

**MINISTERUL EDUCAȚIEI NAȚIONALE  
UNIVERSITATEA VALAHIA DIN TÂRGOVIȘTE  
FACULTATEA DE INGINERIA MATERIALELOR  
ȘI MECANICĂ  
Domeniul: INGINERIA MATERIALELOR**

**REZUMAT**

**Teză de doctorat**

**STICLE FOSFOCALCICE CU  
PROPRIETĂȚI SPECIALE**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:**

**Prof. univ. dr. Honoris Causa Nicolae ANGELESCU**

**DOCTORAND:**

**Asist. univ. ing. Daniela ȘTEFAN  
(AVRAM)**

**TÂRGOVIȘTE  
2017**

## Cuprinsul rezumatului

1. Cuprinsul tezei de doctorat .....	3
2. Cuvinte cheie .....	5
3. Introducere.....	6
4. Scopul și obiectivele tezei de doctorat .....	7
5. Prezentarea structurii tezei.....	8
6. Cercetări experimentale proprii.....	9
6.1 Tehnici de investigație folosite în studiu .....	9
6.2 Sinteza sticlelor fosfocalcice .....	10
6.3 Obținerea lichidului uman simulat tip Kokubo – Takadama .....	16
6.4 Analiza termică a sticlelor fosfocalcice sintetizate prin metoda sol – gel .....	16
6.5 Studiul prin analiză dimensională și de distribuție granulometrică al sticlelor sintetizate prin tehnica sol-gel .....	18
6.6 Determinarea densității relative a sticlelor sintetizate .....	19
6.7 Studiului determinării compoziției chimice elementare a sticlelor fosfocalcice prin spectroscopie cu fluorescență de raze X (WD-XRF) .....	20
6.8 Studiul bioactivității sticlelor fosfocalcice prin analiza de difracție de raze X (XRD) .....	21
6.9 Studiului bioactivității sticlelor fosfocalcice prin analiza de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) .....	24
6.10 Studiul morfologic al suprafeței sticlelor fosfocalcice sintetizate prin tehnica sol-gel .....	24
6.11 Evaluarea activității antibacteriene a sticlelor dopate cu argint sau cupru prin examen microbiologic .....	25
7. Concluzii și contribuții proprii .....	27
8. Perspective de cercetare .....	28
9. Bibliografie selectivă .....	29
10. Lista lucrărilor publicate în domeniul tezei de doctorat .....	30

În acest rezumat al tezei de doctorat:

\* cuprinsul respectă paginarea din teză;

\*\* figurile și tabelele selecționate pastrează numerotarea din teză;

\*\*\* bibliografia indicată este selectivă.

## 1. Cuprinsul tezei de doctorat

Lista tabelelor .....	iv
Lista figurilor .....	v

### STADIUL CUNOAȘTERII

1. INTRODUCERE .....	1
1.1 Scurtă incursiune în istoria sticlei .....	2
1.2 Scopul și obiectivele tezei de doctorat .....	5
1.3 Descrierea capitolelor tezei.....	7
1.4 Țesutul osos. Modelarea, reconstrucția și protezarea osoasă .....	8
1.4.1 Anatomia și structura oaselor lungi .....	9
1.4.2 Modelarea, reconstrucția și protezarea osoasă .....	11
2. BIOMATERIALELE – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	15
2.1 Definirea biomaterialelor .....	15
2.2 Clasificarea biomaterialelor .....	16
2.3 Aplicațiile clinice ale biomaterialelor .....	18
2.4 Fosfații de calciu – materiale biocompatibile .....	21
2.4.1 Clasificarea materialelor fosfocalcice bioactive .....	22
2.4.2 Bioactivitatea materialelor fosfocalcice între bioconducție și bioinducție ...	25
2.4.2.1 Hidroxiapatita .....	26
2.4.2.2 Fosfații de calciu .....	28
2.4.2.3. Ceramicile, vitroceramicile și compozitele de fosfat de calciu.....	30
2.4.2.4 Cimenturile și acoperirile pe bază de fosfat de calciu .....	31
3. STICLELE FOSFOCALCICE .....	33
3.1 Caracteristici structurale și compoziționale ale sticlelor biocompatibile .....	34
3.1.1 Structura sticlelor fosfocalcice .....	34
3.1.2 Influența compoziției chimice asupra bioactivității sticlelor .....	37
3.2 Sinteza sticlelor biocompatibile.....	41
3.2.1 Metoda topirii amestecurilor oxidice componente .....	41
3.2.1.1 Compoziții de sticle fosfocalcice ce se pot obține prin topire .....	45
3.2.2 Metoda de sinteză sol – gel.....	47
3.2.3 Alte metode de sinteză ale sticlelor biocompatibile .....	51
3.2.4 Metode noi de sinteză – versus metode tradiționale .....	53
3.3 Bioperformața sticlelor fosfocalcice obținute prin metoda sol – gel .....	55
3.3.1 Bioperformața proces dinamic .....	56

3.3.2 Bioactivitatea sticlelor fosfocalcice - mecanismul formării hidroxiapatitei pe suprafața biosticlelor .....	60
3.3.3 Factorii care influențează bioactivitatea și biodegradarea sticlelor fosfocalcice .....	63
3.4 Sticle fosfocalcice cu proprietăți antimicrobiene .....	66
3.4.1 Infecțiile nosocomiale și microorganismele patogene implicate ..	67
3.4.2 Capacitatea antimicrobiană a argintului și a cuprului .....	70
3.5 Soluții utilizate pentru testarea in vitro a bioactivității materialelor fosfocalcice.....	75
3.5.1 Etapele obținerii lichidului uman simulant tip Kokubo .....	78
 <b>CONTRIBUȚII PROPRII – PARTEA EXPERIMENTALĂ</b>	
4. TEHNICI DE INVESTIGAȚIE FOLOSITE ÎN STUDIU .....	80
4.1. Spectroscopia cu fluorescență de raze X (WD-XRF).....	81
4.2. Difrakția cu raze X (XRD).....	81
4.3 Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).....	82
4.4. Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	83
4.5 Analiza termogravimetrică (TGA) cuplată cu calorimetria diferențială cu baleiaj (DSC).....	83
4.6 Analiza dimensională și distribuția granulometrică prin difuzia dinamică a luminii laser pulsate (DLS) .....	84
4.7 Determinarea densității relative a sticlelor .....	84
4.8 Tehnici microbiologice utilizate în studiu .....	85
5. SINTEZA STICLELOR FOSFOCALCICE .....	89
5.1 Sinteza sticlelor fosfocalcice prin metoda sol – gel .....	89
5.1.1 Descrierea procedurii experimentale de sinteză a sticlelor fosfocalcice din sistemul ternar $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ .....	90
5.1.2 Descrierea procedurii experimentale de sinteză a sticlelor fosfocalcice din sistemul cuaternar $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ .....	100
5.1.3 Descrierea procedurii experimentale de sinteză a sticlelor fosfocalcice din sistemul cuaternar $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Cu}_2\text{O}$ .....	105
5.2 Sinteza sticlelor fosfocalcice prin topirea amestecurilor de precursori oxidici folosiți ca materii prime .....	108
5.3 Obținerea lichidului uman simulant tip Kokubo – Takadama .....	113
6. INVESTIGAȚII ASUPRA STICLELOR FOSFOCALCICE. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....	115
6.1 Analiza termică a sticlelor sintetizate prin metoda sol – gel .....	115
6.2 Analiza dimensională și distribuția granulometrică a sticlelor fosfocalcice sintetizate prin metoda sol-gel prin difuzia dinamică a luminii laser pulsate (DLS)..	127
6.3 Determinarea densității sticlelor fosfocalcice .....	130
6.3.1 Determinarea densității sticlelor fosfocalcice sintetizate prin tehnica sol-gel	

