

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**STUDII PRIVIND SINTEZA ȘI
CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A
UNUI COMPOZIT**

**HIDROXIAPATITĂ –CIPROFLOXACINĂ CU
APLICAȚII IN TERAPIA OSOASĂ**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

PROF. UNIV. DR. JOHNY NEAMȚU

STUDENT-DOCTORAND:

Adriana Mocanu

**CRAIOVA
2015**

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. MANAGEMENTUL INFECȚIILOR OSOASE. NECESITATEA CEDĂRII LOCALE A MEDICAMENTELOR LA NIVELUL ȚESUTULUI OSOS

1.1 Particularități ale infecțiilor osoase pe materiale de osteosinteză

2. MATERIALE UTILIZATE LA CEDAREA LOCALĂ A ANTIBIOTICELOR

3. STRUCTURA GENERALĂ ȘI PROPRIETĂȚILE HIDROXIAPATITEI DE CALCIU

4. METODE DE SINTEZĂ A HIDROXIAPATITEI

CONTRIBUȚII ORIGINALE

5. SINTEZA HIDROXIAPATITEI PRIN METODA PRECIPITĂRII

5.1. Materiale și metode de sinteză chimică

5.2. Metode de caracterizare a pulberii HA sintetizate

5.3. Rezultate și discuții

6. SINTEZA CHIMICĂ A COMPOZITULUI HIDROXIAPATITĂ-CIPROFLOXACINĂ (HA-CPX)

6.1 Sinteza chimică a compozitului HA-CPX (Metoda I)

Mod de lucru

6.2 Sinteza compusului HA-CPX (Metoda II)

6.3 Sinteza compusului HA-CPX (Metoda III)

6.4 Dozarea ciprofloxacinei prin cromatografie HPLC

6.5 Rezultate și discuții privind sinteza compusului HA-ciprofloxacină

7. OPTIMIZAREA SINTEZEI PRIN STUDII DE DESIGN EXPERIMENTAL

7.1 Screeningul parametrilor experimentali

8. CEDAREA CIPROFLOXACINEI DIN COMPRIMATE

8.1 Metode de obținere și caracterizare a comprimatelor

8.2 Depunerea de filme de hidroxilapatită și HA-CPX pe suporturi de titan

8.3 Metoda de cedare a ciprofloxacinei in vitro

8.4 Rezultate și discuții

9. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE

9.1 Materiale și metoda

9.2 Rezultate și discuții

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

CONSIDERAȚII GENERALE

În ultima jumătate de secol, progresul în dezvoltarea de noi biomateriale și a tehnicilor chirurgicale de implantare a determinat o creștere explozivă a utilizării acestora sub forma unor implanturi sau a unor dispozitive medicale cu rol în refacerea integrității țesutului osos [1-3].

Componentele mobile ale acestor proteze generează, însă, o serie de particule de uzură, "debriuri", care stimulează sistemul local monocito-fagocitar. Aceste celule, în încercarea de a elimina debriurile de uzură, eliberează o serie de mediatori pro-inflamatori și enzime proteolitice formând un granulom peri-implant și provocând o serie de procese biochimice în cascadă ce duc la resorbția osoasă peri-implant sau osteoliză [4].

Pe lângă aceste complicații, care se încadrează în așa numitele pierderi aseptice, eliminarea implantului poate să intervină și ca urmare a unor complicații datorate unor infecții, care deși apar cu o probabilitate mai mică se caracterizează printr-o morbiditate ridicată și prin costuri de spitalizare ridicate[5,6].

În condițiile în care osul este un organ slab perfuzat, tratamentul cu antibiotice pe cale sistemică este de lungă durată, această terapie fiind adesea insuficientă pentru atingerea unei concentrații locale ridicate, necesară eradicării infecțiilor osoase. Pe de altă parte acest tratament este adesea însoțit de efecte toxice, în timp ce obținerea unor concentrații relative scăzute în zona infectată crește riscul dezvoltării rezistenței bacteriene la antibiotice.

