cinci suporturi de silice mezoporoasă utilizate drept transportori pentru norfloxacină sunt: un suport MCM-41 cu canale cilindrice, două tipuri de nanoparticule sferice de silice pură și unul de silice funcționalizată cu grupări vinil, precum și un suport MCM-48. Rezultatele solubilității norfloxacină cu ajutorul silice mezostructurate sunt prezentate în articolul *Norfloxacin delivery systems based on MCM-type silica carriers designed for the treatment of severe infections* din revista *Materials Chemistry and Physics* ¹⁸.

Spectroscopia FTIR a fost utilizată pentru a demonstra prezența grupărilor organice în materialele funcționalizate, precum și pentru confirmarea îndepărtării complete a surfactantului din materialele sintetizate (Fig. 29). În concordanță cu difractogramele de raze X la unghiuri mici (Fig. 30), imaginile TEM ale materialului MCM-41 (Fig. 30a) prezintă o matrice poroasă foarte ordonată, formată din canale lungi, paralele, în timp ce probele preparate în prezența PEG sunt nanoparticule sferice bine definite, de dimensiuni mici și pori cu dimensiune uniformă ce formează canale scurte (Fig. 30 b și c).

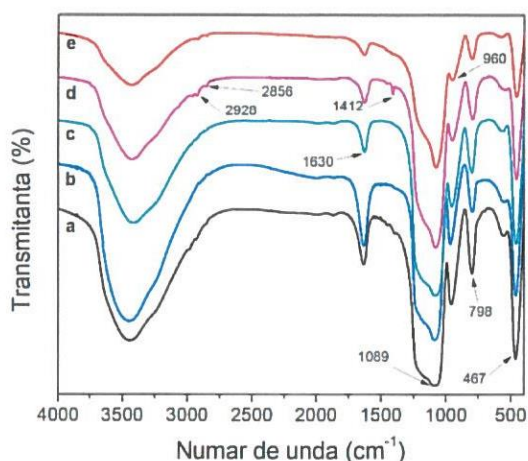


Fig. 29. Spectrele FTIR ale transportorilor de silice mezoporoasă: (a) MCM-41; (b) MSN-E; (c) MSN; (d) MSN-vinil; (e) MCM-48

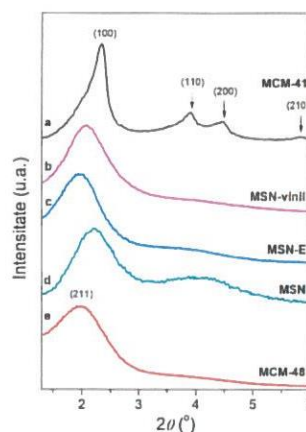


Fig. 30. Difractogramele de raze X la unghiuri mici ale transportorilor mezoporoși: (a) MCM-41; (b) MSN-vinil; (c) MSN-E; (d) MSN; (e) MCM-48

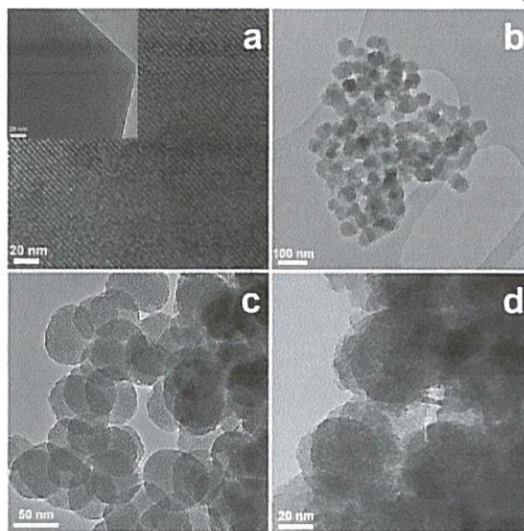


Fig. 31. Imagini TEM ale suporturilor mezoporoase: (a) MCM-41; (b) MSN-E ($58,6 \pm 8,1$ nm); (c) MSN-vinil ($58,8 \pm 8,3$ nm); (d) MCM-48 ($46,1 \pm 2,3$ nm)

Proba MCM-48 prezintă o curbă de distribuție a dimensiunii porilor bimodală (Fig. 32e- imaginea inserată), ceea ce este caracteristic pentru acest tip de silice, care prezintă pori interconectați ce formează o matrice cubică cu dimensiunea porilor de 2,5 nm și 9 nm (Tabel 3). Prezența antibioticului în mezoporii compozitelor de tip norfloxacină-MCM a fost verificată prin spectroscopie în infraroșu (Fig. 34). Absența fazei cristaline a medicamentului din analizele de difracție de raze X la unghiuri mari a demonstrat faptul că norfloxacina a fost adsorbită în interiorul mezoporiilor transportorilor în stare amorfă (Fig. 35).