	131
6.3.2 Determinarea densității sticlelor fosfocalcice sintetizate prin topire.....	132
6.4 Determinarea compoziției chimice elementare a sticlelor fosfocalcice prin spectroscopie cu fluorescență de raze X (WD-XRF) .....	133
6.4.1 Determinarea compoziției chimice a sticlelor fosfocalcice sintetizate prin tehnica sol-gel .....	134
6.4.2 Determinarea compoziției chimice a sticlelor fosfocalcice sintetizate prin topire .....	140
6.5 Studiul bioactivității sticlelor fosfocalcice prin analiza de difracție de raze X (XRD) .....	142
6.5.1 Analiza XRD a pulberilor de sticle sintetizate prin tehnica sol-gel .....	143
6.5.2 Analiza XRD a sticlelor sintetizate prin topirea amestecurilor oxidice .....	173
6.6 Studiul bioactivității sticlelor fosfocalcice prin analiza de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) .....	176
6.6.1 Analiza FTIR a pulberilor de sticle sintetizate prin tehnica sol-gel .....	177
6.6.2 Analiza FTIR a pulberilor de sticle sintetizate prin topirea amestecurilor oxidice .....	194
6.7 Studiul morfologic al suprafeței sticlelor fosfocalcice sintetizate prin tehnica sol-gel .....	199
6.8 Evaluarea activității antibacteriene a sticlelor dopate prin examen microbiologic .....	212
7. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PROPRII .....	224
7. Concluzii.....	224
7.2 Contribuții proprii.....	239
7.3 Perspective de cercetare .....	240
BIBLIOGRAFIE .....	241
ACTIVITATEA DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ .....	269
ANEXE .....	279

**2. Cuvinte cheie:** sticle fosfocalcice, biomateriale, bioactivitate, activitate antimicrobiană, sinteză sol-gel, XRD, FTIR, SEM, DLS, TG-DTG-DSC, hidroxiapatită, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, examen microbiologic.

### 3. Introducere

Abordarea în cadrul acestei teze de doctorat a unor probleme legate de aspecte fundamentale din domeniul nanomaterialelor biocompatibile pentru aplicațiile clinice, se înscrie în obiectivele generale ale programelor de cercetare de excelență, prin care România promovează cunoașterea științifică în domeniul biomaterialelor, cu scopul dezvoltării și accelerării integrării agenților economici la cerințele Uniunii Europene, la nivel de consorțiu CEEX și al cerințelor din țările europene dezvoltate.

În anul 2004 jurnalul Nanotoday estima că în lume există peste 300 de companii producătoare de nanomateriale, dintre care circa 30% produc biomateriale destinate domeniului medical și farmaceutic. În acest sens se dorește ca și România să devină unul dintre producătorii de marcă ai unor astfel de biomateriale, care ar conduce la o îmbunătățire a calității vieții pentru numeroși pacienți, prin reducerea considerabilă a costurilor materialelor pentru protezare și a actului chirurgical în sine.

Ultimele decenii au adus în atenția cercetătorilor și tehnologilor din domeniul științei materialelor și al fizicii solidului studiul asupra stării solide necristaline și a ceramicilor cu aplicații practice valoroase pentru știință, industrie și medicină. Aceste cercetări au un caracter interdisciplinar și sinergic, mai ales în ceea ce privește descoperirea de noi clase de biomateriale, deoarece ingineria tisulară se află la frontiera dintre domeniul ingineriei și cel al științelor vieții, reprezentând cea mai avansată abordare din sfera vastă a implantologiei.

Sticlele cu potențial bioactiv și profilactic reprezintă o clasă relativ nouă de materiale biocompatibile anorganice care sunt departe de a-și fi demonstrat potențialul aplicativ pe deplin în implantologie. Acestea induc nucleerea postimplantare a unui strat de hidroxiapatită carbonată la suprafața lor și sunt ușor colonizabile de către celulele scheletale (osteoblaste, tenocite, condrocite), ceea ce duce la formarea unei legături puternice cu țesutul osos. Aceste sticle fac obiectul de studiu al prezentei teze de doctorat.

Deoarece în ultimele decenii vârsta medie și speranța de viață a populației a crescut, a devenit imperios necesară descoperirea de noi tipuri de materiale cu potențial bioactiv și durată de exploatare postimplantare mult mai mare. Principala provocare a fost aceea de a descoperi biomateriale capabile să realizeze o legătură biochimică la interfața dintre biomaterial și țesut, acolo unde materialul este mai expus la tensiune.

În anul 1968 Larry L. Hench împreună cu colaboratorii săi au descoperit că anumite compoziții de sticle neporoase cu compoziție silicofosfocalcică sunt capabile să formeze o legătură stabilă cu osul în perioade relativ scurte după implantare. În acest an a fost brevetată binecunoscuta compoziție Bioglass 45S5.

Mecanismul interacțiunii la interfața biosticlă – țesut a început să fie cercetat în 1973 tot de către Hench și colab. Aceștia au arătat că în contact cu fluidele biologice, aceste sticle generează formarea unui strat de hidroxiapatită nestoechiometrică similar cu faza minerală a osului pe suprafața lor, iar prin încorporarea moleculelor de collagen în acest strat se formează legătura biologică țesut – implant.