O soluție aflată în atenția multor colective de cercetare din domeniul biomaterialelor, este cedarea locală a antibioticului prin includerea la suprafața implantului sau prin obținerea unor structuri cu cedare locală, care să fie implantate în defectele osoase ce rezultă în urma infecțiilor[7].

Scopul acestui studiu este sinteza unui compozit de tip hidroxiapatită-antibiotic care ar permite realizarea unor alogrefe osoase, cu aplicații în tratamentul osteomielitei.

În același timp acest compozit ar putea fi depus și pe suprafața metalică a componentelor protezelor ortopedice folosite în artroplastia totală de șold și de genunchi.

Dintre antibioticele folosite, fluorochinolonele sunt utilizate cu succes în tratamentul infecțiilor osoase. Dintre acestea am preferat să utilizăm ciprofloxacina, ea fiind adesea utilizată datorită activității antibactericide împotriva majorității agenților patogeni specifici acestor infecții, dar și datorită concentrației minime inhibitoare (MIC) foarte mici (0.25-2ug/ml). Ea penetrează peretele bacterian și inhibă o serie de enzime implicate în procesul de replicare al ADN-ului bacterian.

OBIECTIVE PROPUSE

Pentru sinteza acestui compozit am preferat să utilizăm metoda precipitării chimice, principalul avantaj al metodei fiind probabilitatea mică de contaminare și costurile relative mici.

Caracterizarea fizico chimică a acestui compozit s-a realizat prin difracție de raze X (XRD), metode spectrofotometrice, analiză termică diferențială, metode cromatografice, în timp ce analiza morfologică s-a obținut prin folosirea unor tehnici de microscopie SEM și AFM.

Pentru depunerea compozitului pe suprafața metalică a protezelor, am ales o metodă folosită frecvent în ultimul timp, întâlnită în literatură sub acronimul MAPLE (Evaporarea Laser Pulsată Asistată de o Matrice).

Pentru a determina dacă includerea antibioticului în compozitul ce are la bază hidroxiapatită, modifică activitatea antimicrobiană, am realizat studii pe o serie de germeni bacterieni, prezenți frecvent în infecțiile osoase: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

În același timp am testat și cedarea *in vitro* a ciprofloxacinii din alogrefe obținute prin comprimarea compozitului sintetizat și din filmele depuse prin MAPLE, pe structuri metalice din titan.

Optimizarea procesului de sinteză chimică și determinarea condițiilor experimentale, care să ducă la includerea unei cantități maxime de antibiotic în structura compozitului, s-a realizat prin folosirea unor softuri de design experimental.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. MANAGEMENTUL INFECȚIILOR OSOASE. NECESITATEA CEDĂRII LOCALE A MEDICAMENTELOR LA NIVELUL ȚESUTULUI OSOS

Capitolul 1 prezintă etiologia infecțiilor osoase asociate artroplastilor articulatilor. Sunt prezentate principalele metode de tratament al infecțiilor osoase, caracteristice artroplastilor totale de șold, metode ce necesită de regulă îndepărtarea componentelor implantului, îndepărtarea chirurgicală a osului afectat, urmată de un tratament antimicrobian de lungă durată. Se insistă asupra necesității cedării locale a antibioticului la interfața implant-os, fiind astfel prezentate schemele actuale de tratament. În același timp sunt prezentate și tendințele actuale de studiu privind cedarea locală a antibioticului prin includerea lui la suprafața protezelor ortopedice, prin intermediul filmelor polimerice și al materialelor bioceramice (hidroxiapatita, biosticle) depuse pe componentele metalice ale protezelor. Tot în acest capitol sunt prezentate particularități specifice osteomielitei și tratamentul acestor infecții osoase prin folosirea terapiei locale.