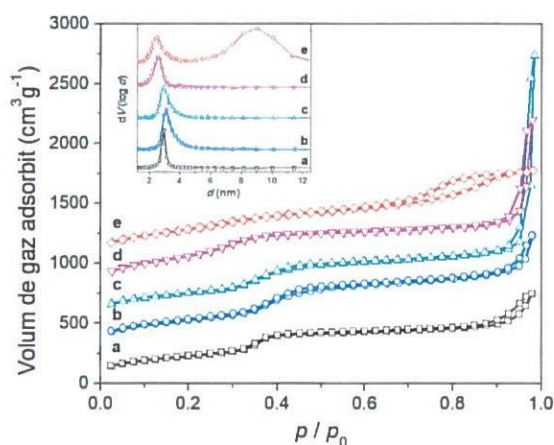


Fig. 32. Izoterme de adsorbție-desorbție și curbele de distribuție a dimensiunii porilor pentru materialele de tip MCM: (a) MCM-41; (b) MSN-E; (c) MSN, (d) MSN-vinil; (e) MCM-48

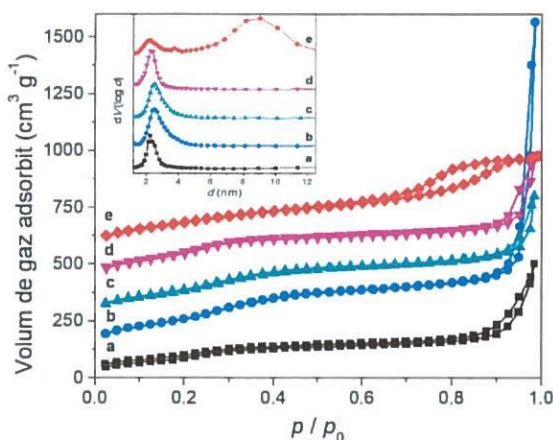


Fig. 33. Izoterme de adsorbție-desorbție și curbele de distribuție a dimensiunii porilor ale compozitelor cu NFX: (a) NFX@MCM-41; (b) NFX@MSN-E; (c) NFX@MSN, (d) NFX@MSN-vinil; (e) NFX@MCM-48

Tabel 3. Parametrii texturali și structurali ai transportorilor de silice mezoporoasă și ai compozitelor norfloxacină-MCM

Probă	S_{BET} m ² /g	$V_{p, d < 10 nm}$ cm ³ /g	d_{BJH} nm	a_0 nm	wt nm
MCM-48	1115	1,11	2,50 și 9,0	10,53	0,93
MSN-E	992	0,97	3,14	5,24	2,10
MSN	917	0,75	2,97	4,94	1,97
MSN-vinil	1222	0,83	2,53	5,02	2,49
MCM-41	824	0,71	2,98	4,42	1,44
NFX@MCM-48	483	0,60	2,15 și 9,0	-	-
NFX@MSN-E	583	0,42	2,38	-	-
NFX@MSN	495	0,43	2,53	-	-
NFX@MSN-vinil	528	0,39	2,25	-	-
NFX@MCM-41	301	0,22	2,25	-	-

S_{BET} – suprafața specifică; d_{BJH} – diametrul mediu al porilor; $V_{p, d < 10 nm}$ – volum de pori determinat pentru pori cu diametrul mai mic sau egal cu 10 nm; a_0 – parametrul celulei elementare (pentru MCM-48: $a_0 = \sqrt{6} d_{211}$; pentru probele de tip MCM-41: $a_0 = 2 d_{100} / \sqrt{3}$); wt – grosimea peretelui (pentru MCM-48: $wt = \left(1 - \frac{V_p \cdot \rho}{1 + V_p \cdot \rho}\right) \cdot \frac{a_0}{x_0}$; pentru probele de tip MCM-41: $wt = a_0 - d_{BJH}$); ρ – desitatea pereților porilor (2,2 g/cm³); x_0 – constantă (3,0919).

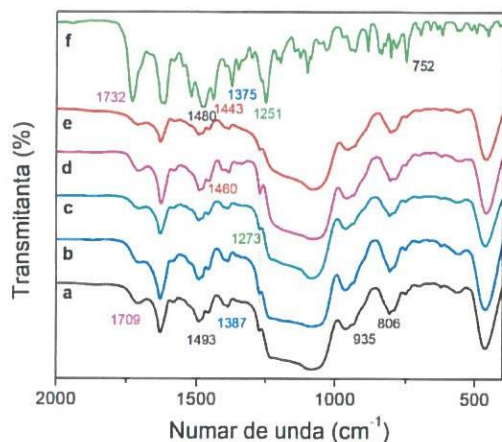


Fig. 34. Spectre FTIR ale compozitelor cu norfloxacină: (a) NFX@MCM-41; (b) NFX@MSN-E; (c) NFX@MSN, (d) NFX@MSN-vinil; (e) NFX@MCM-48; (f) NFX