Încorporarea argintului și a cuprului în rețeaua silicofosfocalcică a sticlelor este o metodă relativ nouă în sinteza biosticlelor, relativ ușor de realizat tot datorită tehnicii sol-gel. Odată cu încorporarea ionilor de argint în structura sticlelor, pe lângă proprietatea de bioactivitate, acestea capătă și proprietăți antimicrobiene, cu rol în prevenirea și combaterea infecțiilor intraspitalicești care pot să apară în urma intervențiilor chirurgicale

de protezare. Doparea cu ioni cuproși conferă, suplimentar activității antimicrobiene, proprietăți antiinflamatoare și cicatrizante biomaterialelor.

Protezarea medicală cu materiale de sinteză a devenit sigură abia la sfârșitul secolului XIX, odată cu utilizarea tehnicilor aseptice în chirurgie. Anii 60 au marcat începutul obținerii materialelor cu destinație strictă, medicală și stoparea etapei anterioare în care materialele folosite erau obținute industrial.

Pentru a putea fi utilizat în protezare un material trebuie să îndeplinească următoarele cerințe minimale: să nu fie toxic, alergic, cangerigen, teratogen, să nu producă respingerea, să nu modifice pH-ul și compoziția sângelui, mecanismul coagulării, să nu producă sedimentări sau biodegradări în țesuturi. Să fie disponibile în cantități nelimitate, să se poată steriliza, să fie ușor de depozitat, ușor de manipulat clinic și să aibă prețuri accesibile [12].

Materialele destinate substituției osoase trebuie, în plus, să fie biocompatibile, osteoconductive, osteoinductive, dacă este posibil să fie bioabsorbabile și să poată asigura suport mecanic [13, 14].

Biomaterialele sunt materiale naturale sau sintetice care se utilizează pentru a înlocui părți, organe sau țesuturi individuale din organismele vii și au rolul de a funcționa în strânsă corelație cu acestea fără a le vătăma [15].

Deși au trecut peste 45 de ani de când Hench a patentat prima sticlă bioactivă – bine cunoscuta Bioglass 45S5 sintetizată prin topire în 1968 - care la bază este o sticlă silico-fosfo-calcică alcalină, adaosul altor elemente în compoziția acestor biomateriale le poate conferi proprietăți suplimentare, pe lângă bioactivitate (Si, Ca, P), cum sunt cele antimicrobiene (Ag, Cu, Zn), antiinflamatoare și cicatrizante (Zn, Cu), magnetice (Fe), rezistență mecanică superioară (Mg, Mn, Al, Fe), fiecare cu implicații benefice majore pentru reconstrucție, protezare și recuperare. Acestea sunt argumente suplimentare care fac din această clasă de biomateriale obiective de prim interes pentru cercetarea din domeniu [102, 103, 104, 105].

#### **4. Scopul și obiectivele tezei de doctorat**

**Scopul** acestei teze de doctorat „**Sticle fosfocalcice cu proprietăți speciale**”, îl reprezintă cercetarea posibilităților de a conferi materialelor vitroceramice aflate în uz clinic proprietăți suplimentare, eventual sinergice, din punct de vedere al biofuncționalității, față de cele deja cunoscute.

În acest scop s-a avut în vedere sinteza prin tehnica sol-gel a unor sticle fosfocalcice cu potențial bioactiv, din sistemul ternar  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  și a unor variante compoziționale ale acestora, din sistemul cuaternar  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$  și  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Cu}_2\text{O}$  cu potențial profilactic și terapeutic. Pentru un studiu comparativ relevant (mai ales din punct de vedere profilactic) s-au sintetizat câteva compoziții similare și prin procedeul clasic al fuziunii (topirii amestecurilor oxidice).

Tehnica sol-gel este o alternativă de obținere a biosticlelor care a fost studiată extensiv la nivel mondial de la începutul anilor 1990, dar aflată totuși la nivel de pionierat în țara noastră. Această metodă a fost adoptată din motive tehnologice și economice avantajoase. Același lucru se poate afirma și despre doparea sticlelor și a biomaterialelor în general, cu ioni de argint sau cupru. Deși argintul și cuprul sunt cunoscute pentru proprietățile lor antimicrobiene încă din antichitate, tehnica dopării biosticlelor cu metale biocide prin tehnica sol-gel a început să fie cercetată și aplicată abia după anul 2000. Primele biosticle dopate cu argint, sintetizate prin tehnica sol-gel, sunt obținute abia începând din 2005 - 2008 de către Balamurugan și Balossier.

Proprietățile sticlelor sintetizate sunt comparate între ele, în cadrul fiecărui sistem (ternar și cuaternar), dar și inter-sisteme în vederea identificării posibilelor proprietăți sinergice: bioactivitate și bioprofilaxie. Analiza sticlelor sintetizate s-a realizat pe pulberi, fără a încerca alte morfologii. Din acest motiv, rezultatele obținute și prezentate în această teză de doctorat sunt posibil de confirmat prin testare in vivo. Rezultatele tezei pot constitui, în perspectivă, subiectul unor noi cercetări.

**Obiectivul general** al prezentei teze de doctorat îl constituie sinteza unor sticle fosfocalcice simple și cu încorporare de metale cu potențial antimicrobian (argint, cupru) prin tehnica sol-gel și prin topire și analiza proprietăților acestora.

**Obiective specifice:**

- Sintetizarea unor compoziții de sticlă sub formă pulverulentă, cu un caracter predominant amorf, din sistemul ternar  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$  prin metoda sol-gel, la temperaturi cât mai scăzute în cea mai mare parte a sintezei, utilizând un număr mic de reactivi și echipamente tehnice specifice, cu implicații minimale de ordin economic și logistic.

- Identificarea și stabilirea tehnologiei cadru de obținere a sticlelor dopate cu argint / cupru din sistemul cuaternar  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{Ag}_2\text{O}$  /  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{Cu}_2\text{O}$ , vizând momentul optim de încorporare al precursorului pentru ionii de argint / cupru, astfel încât tehnica de sinteză sol-gel să nu fie afectată negativ din punct de vedere al etapelor standard și al parametrilor de lucru.

- Sinteza unor sticle dopate cu metale cu potențial biocid prin topirea amestecurilor de precursori.