CAPITOLUL 2. MATERIALE UTILIZATE LA CEDAREA LOCALĂ A ANTIBIOTICELOR

Capitolul 2 prezintă principalele biomateriale utilizate la cedarea locală a antibioticelor. Astfel chiar dacă încă nu a fost descoperit sistemul ideal pentru cedarea locală a antibioticelor la nivelul osului, există câteva materiale aflate în atenția multor colective de cercetare în domeniu (hidroxiapatita, biosticle).

CAPITOLUL 3. STRUCTURA GENERALĂ ȘI PROPRIETĂȚILE HIDROXIAPATITEI DE CALCIU

Capitolul 3 prezintă un studiu bibliografic al literaturii de specialitate în care sunt descrise proprietățile hidroxiapatitei de calciu. Este descrisă structura cristalografică care permite substituția multor substituenți în rețeaua cristalină, fără să se modifice proprietățile de bioactivitate ale acestui compus.

CAPITOLUL 4. METODE DE SINTEZĂ A HIDROXIAPATITEI

Capitolul 4 prezintă principalele metode de obținere a acestui compus prin reacții de sinteză pe cale chimică umedă, reacții specifice pe cale chimică uscată, sinteză în fază gazoasă și diverse tehnici noi insistând asupra avantajelor și dezavantajelor fiecărei metode. Astfel, sinteza folosind metoda precipitării chimice aleasă și de noi în cadrul studiului experimental, este cea mai des utilizată tehnică de sinteză a hidroxiapatitei, principalul avantaj caracteristic acestei metode fiind probabilitatea mică de contaminare și costurile relative mici. De asemenea se insistă asupra importanței controlului factorilor experimentali, o ușoară modificare a condițiilor de reacție putând afecta semnificativ proprietățile compușilor sintetizați.

CAPITOLUL 5. SINTEZA HIDROXIAPATITEI PRIN METODA PRECIPITĂRII

Capitolul 5 descrie sinteza și caracterizarea hidroxiapatitei folosind metoda precipitării chimice, metoda lui Hayek și Newesely ce constă în reacția dintre nitratul de calciu și fosfatul de amoniu, cu adăugarea de hidroxid de amoniu. Folosind spectrofotometria FTIR, difracția de raze X, DLS, analiza termică diferențială este prezentată influența unor parametrii experimentali asupra structurii chimice, gradului de cristalinitate, și a mărimii particulelor pulberii sintetizate.

Principalele concluzii ale acestui studiu sunt:

-spectrele FTIR conțin toate benzile caracteristice modurilor de vibrație specifice hidroxiapatitei. De asemenea se observă și o bandă largă, ce apare în spectrul pulberii și care este datorată apei ce nu a fost complet eliminată din precipitat. Chiar dacă s-a lucrat în atmosferă de gaz inert spectrul pulberii mai conține și benzi specifice carbonaților. Aceste benzi apar în spectru datorită unor urme de carbonați ce co-precipită în timpul sintezei chimice.

-spectrul de difracție XRD al pulberii obținute arată foarte bine caracteristicile de difracție al HA cristaline. Dacă la temperatura de 90 C liniile caracteristice

HA din baza de date se suprapun peste cele ale spectrului achiziționat, la o temperatură de 35 C spectrul XRD nu mai corespunde cu cel al HA din baza JCPDS, pulberea astfel obținută fiind un fosfat de calciu numit monetita, CaHPO_4 . De asemenea pulberea HA obținută de noi este și stoichiometrică ($\text{Ca/P}=1.67$), sinteza unei HA nestoichiometrice ducând la prezența și a unor alte faze cum ar fi CaO (dacă Ca/P depășește 1.67) sau tricalcium phosphate, TCP (dacă Ca/P este sub 1.67). Dimensiunea particulelor de HA sintetizate prin precipitare chimică este de ordinul nanometrilor, particulele obținute sunt aglomerate și caracterizate printr-un grad de polidispersivitate ridicat. Astfel prin creșterea temperaturii, în intervalul 35-90C, dimensiunea particulelor măsurate prin DLS crește de la 1700nm la o valoare medie de 2396 nm; aceste rezultate sunt în acord și cu datele din literatură, care arată că dimensiunea particulelor și morfologia lor depind foarte mult de temperatura la care are loc reacția. Prezența particulelor de dimensiune micrometrică se datorează faptului că acestea sunt aglomerate, imaginile de microscopie SEM punând în evidență particule cu dimensiuni nanometrice.