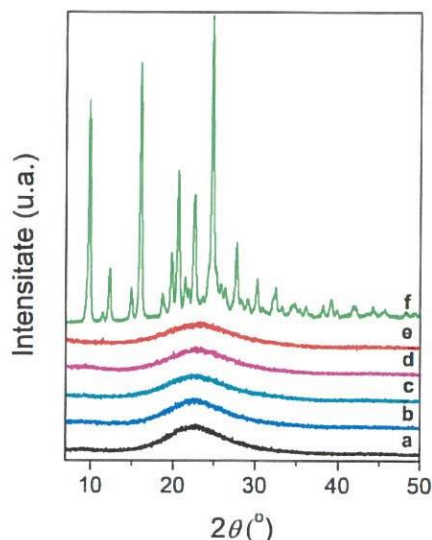


Fig. 35. Difractogramele de raze X la unghiuri mari ale compozitelor cu norfloxacină: (a) NFX@MCM-41; (b) NFX@MSN-E; (c) NFX@MSN, (d) NFX@MSN-vinil; (e) NFX@MCM-48; (f) NFX

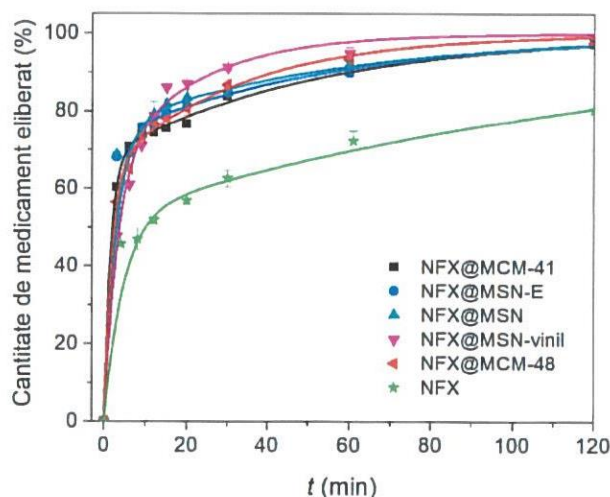


Fig. 36. Profilele de eliberare a norfloxacinii din transportorii de tip MCM

Toate datele experimentale au indicat creșterea vitezei de dizolvare a NFX după ce a fost adsorbită în mezoporii materialelor de tip MCM (Fig. 36). După 20 de minute, cantitatea de norfloxacină eliberată a depășit 75%(gr) din conținutul total de medicament, în toate cazurile, în timp ce dizolvarea medicamentului cristalin, efectuată în condiții similare, este de doar aproximativ 57% din cantitatea totală de medicament. Rezultatele sunt în concordanță cu datele experimentale obținute de Huang și colaboratorii săi ¹⁹, care au fost utilizate nanotuburi de dioxid de titan drept transportori, sau cele obținute de Fan și colaboratorii săi ²⁰, care au utilizat fosfat de calciu nanoporos.

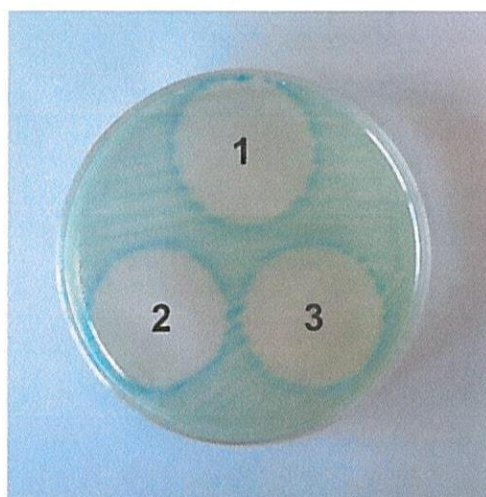


Fig. 37. Diametrele zonelor de inhibiție ale creșterii bacteriene determinate de:
(1) NFX – 33 mm, (2) NFX@MCM-48 – 32 mm, (3) NFX@MSN – 33 mm

II.6.3. Concluzii cu privire la compozitele de tip silice-norfloxacină

Silicea mezoporoasă de tip SBA-15 pură și funcționalizată a fost utilizată pentru creșterea solubilității norfloxacinii, un antibiotic greu solubil în apă și cu o biodisponibilitate redusă. Materialele de tip SBA-15 pure și funcționalizate au fost sintetizate și utilizate drept transportori pentru norfloxacină. Adsorbția norfloxacinii, în principal în stare amorfă, în mezoporii transportorilor de tip SBA-15 determină creșterea solubilității acesteia în fluid intestinal simulat. În cazul în care au fost utilizați transportori funcționalizați, s-a observat o viteză de eliberare puțin mai mare, solubilizarea fiind aproape instantanee în cazul transportorului SBA-Mal. S-a demonstrat de asemenea, că un conținut ridicat de medicament nu influențează semnificativ cinetica de eliberare, ci produce o cristalizare parțială a medicamentului.