- Verificarea compozițiilor chimice elementale pentru sticlele sintetizate prin analiza cantitativă de spectroscopie de fluorescență cu raze X, după lungimea de undă (WD-XRF), în vederea confirmării compozițiilor teoretice calculate și a rutelor tehnologice adoptate.

- Verificarea stabilității termice a probelor de sticlă sol-gel prin analiză termogravimetrică (TG) și prin calorimetrie diferențială cu baleiaj (DSC).

- Stabilirea dimensiunii particulelor sticlelor pulverulente sintetizate prin tehnica sol-gel prin analiza de difuzie dinamică a luminii (DLS).

- Determinarea densității relative a sticlelor prin metoda picnometrică.

- Obținerea unui fluid biologic simulat, aprotic și acelular, după o rețetă a lui Kokubo din 2006, revizuită, numit generic lichid uman simulat (LUS sau SBF).

- Investigarea proprietăților de biocompatibilitate și bioactivitate ale sticlelor prin studiu in vitro, după imersarea în lichid uman simulat, durate variabile (3 – 21 zile), folosind metode moderne de analiză – difracția cu raze X pentru analiza structurală (XRD), spectroscopia în infraroșu după transformata Fourier (FTIR) pentru identificarea grupărilor funcționale, microscopia electronică cu baleiaj (SEM) pentru studiul neoformațiunilor apărute la suprafața sticlelor testate in vitro.

- Studiul proprietăților antibacteriene ale sticlelor dopate cu argint și cupru, determinate calitativ și semicantitativ prin stabilirea concentrației minime bactericide (MBC) și bacteriostatice asupra a două tulpini de bacterii patogene din seria celor mai implicate în infecțiile intraspitalicești.

**5. Prezentarea structurii tezei**

Teza de doctorat „**Sticle fosfocalcice cu proprietăți speciale**„ este structurată în 7 capitole. Primele trei capitole sunt dedicate studiului documentar privind stadiul actual al cunoașterii în domeniul amplu al biomaterialelor, iar următoarele 4 cercetărilor experimentale și contribuțiilor proprii.



**Capitolul 1** este unul introductiv în care este prezentată o scurtă incursiune în istoria sticlei, scopul și obiectivele generale și specifice ale tezei, informații cu privire la anatomia și structura oaselor lungi, precum și noțiuni legate de modelarea, reconstrucția și protezarea osoasă.

**Capitolul 2** al tezei cuprinde o descriere amănunțită a biomaterialelor la modul general și cu precădere a celor fosfocalcice, pornind de la definire, clasificare și aplicațiile lor clinice în funcție de bioactivitate.

**Capitolul 3** este dedicat exclusiv sticlelor fosfocalcice care fac obiectul studiului prezentei teze de doctorat. Acestea au fost prezentate sub aspect structural, compozițional, al metodelor de sinteză și al biopermanenței (sub aspect profilactic și bioactiv). Capitolul cuprinde informații legate de posibilitatea de dopare a sticlelor cu metale cu proprietăți biocide și de efectul acestora asupra microorganismelor patogene implicate în infecțiile nosocomiale. Ultimul subcapitol prezintă soluțiile utilizate la testarea in vitro a bioactivității sticlelor.

Partea experimentală a tezei de doctorat începe cu **capitolul 4** în care am realizat o prezentare succintă a tehnicilor de investigație pe care le-am utilizat în studiul sticlelor sintetizate.

În **capitolul 5** sunt prezentate rutele tehnologice adoptate pentru sinteza sticlelor fosfocalcice prin metoda sol-gel și prin topirea amestecurilor oxidice, precum și parametrii de lucru adoptați. Capitolul prezintă și metoda de obținere a lichidului uman simulat tip Kokubo – Takadama cu care s-a realizat testarea in vitro a bioactivității sticlelor.

**Capitolul 6** prezintă investigațiile realizate asupra sticlelor sintetizate și sunt discutate rezultatele obținute. Sticlele au fost studiate din punct de vedere compozițional prin spectroscopie de fluorescență cu raze X după lungimea de undă (WD-XRF). Stabilitatea termică s-a determinat prin analiză termogravimetrică (TG) și prin calorimetrie diferențială cu baleiaj (DSC și DTG), dimensiunea și distribuția granulometrică a pulberilor de sticlă sintetizate prin tehnica sol-gel au fost analizate prin DLS. Capitolul cuprinde de asemenea, determinarea densității sticlelor prin metoda picnometrică, studiul bioactivității sticlelor imersate în lichid uman simulat perioade diferite a fost realizat prin difracție de raze X (XRD), prin spectroscopie în infraroșu după transformata Fourier (FTIR) și prin microscopie electronică de baleiaj (SEM). Capacitatea antimicrobiană a sticlelor dopate a fost prezentată în cadrul aceluiași capitol.

În **capitolul 7** al tezei sunt prezentate concluziile și contribuțiile proprii.

## **6. Cercetări experimentale proprii**

### **6.1 Tehnici de investigație folosite în studiu**

Pentru atingerea obiectivelor specifice ale prezentei teze de doctorat, respectiv caracterizarea sticlelor sintetizate din punct de vedere al proprietăților lor bioactive și profilactice, s-au efectuat analize fizice, chimice și microbiologice.

În acest capitol sunt prezentate metodele de investigație utilizate în vederea caracterizării sticlelor cu proprietăți speciale și sunt descrise tehnicile de lucru și aparatura folosită în cadrul studiilor experimentale.

Compoziția chimică elementală a sticlelor studiate a fost stabilită prin *spectroscopie cu fluorescență de raze X* cu dispersie după lungimea de undă (WD-XRF). Caracterizarea din punct de vedere a fazelor cristaline prezente sau formate în structura sticlelor analizate, ulterior imersării în LUS s-a realizat prin intermediul *difracției cu raze X* (XRD).

Grupările chimice moleculare existente în structura sticlelor sau formate postimersare în SBF au fost identificate prin *spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier* (FTIR), iar morfologia pulberilor analizate s-a realizat prin *microscopie electronică cu baleiaj* (SEM).

În vederea determinării stabilității termice în timp și a unor proprietăți fizico-chimice ale sticlelor, acestea au fost supuse *analizei termogravimetrice* (TGA) cuplată cu *calorimetria diferențială cu baleiaj* (DSC). Distribuția granulometrică și analiza dimensională efectivă a sticlelor cu potențial bioactiv s-a realizat prin tehnica *difuziei dinamice a luminii laser pulsate* (DLS). S-a realizat și determinarea densității relative deoarece aceasta se corelează cu morfologia și suprafața specifică a sticlelor sintetizate.