CAPITOLUL 6. SINTEZA CHIMICĂ A COMPOZITULUI HIDROXIAPATITĂ-CIPROFLOXACINĂ (HA-CP)

În **Capitolul 6** se prezintă rezultate privind sinteza unui compozit de tip hidroxiapatită-ciprofloxacină. Pentru sinteza acestui compus s-au folosit trei metode. *Metoda I* de sinteză este identică cu cea folosită de noi în sinteza hidroxiapatitei, având ca reactanți nitratul de calciu și fosfatul de amoniu. Imediat după adăugarea fosfatului de amoniu s-a adăugat soluția de ciprofloxacină al cărei pH a fost ajustat la 11 cu NH_4OH pentru a facilita solubilizarea acesteia. Condițiile experimentale (valoarea pH-ului, temperatura de reacție, debitul de adăugare al reactanților) au fost alese ținând cont că s-a dorit sinteza unui compus cristalin, lipsit de alte impurități și ținând cont de rezultatele obținute în sinteza HA. *Metoda II* de sinteză are la bază cealaltă metodă de obținere a HA prin precipitare chimică, în care se pleacă de la $\text{Ca}(\text{OH})_2$ și H_3PO_4 . Ciprofloxacina a fost adăugată sub formă de pulbere imediat după adiția acidului ortofosforic.

Metoda III de sinteză are ca reactanți $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ al căror pH a fost inițial ajustat la 10 cu o soluție de amoniac concentrat. Ciprofloxacina a fost adăugată imediat după introducerea fosfatului de amoniu în sinteză, cu un debit de 0,5 mL/min. Timpul de reacție a fost de 5 ore, perioadă în care s-au menținut constante temperatura de reacție și viteza de agitare. Caracterizarea compușilor obținuți prin cele trei metode s-a realizat prin spectrofotometrie FTIR, difracție XRD, iar dozarea ciprofloxacinei din compus s-a realizat prin cromatografie HPLC.

Concluziile acestui studiu sunt:

- benzile IR caracteristice hidroxiapatitei apar în structura compusului HA-ciprofloxacină cu frecvențe neschimbate față de spectrul hidroxiapatitei pure, sugerând că gruparea fosfat acționează în formarea complexului ca un contraion. La câteva zile de la sinteză, în supernatant, s-a constatat apariția unui compus cu structură cristalină aciculară. În urma analizelor FT-IR s-au observat benzi caracteristice unui complex format între ionii de Ca^{2+} și ciprofloxacină.

-din spectru FT-IR se constată absența benzilor IR caracteristice grupării PO_4^{3-} (caracteristice pentru hidroxiapatită), indicând faptul că această grupare nu intră în structura complexului, deci reacția care a avut loc este o reacție concurentă, cel mai probabil între $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ și ciprofloxacina.

-cantitatea de complex obținută în această reacție secundară nedorită este destul de însemnată, ciprofloxacina solubilizată la pH bazic legându-se preferențial de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

- analiza HPLC a confirmat gradul de încorporare scăzut al ciprofloxacinei în compozitul HA-ciprofloxacina, de abia 2.045% .

- în spectrul FTIR al compusului sintetizat prin metoda II apare un pic caracteristic grupării HPO_4^{2-} la 868 cm^{-1} , grupare pe care literatura de specialitate o atribuie formării ca fază secundară a hidroxiapatitei Ca-deficitară, adică HA nestoichiometrică.