S-a pus la punct o metodă originală de sinteză a unor nanoparticule de silice tip MCM sferice, cu dimensiuni mici atât pure, cât și funcționalizate cu grupări vinil, de aproximativ 60 nm, cu o stabilitate coloidală bună, care au fost testate drept transportori pentru norfloxacină. Acestea au fost comparate cu particule de silice mai mari de tip MCM-41 cu grad ridicat de ordonare a rețelei hexagonale de pori și cu particule de tip MCM-48. Prezența moleculelor de antibiotic în interiorul mezoporiilor transportorilor în stare amorfă a fost evidențiată prin difracție de raze X la unghiuri mari și prin scăderea semnificativă a porozității, precum și a diametrului mediu al porilor în cazul materialelor ce conțin norfloxacină în comparație cu suportul corespunzător.

Norfloxacină, un antibiotic greu solubil în apă ce aparține clasei flurochinolonelor, eliberată din suporturile de tip MCM a prezentat o solubilizare îmbunătățită în comparație cu dizolvarea medicamentului în aceleași condiții. Principalul avantaj al utilizării transportorilor de tip silice mezoporoasă este îmbunătățirea solubilității medicamentului în mediu apos, fără a fi necesare modificări ale moleculei de medicament, deoarece creșterea solubilității se bazează doar pe reducerea energiei de rețea a medicamentului prin amorfizarea acestuia. În plus, materialele de tip MCM cu norfloxacină au prezentat o activitate antibacteriană bună împotriva *E. coli* ATCC 25922, aceasta fiind similară cu cea a antibioticului (Fig. 37). Datorită creșterii solubilității NFX, sistemele cu eliberare controlată de medicamente ce conțin transportori de tip MCM ar putea fi aplicate în cazul în care este necesară o concentrație inițială mare de medicament imediat după administrare, aceasta fiind necesară în cazuri de septicemie și șoc septic.

II.7. Concluzii generale și perspective

În cadrul tezei de doctorat „*Compozite pe bază de substanțe biologice active cu aplicații în medicină*” s-au preparat nanoparticule de silice coloidală pură și funcționalizată printr-o metodă nouă de sinteză și materiale mezostructurate de tip MCM-41 și SBA-15 pure și funcționalizate ce au fost utilizate pentru dezvoltarea de sisteme cu eliberare controlată de antibiotice.

Nanoparticulele de silice coloidală pură preparate prin metoda originală au avut formă sferică și dimensiuni sub 100 nm. Acestea au fost obținute în mediu de trietanolamină, care a asigurat mediul bazic necesar reacțiilor de hidroliză și condensare a precursorului de silice, tetraetilortosilicat, dar a determinat și inhibarea creșterii dimensiunii nanoparticulelor. Alături de trietanolamină, a fost utilizat și un polimer, polietilenglicol, cu masă moleculară mică pentru a preveni aglomerarea particulelor, iar rețeaua de pori s-a format în jurul micelilor de surfactant, bromură de cetiltrimetilamoniu. Alături de dimensiunile mici ale nanoparticulelor de silice, acestea au prezentat o rețea de pori pseudo-hexagonală, suprafețe specifice mari ($867-1272 \text{ m}^2/\text{g}$), iar valorile volumului de pori cu diametrul mai mic de 10 nm au variat de la 0,52 la $0,90 \text{ cm}^3/\text{g}$. Nanoparticulele de silice coloidală funcționalizate au fost obținute prin co-condensare pentru a asigura o distribuție uniformă a grupărilor funcționale în pereții porilor și pe suprafața particulelor. Au fost obținute particule de dimensiuni de 50-60 nm prin funcționalizarea cu grupări mercaptopropil, metil sau vinil.

Considerând numărul mare de studii în care materialele de silice mezoporoasă sunt utilizate în domeniul medical, precum transportori de diferite substanțe biologice active, siguranța utilizării acestora în tratamentele umane este încă discutabilă, deoarece nu se cunoaște precis mecanismul de transformare al acestora după ce au pătruns în organism. În acest sens, în cadrul tezei de doctorat a fost efectuat un studiu privind comportamentul particulelor de silice pură și funcționalizată cu diferite grupări organice, aminopropil, mercaptopropil, metil, vinil și cianoetil, în soluții tampon de fosfat pH 7,4 care simulează citoplasma țesuturilor sănătoase și soluție tampon de fosfat pH 5,7 care simulează mediul celulelor tumorale. Contribuția originală a acestui studiu constă în urmărirea degradării particulelor de silice pură și funcționalizată în timp prin difracție de raze X la unghiuri mici prin care s-au evidențiat transformările rețelei de pori la diferite intervale de timp (3, 6, 16 și 24 h) în funcție de pH-ul mediului lichid în care s-a efectuat experimentul. Astfel, s-a demonstrat că particulele de silice coloidală prezintă un mecanism de degradare diferit în funcție de pH: în PBS pH 7,4 are loc o reorganizare a rețelei de pori la distanțe interplanare mai mari, în timp ce în PBS pH 5,7, nanoparticulele mezoporoase își pierd aproape complet porozitatea.