Evaluarea activității antimicrobiene a sticlelor fosfocalcice cu încorporare de metale tranziționale cu potențial biocid (Ag, Cu) s-a realizat prin studiu microbiologic, pe două culturi pure de bacterii din topul primelor cinci implicate în infecțiile nosocomiale (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*).

## 6.2. Sinteza sticlelor fosfocalcice

În acest capitol al tezei sunt prezentate procedeele experimentale, materialele și aparatura folosite, precum și tehnicile de lucru adoptate în vederea obținerii unor compoziții de sticle fosfocalcice din sistemul ternar  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ , precum și al unora dopate cu ioni de argint ( $\text{Ag}^+$ ) sau cu ioni cuproși ( $\text{Cu}^+$ ) din sistemul cuaternar  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ , respectiv  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Cu}_2\text{O}$ , atât prin metoda sol-gel, cât și prin metoda clasică a topirii amestecurilor oxidice de precursori.

În vederea obținerii unor sticle cu proprietăți compatibile cu aplicațiile medicale din domeniul chirurgiei reparatorii și reconstructive ortopedice, stomatologice și alte ramuri ale medicinei (ORL, oftalmologie, oncologie, cardiologie, nefrologie, etc.) s-au utilizat reactivi chimici de înaltă puritate, achiziționați de la firme recunoscute din țară și din străinătate.

### Metoda sol-gel de sinteză a sticlelor fosfocalcice simple și dopate cu metale

Alegerea metodei sol – gel pentru sinteza majorității probelor de sticlă supuse studiului s-a bazat cu precădere pe faptul că se pot obține materiale vitroase cu structură predeterminată, în funcție de parametri de lucru și de precursorii utilizați, sticle care se obțin destul de greu prin tehnicile convenționale de topire a amestecurilor oxidice [7]. Îmbunătățirea și predictibilitatea proprietăților produșilor finali face ca sinteza sol – gel să fie deosebit de avantajoasă și atractivă pentru domeniul materialelor biocompatibile comparativ cu metoda clasică. Nu în ultimul rând, această tehnică de sinteză este mai fezabilă deoarece permite obținerea unor costuri de producție mult mai scăzute, păstrarea unor proprietăți ca suprafața specifică și porozitatea cu valori ridicate, dar și posibilitatea de dopare cu metale (argint, magneziu, zinc, cupru, etc.) care pot conferi proprietăți speciale suplimentare (antiinflamatoare, antimicrobiene, cicatrizante, etc.), fără a-și pierde bioactivitatea.

Deși aceste materiale se află și la momentul actual în studiu din punct de vedere al perfecționării metodelor de sinteză și al bioperformanței (prin teste preclinice și clinice), majoritatea cercetătorilor din domeniul biomaterialelor au conchis că metoda sol – gel are o bună repetabilitate și că sticlele obținute au o bioactivitate net superioară celor obținute prin metoda tradițională [133, 156, 180, 182, 184, 189, 190].

Metoda sol-gel de sinteză a sticlelor cu potențial bioactiv presupune parcurgerea unor etape cadru, tipice; acestea constau în hidroliza catalitică și condensarea precursorilor oxidici în forma de sol, gelifierea solului în atmosferă saturată, maturarea (îmbătrânirea) gelului, uscarea acestuia și stabilizarea termică a xerogelului rezultat.

Tabelul 5.1 Compoziția chimică în oxizi a sticlelor ternare (% greutate)

Cod probă	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Observații
P1	50	45	5	Compoziție optimă, cu P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> la limita inferioară
P2	55	40	5	SiO <sub>2</sub> la limita superioară, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> la limita inferioară
P3	50	41	9	SiO <sub>2</sub> și CaO la valori optime, cu P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> la limita superioară
P4	50	43	7	Compoziție optimă pentru toți oxizii

În figurile 5.2 și 5.3 sunt ilustrate cele mai importante etape de sinteză a sticlelor fosfocalcice prin metoda sol-gel.