-analizând spectrele de difracție de raze X, pentru compușii de tip hidroxiapatită-ciprofloxacina obținuți prin metoda III, s-a constatat că acestea prezintă caracteristicile unei hidroxiapatite pure.

După efectuarea determinărilor cantitative de ciprofloxacina din compușii obținuți în Metoda II și respectiv Metoda III, s-a constatat că din punct de vedere al cantității de ciprofloxacina legată la hidroxiapatită, este mai eficientă Metoda III, unde procentul este de 18,13% comparativ cu 12,55 %, cât s-a obținut pentru Metoda II.

De asemenea când se pornește de la $\text{Ca}(\text{OH})_2$, trebuie ținut cont ca acesta are o solubilitate scăzută în apă și la adăugarea H_3PO_4 , trebuie verificat riguros pH-ul mediului de reacție deoarece are loc scăderea bruscă a acestuia, cu apariția unor faze secundare ca hidroxiapatita Ca-deficitară.

Ca urmare a acestor constatări, s-a considerat că dintre cele trei metode prezentate, cea mai eficientă este cea în care s-a pornit de la $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ și $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, iar ciprofloxacina a fost adăugată sub formă de pulbere în sinteză (Metoda III).

CAPITOLUL 7. OPTIMIZAREA SINTEZEI PRIN STUDII DE DESIGN EXPERIMENTAL

Studiile efectuate de noi în **capitolul 7**, prezintă influența diferiților parametri de sinteză asupra caracteristicilor pulberii de hidroxiapatită-ciprofloxacina (cantitatea de medicament adăugată în timpul procesului, viteza de amestecare și debitul de adăugare a fosfatului de amoniu) asupra concentrației de ciprofloxacina din compusul pe care aceasta îl formează cu hidroxiapatita. Această analiză s-a realizat cu programul MODDE 9.1. de Design Experimental. Rezultatele screeningului de design experimental, arată că factorii importanți sunt cantitatea de medicament adăugată în sinteză și debitul de adăugare a fosfatului de amoniu în sinteză, precum și interacțiunea dintre acești doi factori.

CAPITOLUL 8 , CEDAREA CIPROFLOXACINEI DIN COMPRIMATE

Capitolul 8 prezintă studii de cedare a ciprofloxacinii din comprimate și din filme depuse pe structuri din titan. Dozarea ciprofloxacinii din mediul de dizolvare s-a realizat prin HPLC. Pentru cinetica procesului de cedare a ciprofloxacinii din tabletele de compozit au fost aplicate două modele de studiu, modelul Higuchi și modelul Ritger-Peppas.

În cazul cedării ciprofloxacinii din comprimate am constatat:

- pe parcursul primelor 7 zile de la pornirea studiului, ciprofloxacina este cedată din comprimate (care conțin 20% ciprofloxacină) în proporție de 46 %. Cantitatea de antibiotic cedată crește brusc, fiind cedată în procent de 94% până la ziua a 14-a . Restul cantității este cedată lent până în ziua a 30-a.

- în ceea ce privește cinetica procesului de cedare a ciprofloxacinii se constată că un coeficient de corelare mai mare a fost obținut în situația folosirii modelului Higuchi, evidențiind astfel că difuzia reprezintă procesul principal prin care este cedat medicamentul în mediul de eliberare.

În cazul cedării ciprofloxacinii din filmele depuse pe substraturi din titan, obținute prin tehnica de depunere MAPLE (Evaporarea Laser Pulsată Asistată de o Matrice), am constatat:

- procentul de ciprofloxacină eliberată în etapa inițială (primele 6 zile) este mai mare și apoi crește mai lent, așa cum a fost observat în toate probele analizate. Datorită cantității mai mici de medicament inclusă în probe, cedarea în acest caz se desfășoară doar pe durata a maxim 14 zile. Procesul este datorat desorbției moleculelor de ciprofloxacină care se află pe suprafața HA ce determină o eliberare inițială mai mare de medicament, difuzia celor din interiorul HA realizându-se mai lent.