În cadrul tezei de doctorat au fost dezvoltate sisteme cu eliberare controlată de antibiotice pe bază de silice mezoporoasă, utilizând atât antibiotice ușor solubile în apă, doxiciclina și lomefloxacină, cât și un antibiotic greu solubil în apă, norfloxacină.

Pentru antibioticele ușor solubile în apă s-au ales drept transportori silice mezoporoasă de tip MCM-41 a cărei suprafață a fost modificată fie prin schimb ionic, pentru a introduce ioni de magneziu în matricea de silice, fie prin legare de grupări organice astfel fiind posibilă modelarea interacțiilor dintre transportor și moleculele de antibiotic. Materialele mezoporoase funcționalizate cu grupări organice au prezentat o rețea de pori hexagonală ordonată, indiferent dacă grupările funcționale au fost legate pe suprafața materialelor prin co-condensare sau prin metoda post-sinteză, și valori mai mici ale parametrilor texturali față de silicea pură.

Pentru antibioticul greu solubil în apă, norfloxacină, au fost utilizați transportori de silice mezoporoase cu rețea de pori hexagonală, SBA-15 și MCM-41 pure și funcționalizate, și cu rețea de pori cubică, nanoparticule de silice coloidală de tip MCM-48. Dintre metodele de îmbunătățire a solubilității în mediu apos, transformarea antibioticului în fază amorfă poate fi efectuată prin utilizarea de transportori mezoporoși, astfel se reduce energia de rețea ca urmare a adsorbției în porii suporturilor și este împiedicată cristalizarea prin constrângere nanometrică.

Dintre suporturile de tip silice cu rețea de pori hexagonală, sunt preferabile cele de tip MCM-41, deoarece acestea permit acomodarea moleculelor de antibiotic în pori sub formă amorfă datorită dimensiunii mai mici a porilor față de materialele de tip SBA-15, unde antibioticul a fost parțial cristalin.

Toate sistemele cu eliberare controlată de agenți antimicrobieni obținute în cadrul tezei de doctorat au fost preparate prin adsorbția moleculelor de agent terapeutic în interiorul porilor prin metoda impregnării prin umectare incipientă. Prin această metodă, medicamentele au fost adsorbite în stare amorfă, ilustrată în difracțiile de raze X la unghiuri mari.

Prezența agenților antimicrobieni în porii transportorilor a fost evidențiată prin spectroscopie FTIR, prin identificarea benzilor de vibrație caracteristice structurii fiecărui antibiotic, dar și prin analiza parametrilor texturali ai transportorilor după adsorbția antibioticelor în pori, unde s-a observat o scădere a acestor parametri.

Profilele de eliberare *in vitro* au fost determinate experimental în fluid biologic simulat cu pH 7,4, iar rezultatele experimentale au fost fitate cu diferite modele matematice, cu coeficienți de corelație mari ($R^2 > 0,90$), pentru a putea înțelege mecanismul de transport. Studiile privind eliberarea agenților terapeutici din mezoporii transportorilor de tip silice au fost evaluate pe baza parametrilor funcțiilor Higuchi, Weibull și ai modelului cu trei parametri, care descriu difuzia antibioticelor în pori, dar și interacția moleculelor de medicament cu grupările funcționale prezente pe suprafața suporturilor.

Cele două antibiotice solubile ce fac parte din clase diferite, doxiciclina din clasa tetraciclinelor și lomefloxacină din cea a fluorochinolonelor, au un comportament diferit la eliberare din porii materialelor de tip MCM-41. Din datele experimentale obținute în etapa "burst", pe baza ecuației Higuchi, s-a constatat că viteza de eliberare în această etapă este mare din suportul funcționalizat cu grupări sulfonice pentru ambele antibiotice. Fitarea rezultatelor experimentale cu modelul Weibull indică un transport fickian al moleculelor de doxiciclină pentru toate suporturile utilizate, ilustrat prin valorile parametrului b , în timp ce pentru lomefloxacină doar unele suporturi determină eliberarea prin difuzie fickiană, celelalte prezentând un transport complex. În cazul lomefloxacinei, care este amfion, s-au observat interacții mai puternice ale moleculelor de medicament cu grupările funcționale ale suporturilor de silice mezoporoasă, aceste interacții fiind descrise cu ajutorul modelului cu trei parametri. Factorul determinant în mecanismul de eliberare a moleculelor de lomefloxacină este valoarea pK_a a grupărilor funcționale grefate pe suprafața silicei.