a – geluri maturate

b – geluri în etuvă, înaintea uscării

Figura 5.2 Geluri maturate la 60°C timp de 54 – 60 ore



a



b

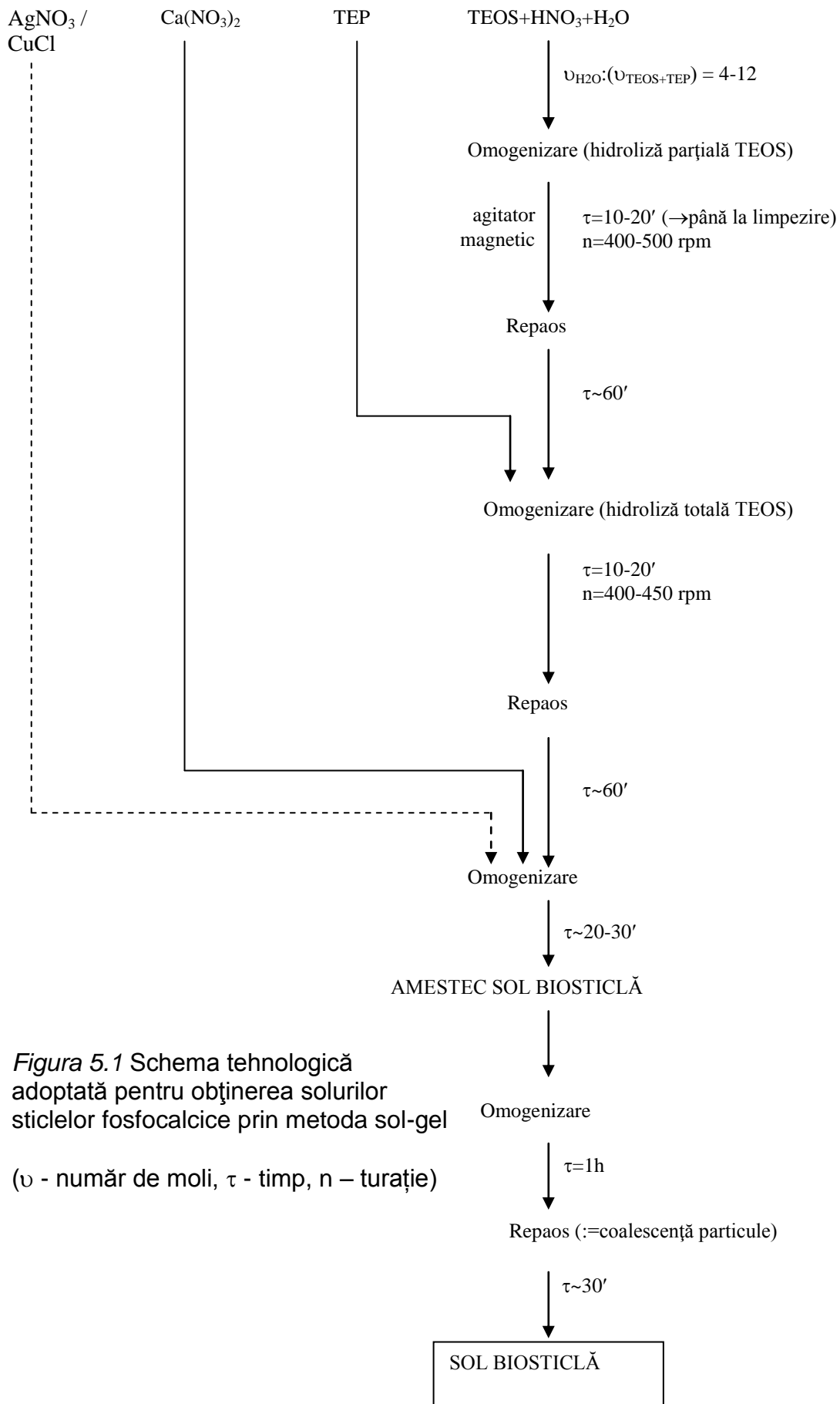


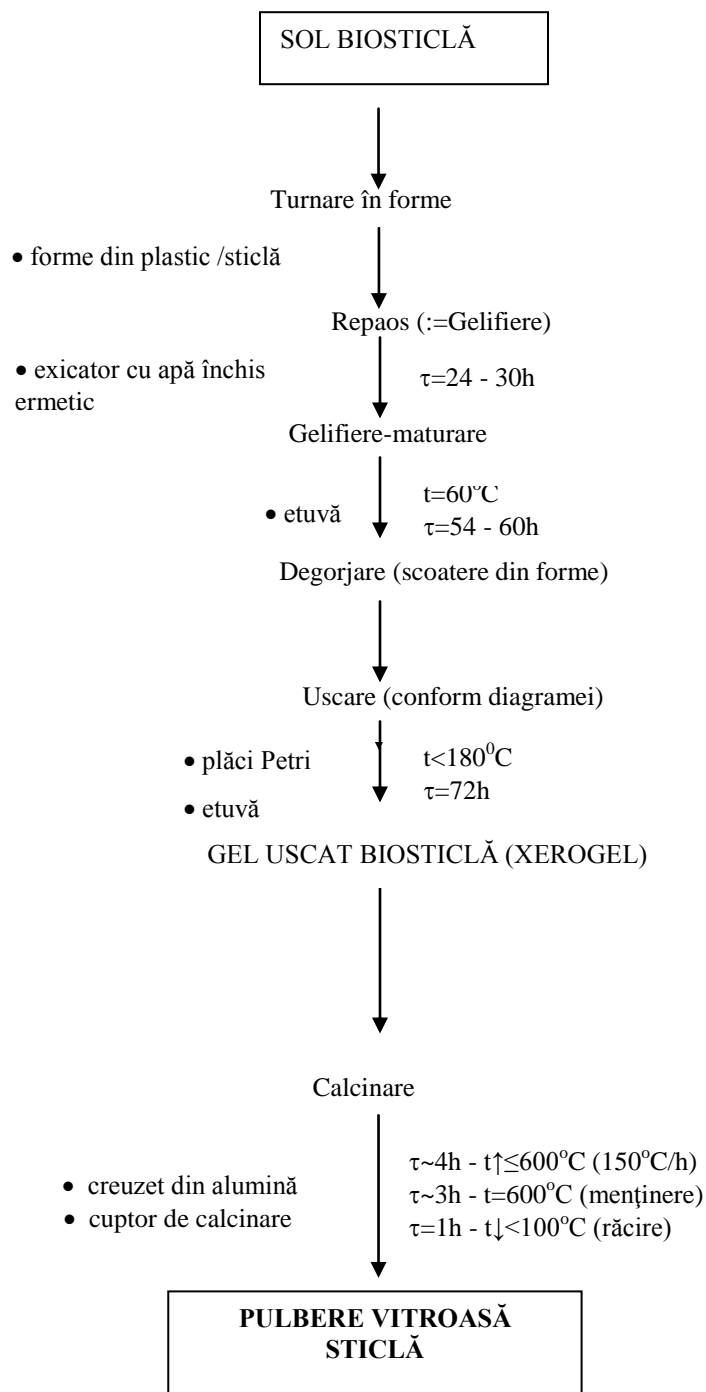
c

Figura 5.3 Xerogeluri în etuvă (a) și în curs de pregătire pentru calcinare (b, c)

În figurile 5.1 și 5.7 este prezentat schematic, dar succinct, procesul tehnologic de obținere al sticlelor fosfocalcice ternare și cuaternare (dopate cu argint sau cupru), cu referire la parametrii de lucru adoptați și materialele folosite în cadrul sintezelor.

Doparea cu ioni metalici s-a realizat utilizând ca precursori azotatul de argint, respectiv clorura cuproasă.





*Figura 5.7* Schema bloc de operații asociată procesului tehnologic de gelifiere, maturare și stabilizare a gelurilor de sticle

(τ - timp, t – temperatură)

Compozițiile de sticle dopate cu argint sintetizate pentru prezentul studiu sunt prezentate în tabelul 5.3.

*Tabelul 5.3 Compoziția chimică în oxizi a sticlelor dopate cu Ag<sub>2</sub>O (% greutate)*

Cod probă	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ag <sub>2</sub> O	Observații
PA1	47*	45	5	3	Compoziție optimă, cu P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> și Ag <sub>2</sub> O la limita inferioară
PA2	50*	40	5	5	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> la limita inferioară, Ag <sub>2</sub> O la limita superioară
PA3	50	38*	9	3	SiO <sub>2</sub> , CaO optim, cu P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> la limita superioară, Ag <sub>2</sub> O la limita inferioară
PA4	50	38*	7	5	Compoziție optimă pentru toți oxizii, Ag <sub>2</sub> O la limita superioară

\* Indică ce oxizi au fost substituiți din compoziția inițială (din tabelul 5.1) pentru a fi introdus Ag<sub>2</sub>O.