Cinetica de eliberare care interpoalează cel mai bine rezultatele experimentale a fost obținută prin folosirea modelului Ritger-Peppas cu ecuația $C = Kt^{0.6}$. Acest lucru arată că pe lângă procesul principal de eliberare a medicamentului prin difuzie, mai au loc concomitent și alte procese care ajută la cedarea medicamentului: eroziune de suprafață și desorbție, caracteristice de altfel filmelor foarte subțiri cu grosime nanometrică.

CAPITOLUL 9 , DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE

Capitolul 9 cuprinde rezultate experimentale privind etapa finală a studiului experimental, care a urmărit determinarea efectului antibacterian pentru mai multe probe pe bază de hidroxilapatită, compusul HA-ciprofloxacină și ciprofloxacină. Am testat astfel efectul antibacterian al probelor în stare solidă sub formă de comprimate, sub formă de depuneri ale compozitului HA-ciprofloxacină pe suprafața unor structuri din titan dar și sub formă de microsuspensii. Aceste studii au urmărit dacă compusul sintetizat își păstrează potențialul terapeutic în toate aceste forme farmaceutice. Pentru a stabili dacă includerea ciprofloxacinii în structura hidroxilapatitei modifică activitatea antibacteriană, am realizat și un amestec mecanic pe bază de hidroxilapatită și ciprofloxacină.

Concluziile acestor studii experimentale sunt:

-depunerile de HA pe substrat de titan sunt caracterizate printr-un pronunțat efect antibacterian. Aceasta este în concordanță cu datele din literatură, în care se arată ca nanoparticulele de HA au un caracter antibacterian mai pronunțat asupra speciei *Escherichia coli*, explicat prin grosimea relativ subțire a peretelui celular, caracteristic acestei specii bacteriene, dar și prin structura chimică caracteristică.

Includerea prin sinteză chimică a ciprofloxacinei în structura HA, și depunerea chiar și în cantitate relativ mică (aproximativ 1 microgram), pe suprafața substratului de titan, crește activitatea antibacteriană.

-prin legarea ciprofloxacinei de hidroxiapatită activitatea antibacteriană este modificată nesemnificativ (diametrul zonei de inhibiție scade prin legare de HA cu mai puțin de 2%). Acest aspect este susținut și de faptul că în studiile de cedare *in vitro*, cantitatea cedată în 24 de ore (cât a durat incubarea probelor) este sub 10% ceea ce înseamnă că cea mai mare parte a moleculelor de ciprofloxacina se găsesc în structura HA.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Santavirta S, Gristina A, Konttinen YT. *Cemented versus cementless hip arthroplasty: a review of prosthetic biocompatibility*. **Acta Orthop. Scand** 1992; **63:225–232**.
2. Head WC, Bauk DJ, Emerson RH. *Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty*. **Clin. Orthop. Rel. Res** 1995; **311:85–90**.
3. Stefan Landgraeber, Marcus Jäger, Joshua J. Jacobs, Nadim James Hallab *The Pathology of Orthopedic Implant Failure Is Mediated by Innate Immune System Cytokines Mediators of Inflammation Volume 2014 (2014), Article ID 185150, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/185150>*
4. Ke Ren, Anand Dusad, Yijia Zhang, Dong Wang *Therapeutic intervention for wear debris-induced aseptic implant loosening* **Acta Pharmaceutica Sinica B Volume 3, Issue 2, April 2013, Pages 76–85**
5. K.J. Saleh, I. Thongtrangan, E.M. Schwarz **Osteolysis: medical and surgical approaches** *Clin Orthop Relat Res*, 427 (2004), pp. 138–147
6. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sorgel F. *Penetration of Antibacterials into Bone*. **Clin Pharmacokinet.** 2009; **48(2):89–124**.
7. Campoccia D, Montanaro L, Speziale P, Arciola CR. *Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use*. **Biomaterials.** 2010; **31(25):6363–77**.