Solubilizarea norfloxacină în mediul apos după adsorbția acesteia în porii transportorului mezoporos a fost mult mai rapidă față de cea a medicamentului ca atare. În primele 20 minute s-a solubilizat 78% din cantitatea totală de norfloxacină conținută în suportul tip MCM-48, peste 80% în cazul suporturilor tip MCM-41 și peste 90% în cazul suporturilor de tip SBA-15. Profilele de solubilizare au fost evaluate prin utilizarea modelului cu trei parametri. Constantele de viteză pentru solubilizarea norfloxacină din suporturile de tip SBA-15 sunt mai mari, cu un ordin de mărime, față de cele pentru suporturile de tip MCM-41, solubilitatea mai ridicată determinată de materialele tip SBA-15 fiind datorată diametrului mai mare al porilor acestor transportori. Nanoparticulele de silice coloidală de tip MCM-48 determină cea mai lentă solubilizare datorată porilor interconectați, viteza de difuzie fiind mai mică.

Adsorbția agenților antimicrobieni în porii transportorilor de tip silice mezostructurată sau coloidală nu a afectat proprietățile antimicrobiene ale agenților terapeutici din sistemele cu eliberare controlată dezvoltate în cadrul tezei de doctorat. Sistemele cu eliberare prelungită pe bază de doxiciclină, dar și cele pe bază de norfloxacină sau lomefloxacină au prezentat activitate antimicrobiană similară cu cea a antibioticului pur împotriva bacteriilor testate, *Klebsiella pneumoniae*, respectiv *Escherichia coli*. Rezultatele au fost similare atât la testările prin metoda disc difuzimetrică, cât și prin metoda diluțiilor succesive.

Utilizarea unor sisteme cu eliberare controlată pentru administrarea antibioticelor influențează eficiența acestora împotriva patogenilor bacterieni, dar și posibilitatea de a controla

modul sau locul de eliberare a agenților terapeutici, precum și reducerea dozelor de antibiotic administrate care ar putea ajuta la combatarea rezistenței antimicrobiene.

Principalele contribuții originale

Principalele contribuții originale ale acestei teze de doctorat sunt:

(i) S-a stabilit o metodă originală de sinteză a unor particule de silice mezoporoasă coloidală cu dimensiuni sub 100 nm, care pot fi utilizate drept transportori pentru substanțe biologice active, dimensiunea acestora fiind caracteristica esențială pentru a permite traversarea peretelui celular și un timp de staționare îndelungat în organism.

(ii) Nanoparticulele de silice coloidală au fost supuse unor teste de degradare *in vitro* în două fluide biologice simulate cu valori ale pH-ului diferite, acestea simulând citoplasma celulelor sănătoase (pH=7,4) și mediul celulelor tumorale (pH=5,7). Prin utilizarea celor două medii de degradare a fost studiată influența pH-ului asupra stabilității în timp a rețelei de pori a nanoparticulelor de silice coloidală pură și funcționalizată pe baza analizei de difracție de raze X la unghiuri mici.

(iii) Un alt element de originalitate al acestei teze de doctorat a fost dezvoltarea unor sisteme cu eliberare controlată de norfloxacină în scopul îmbunătățirii solubilității acesteia pentru tratamentul infecțiilor acute. S-a comparat folosirea drept transportor a silicei mezostructurate cu cea sub formă de nanoparticule coloidale.

(iv) De asemenea, s-a urmărit modularea profilelor de eliberare a unor antibiotice ușor solubile în apă. Cele două antibiotice utilizate în acest studiu au fost doxiciclina, din clasa tetraciclinelor, și lomefloxacină, din clasa fluorochinolonelor, ambele fiind utilizate în tratamentul infecțiilor tractului urinar, dar și altor tipuri de infecții. În acest scop, au fost modificate proprietățile suprafeței particulelor de silice mezostructurate, care au fost utilizate drept transportori și a fost determinată influența acestor modificări asupra profilelor de eliberare a agenților antimicrobieni.

(v) Prin explorarea naturii de amfion a lomefloxacinei s-au dezvoltat noi sisteme cu eliberare controlată de lomefloxacin pe bază de transportori de silice de tip MCM-41 pură și funcționalizată cu grupări organice sau cu nanoparticule de oxid de magneziu. S-a reușit modularea cineticii de eliberare prin determinarea modului de interacțiune a antibioticului cu transportorii de silice. Prin funcționalizarea suprafeței silicei cu grupări puternic bazice, la pH 7,4, interacțiile dintre lomefloxacină și transportor sunt puternice și astfel cinetica de eliberare este lentă atât în etapa "burst", cât și în cea de eliberare prelungită.

Perspective

- ✓ Continuarea studiilor de degradare a nanoparticulelor de silice coloidală funcționalizate prin metoda post-sinteză astfel încât acestea să aibă aceleași dimensiuni;
- ✓ Studiul comportamentului de degradare în fluide biologice simulate a particulelor de silice funcționalizate cu grupări organice cu proprietăți acide;
- ✓ Evaluarea biocompatibilității *in vitro* a nanoparticulelor de silice pură și funcționalizată și pe alte tipuri de linii celulare atât sănătoase, cât și tumorale;
- ✓ Dezvoltarea de noi sisteme cu eliberare controlată de agenți antimicrobieni cu activitate bactericidă superioară, care să fie active la bacterii rezistente.