În figura 5.8 este prezentat xerogelul unei sticle dopate cu argint (a) și aspectul unei sticle cuaternare dopate cu argint (b).



*Figura 5.8 Xerogel în curs de pregătire pentru calcinare (a) și pulbere de sticlă dopată cu argint (b)*

Pentru a studia posibila activitate antimicrobiană a sticlelor fosfocalcice dopate cu metale tranziționale din grupa I-a secundară, pentru această teză au fost sintetizate și două compoziții de sticle cuaternare din sistemul SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Cu<sub>2</sub>O (tabelul 5.5), pe lângă cele dopate cu argint.

*Tabelul 5.5 Compoziția chimică în oxizi a sticlelor dopate cu Cu<sub>2</sub>O (% greutate)*

Cod probă	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Cu <sub>2</sub> O
PC1	47*	45	5	3
PC2	50	38*	7	5

\* Indică ce oxizi au fost substituiți din compoziția inițială (din tabelul 5.1) pentru a fi introdus Cu<sub>2</sub>O.

### Sinteza sticlelor prin topirea amestecurilor oxidice de precursori

În contextul în care este cunoscută dificultatea sintezei unor sticle omogene la scară moleculară prin topire și cu compoziții practice apropiate de cele calculate teoretic, doparea cu metale tranziționale a constituit o provocare, atât din punct de vedere al alegerii parametrilor de topire, cât și al evaluării proprietăților de interes clinic al sticlelor dopate, deoarece sticla are porozitate și suprafață specifică mică, densitate mare, iar grăunții vitroși sunt compacti, de dimensiuni mari, aspecte care pot influența negativ proprietăți ca biocompatibilitatea și rolul terapeutic al acestui tip de sticle [99, 106, 192,196].

Pornind de la premiza bioactivității binecunoscutei compoziții silico-fosfo-calcice alcaline - 45S5 sintetizate de către Larry L. Hench în 1968 prin topire, am sintetizat trei compoziții de astfel de sticle prezentate în tabelul 5.6.

Tabelul 5.6 Compoziția chimică în oxizi a sticlelor sintetizate prin topire (% greutate)

<b>Oxizi</b> <b>Cod probă</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>CaO</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>Na<sub>2</sub>O</b>	<b>Ag<sub>2</sub>O</b>	<b>Cu<sub>2</sub>O</b>
<b>45S5</b>	45	24,5*	6*	22,5*	-	-
<b>TAg</b>	45	22,5	5	22,5	5	-
<b>TCu</b>	45	22,5	5	22,5	-	5

\* Indică ce oxizi au fost substituiți din compoziția inițială 45S5 pentru a fi realizate dopările cu argint și cupru.

Etapele de lucru ale rutei tehnologice adoptate sunt următoarele:

I – încălzire până la 1100°C în decursul a o oră și 35 de minute (rata de încălzire de circa 10°C / minut);

II – menținere la 1100°C pentru o oră;

III – încălzire până la temperatura de topire de 1415°C în decursul a 30 de minute, cu aceeași rată de încălzire ca și în prima etapă;

IV – menținere la 1415°C timp de 30 de minute (fig. 5.11.a);

V – răcire rapidă până la temperaturi sub 1300°C (fig. 5.11.b), urmată de scoaterea creuzetelor din cuptor și turnarea sticlei fluide pe suporturi metalice sau în apă (fig. 5.11.c și 5.11.d);

VI – încălzirea probelor de sticlă la 180 – 200°C, timp de 4 ore în etuvă, în vederea unei detensionări parțiale.

În figura 5.12 sunt prezentate sticlele obținute prin topire, sub formă de pastile sau frite, înainte de a fi măcinate.



Figura 5.12 Sticlele sintetizate prin topire, înainte de măcinare: a – sticla 45S5, b – pastile de sticlă TAg, c – frită de sticlă TCu

### 6.3 Obținerea lichidului uman simulant tip Kokubo – Takadama

Lichidul uman simulant este o soluție care imită compoziția, concentrația și pH-ul plasmei umane și a lichidelor fiziologice. Este însă metastabil, acelular și neproteic. Cu toate acestea, este cel mai utilizat mediu de testare a bioactivității in vitro a diferitelor biomateriale după anii 1990, când a fost sintetizat prima dată de Kokubo și colaboratorii [312 - 315]. Atât plasma, cât și SBF au în compoziție săruri care asigură cantități suficiente de ioni de  $\text{Ca}^{2+}$  și  $\text{HPO}_4^{2-}$ , care să susțină formarea hidroxiapatitei la suprafața biomaterialelor [315 - 318].

În tabelul 5.8 este prezentată compoziția LUS sintetizat pentru testarea in vitro a sticlelor sintetizate și studiate în această teză de doctorat.

*Tabelul 5.8 Compoziția și concentrația ionică a 1L SBF de concentrație 1,5 N*

Reactiv	Cantitate [g]	Concentrație ionică [mmol/l]	
		Cationi	Anioni
NaCl	11.994	$\text{Na}^+$	-
$\text{NaHCO}_3$	0.525	213.0	$\text{HCO}_3^-$ 6.3
KCl	0.336	$\text{K}^+$	-
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.342	7.5	$\text{HPO}_4^{2-}$ 1.5
$\text{MgCl}_2$	0.458	$\text{Mg}^{2+}$ 2.3	-
HCl 1M	$60 \text{ cm}^3$	-	$\text{Cl}^-$ 221.7
$\text{CaCl}_2$	0.417	$\text{Ca}^{2+}$ 3.8	
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0.107	-	$\text{SO}_4^{2-}$ 0.8
$(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{-C-NH}_2$	9.086	-	-
HCl 1M	Până la pH= 7.2-7.4	pH= 7.25	

### 6.4 Analiza termică a sticlelor fosfocalcice sintetizate prin metoda sol – gel

Pulberile de sticle fosfocalcice sintetizate prin metoda sol - gel au fost supuse analizei termice înainte de testarea bioactivității in vitro, respectiv înainte de imersarea în lichid uman simulant.

Prin analiza termică a pulberilor de sticlă s-a urmărit în special variația masei (TGA) și stabilirea punctelor termice critice, odată cu diferența de temperatură (DTA) și de căldură (DSC).