Listă de publicații

1. **M. Deaconu**, A.-M. Brezoiu, R.-A. Mitran, I. Nicu, B. Manolescu, C. Matei, D. Berger, *Exploiting the zwitterionic properties of lomefloxacin to tailor its delivery from functionalized MCM-41 silica*, Microporous and Mesoporous Materials 305, **2020**, 110323. doi: 10.1016/j.micromeso.2020.110323
FI = 4,551

2. A.-M. Brezoiu, **M. Deaconu**, I. Nicu, E. Vasile, R.-A. Mitran, C. Matei, D. Berger, *Heteroatom modified MCM-41-silica carriers for Lomefloxacin delivery systems*, *Microporous and Mesoporous Materials* 275, **2019**, 214-222. doi: 10.1016/j.micromeso.2018.08.031
FI = 4,551
3. **M. Deaconu**, L. Pintilie, E. Vasile, R.A. Mitran, G. Pîrcălăbioru-Grădișteanu, C. Matei, M.C. Chifiriuc, D. Berger, *Norfloracin delivery systems based on MCM-type silica carriers designed for the treatment of severe infections*, *Materials Chemistry and Physics* 238, **2019**, 121886. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.121886
FI = 3,408
4. **M. Deaconu**, L. Pintilie, R.A. Mitran, C. Matei, D. Berger, *Solubility enhancement of poorly water-soluble norfloracin by encapsulation into SBA-15-type silica carriers*, *UPB Scientific Bulletin B* 80(4), **2018**, 3-16. ISSN: 1454-2331
5. **M. Deaconu**, I. Nicu, R. Tincu, A.-M. Brezoiu, R.-A. Mitran, E. Vasile, C. Matei, D. Berger, *Tailored doxycycline delivery from MCM-41-type silica carriers*, *Chemical Papers* 72, **2018**, 1869-1880. doi: 10.1007/s11696-018-0457-z
FI = 1,246
6. R.A. Mitran, **M. Deaconu**, C. Matei, D. Berger, *Mesoporous Silica as Carrier for Drug-Delivery Systems*, *Nanocarriers for Drug Delivery*, 2019, pp. 351-374 in *Nanocarriers for drug delivery: nanoscience and nanotechnology in drug delivery*; Edited by Shyam S. Mohapatra, Shivendu Ranjan, Nandita Dasgupta, Raghvendra Kumar Mishra, Sabu Thomas, Print version: *Nanocarriers for drug delivery*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier (2019); ISBN: 012814033X; ISBN: 9780128140338.

Lucrări prezentate la conferințe

1. **M. Deaconu**, D. Constantin, A.-M. Stanciuc, I. Nicu, C. Matei, D. Berger, *Mesoporous silica as materials for medicine. Colloidal versus mesostructured particles*, Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering – RICCCCE ediția a 21-a, 4-7 Septembrie 2019, Constanța, România;
2. **M. Deaconu**, D. Constantin, C. Goldmann, C. Matei, D. Berger, *Behaviour of small pristine and functionalized mesoporous silica nanoparticles in biological fluids* (prezentare orală), Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering – YRICCCCE ediția a 2-a, 3-5 Mai 2018, Budapesta, Ungaria; Volum de abstracte ISBN 978-963-9970-78-6, pag. 23;
3. **M. Deaconu**, R.A. Mitran, I. Nicu, C. Matei, D. Berger, *Influence of organic groups grafted on MCM-41-silica on the lomefloxacin release kinetics* (prezentare orală), Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering – RICCCCE ediția a 20-a, 6-9 Septembrie 2017, Poiana Brașov, România;
4. **M. Deaconu**, R. Tincu, A.M. Brezoiu, R.A. Mitran, I. Nicu, C. Matei, D. Berger, *Tailored doxycycline delivery from MCM-41-type materials* (poster), Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering RICCCCE ediția a 20-a, 6-9 Septembrie 2017, Poiana Brașov, România;
5. **M. Deaconu**, D. Constantin, C. Goldmann, R.A. Mitran, C. Matei, D. Berger, *Studies on the stability of mesoporous silica in biological fluids* (prezentare orală), Priorities of Chemistry for a Sustainable Development – PRIOCHEM ediția a 13-a, 25-27 Octombrie 2017, București, România; Volum de abstracte ISSN 2285-8334, pag. 12;
6. **M. Deaconu**, L. Pintilie, R.A. Mitran, C. Matei, D. Berger, *Studies on the solubility enhancement of norfloracin by encapsulation in pristine and functionalized mesoporous silica* (prezentare orală), International Conference of Physical Chemistry – ROMPHYSICHEM ediția a 16-a, 21-23 Septembrie 2016, Galați, România; Volum de rezumate ISSN 2286-1327, pag. 89;

7. **M. Deaconu**, L. Pintilie, R.A. Mitran, C. Matei, D. Berger, *Improved delivery of a poorly soluble quinolone from mesoporous silica* (prezentare orală), Priorities of Chemistry for a Sustainable Development – PRIOCHEM ediția a 12-a, 27-28 Octombrie 2016, București, România; Volum de rezumate ISSN 2285-8334; Premiul II.

Bibliografie

- ¹ C. Kresge, M. Leonowicz, W. Roth, J. Vartuli, J. Beck, *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism*, Nature 359, 1992, 710-712.
- ² M. Vallet-Regi, A. Ramila, R. Del Real, J. Perez-Pariente, *A new property of MCM-41: drug delivery system*, Chem. Mater. 13, 2001, 308-311.
- ³ **M. Deaconu**, I. Nicu, R. Tincu, A.-B. Brezoiu, R.-A. Mitran, E. Vasile, C. Matei, D. Berger, *Tailored doxycycline delivery from MCM-41-type silica carriers*, Chem. Pap. 72, 2018, 1869-1880.
- ⁴ I. Chopra, M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 2001, 232-260.
- ⁵ **M. Deaconu**, A.-B. Brezoiu, R.-A. Mitran, I. Nicu, B. Manolescu, C. Matei, D. Berger, *Exploiting the zwitterionic properties of lomefloxacin to tailor its delivery from functionalized MCM-41 silica*, Microporous Mesoporous Mater. 305, 2020, 110323.
- ⁶ A.-B. Brezoiu, **M. Deaconu**, I. Nicu, E. Vasile, R.-A. Mitran, C. Matei, D. Berger, *Heteroatom modified MCM-41-silica carriers for Lomefloxacin delivery systems*, Microporous Mesoporous Mater. 275, 2019, 214-222.
- ⁷ V.M. Nurchi, G. Crisponi, J.I. Lachowicz, M.A. Zaroddu, M. Peana, S. Medici, D. Veclani, M. Tolazzi, A. Melchior, *Fluoroquinolones: A micro-species equilibrium in the protonation of amphoteric compounds*, Eur. J. Pharm. Sci. 93, 2016, 380-391.
- ⁸ L. Zeng, L. An, X. Wu, *Modeling drug-carrier interaction in the drug release from nanocarriers*, J. Drug Deliv. 2011, Article ID 370308.
- ⁹ M. Ignacio, M.V. Chubynsky, G.W. Slater, *Interpreting the Weibull fitting parameters for diffusion-controlled release data*, Physica A 486, 2017, 486-496.
- ¹⁰ J. Siepmann, N.A. Peppas, *Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse*, Int. J. Pharm. 418, 2011, 6-12.
- ¹¹ B. Holmes, R.N. Brogden, D.M. Richards, *Norfloxacin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use*, Drugs 30, 1985, 482-513.
- ¹² L. Chierentin, H. R. Nunes Salgado, *Review of properties and analytical methods for the determination of norfloxacin*, Crit. Rev. Anal. Chem. 46, 2016, 22-39.
- ¹³ C.-L. Zhang, Y. Wang, *Aqueous solubilities for ofloxacin, norfloxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, and pipemidic acid from (293.15 to 323.15) K*, J. Chem. Eng. Data 53, 2008, 1295-1297.
- ¹⁴ L. Pintilie, C. Negut, C. Oniscu, M. T. Caproiu, M. Nechifor, L. Iancu, C. Ghiciuc, R. Ursu, *Synthesis and antibacterial activity of some novel quinolones*, Rom. Biotechnol. Lett. 14, 2009, 4756-4767.
- ¹⁵ **M. Deaconu**, L. Pintilie, R.A. Mitran, C. Matei, D. Berger, *Solubility enhancement of poorly water-soluble norfloxacin by encapsulation into SBA-15-type silica carriers*, UPB Sci. Bull., Series B 80, 2018, 3-16.
- ¹⁶ S. Sahoo, C. K. Chakraborti, S. C. Mishra, U. N. Nanda, S. Naik, *FTIR and XRD investigations of some fluoroquinolones*, Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 3, 2011, 165-170.
- ¹⁷ M. Ye, S. Kim, K. Park, *Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles*, J. Control. Release 146, 2010, 241-260.
- ¹⁸ **M. Deaconu**, L. Pintilie, E. Vasile, R.A. Mitran, G. Grădișteanu-Pircălăbioru, C. Matei, M.C. Chifiriuc, D. Berger, *Norfloxacin delivery systems based on MCM-type silica carriers designed for the treatment of severe infections*, Mater. Chem. Phys 238, 2019, 121886.
- ¹⁹ L. Huang, J. Chen, X. Li, H. Liu, J. Li, T. Ren, Y. Yang, S. Zhong, *Polymethacrylic acid encapsulated TiO₂ nanotubes for sustained drug release and enhanced antibacterial activities*, New J. Chem. 43, 2019, 1827-1837.
- ²⁰ J. Fan, J. Lei, C. Yu, B. Tu, D. Zhao, *Hard-templating synthesis of a novel rod-like nanoporous calcium phosphate bioceramics and their capacity as antibiotic carriers*, Mater. Chem. Phys. 103, 2007, 489-493.