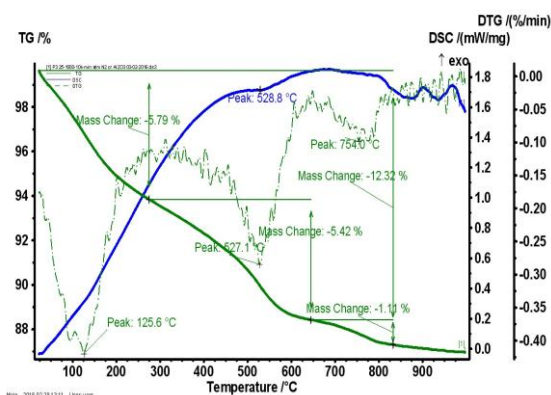


Aprecierea stabilității termice s-a realizat în raport cu valorile pierderilor de masă totale. Cele zece compoziții de sticle sintetizate prin tehnica sol – gel au fost încălzite până la temperatura de 1000°C cu o rată de 10°C/minut, în vederea efectuării analizei termogravimetrice.

Stabilitatea termică a sticlelor sintetizate prezintă interes deoarece înainte de a fi implantate în organismul uman acestea necesită o sterilizare termică riguroasă la temperaturi de minim 120°C pentru a preveni infecțiile postchirurgicale.

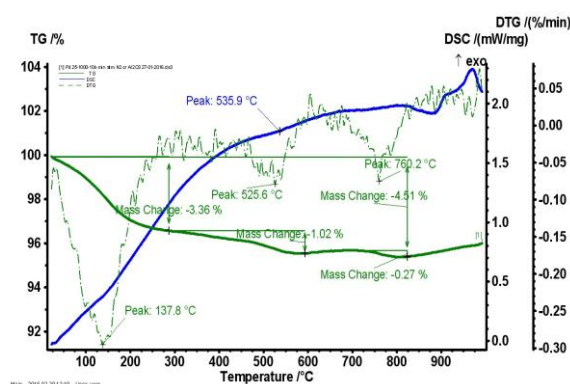
De asemenea, este important ca materialele să ajungă în corpul viu la temperaturi apropiate de cele ale țesuturilor limitrofe deoarece diferențe mai mari de câteva grade între implant și țesut pot duce la procese inflamatorii și ulterior la reacții de respingere a grefei.

Analiza comparativă a celor 4 compoziții de sticle ternare, nedopate cu ioni metalici, a arătat că cea mai stabilă din punct de vedere termic este sticla fosfocalcică P4, cea care, conform surselor bibliografice consultate, are o compoziție optimă în toți oxizii (50% SiO<sub>2</sub> – 43%CaO - 7% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Cea mai termolabilă este sticla P3 (50% - 41% - 9%). Pierderile totale de masă ale acestora sunt: 12,32% - P3, 4,51% - P4. Sticlele P1 și P2 au pierderi de masă comparabile (8,30% - P1, 8,78% - P2). Termografiile acestora sunt prezentate în figurile 6.3, respectiv 6.4.



6.3

Figura 6.3 Analiza termogravimetrică (TG / DTG) și de calorimetrie diferențială cu baleiaj (DSC) pentru sticla P3



6.4

Figura 6.4 Analiza termogravimetrică (TG / DTG) și de calorimetrie diferențială cu baleiaj (DSC) pentru sticla P4

Comparativ cu sticlele P1 și P2 compoziția P3 prezintă cea mai mare pierdere de masă (12,32), fenomen care se poate datora conținutului mai mic de oxid stabilizator - CaO – cu maxim 4% și a unui conținut de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> cu 4% mai mare față de celelalte două compoziții.

Pierderile de masă au loc în 3 etape, pe diferite intervale termice, excepție face sticla P1 (4 etape). De interes pentru utilizarea clinică este palierul de temperatură situat la toate probele între 25° – 275°C.

Pierderile majore de masă au loc în acest interval, deci după sterilizarea termică (obligatorie), sticlele sunt stabile termic la temperaturile la care pot ajunge în organismul uman.

Pierderile de masă sunt asociate eliminării din structura sticlelor a moleculelor de apă adsorbite fizic la suprafața pulberilor după stabilizarea termică, a reziduurilor organice (preponderent etanol) și a oxizilor de azot, rezultați din descompunerea precursorilor folosiți.

Toate cele 4 compoziții ternare sunt stabile din punct de vedere termic până la 1000°C, temperatura la care au fost analizate.

Dintre compozițiile de sticle dopate cu argint cele mai stabile termic pe intervalul analizat sunt compozițiile PA2 (0,64%) și PA4 (2,33%), comparativ cu PA1 (3,93%) și PA3 (5,53%).

Acest lucru se datorează conținutului mai mare de argint - 5%, față de 3% din structura primelor două. Doparea cu argint a sticlelor fosfocalcice îmbunătățește semnificativ stabilitatea termică a acestora.

Comparativ cu sticlele ternare, nedopate, se observă că pierderile de masă în cazul tuturor compozițiilor de sticle dopate sunt mult mai mici.

Sticlele fosfocalcice dopate cu cupru PC1 și PC2 au pierderi de masă de 12,25%, respectiv 12,77%.

Conținutul de cupru (3%, 5%) nu a influențat stabilitatea lor termică vizibil, ca în cazul argintului.

Comparativ cu sticlele de compoziție echivalentă (P1 și PA1), sticla PC1 este mai puțin stabilă decât ambele, ca și în cazul PC2, relativ la sticlele P4 și PA4.

În concluzie, doparea cu ioni de argint este de preferat dopării cu ioni cuproși.

Toate compozițiile de sticle sintetizate sunt stabile din punct de vedere termic pe intervalul în care au fost analizate și se pretează la utilizarea clinică din acest punct de vedere.

## **6.5 Studiul prin analiză dimensională și de distribuție granulometrică al sticlelor sintetizate prin tehnica sol-gel**

Singura populație unimodală cu cele mai mici diametre medii s-a observat în cazul probei P2 deși aceasta are cel mai ridicat conținut de siliciu (55% SiO<sub>2</sub>).

Celelalte probe, P1, P3 și P4, deși au un conținut identic de SiO<sub>2</sub> (50%) au un comportament diferit la ultrasonare.

Coroborând concentrațiile celorlalți oxizi din structura vitroasă a sticlelor nu se poate trage o concluzie implicită dată de compoziția acestora, dovadă fiind și sticla P4, a cărei compoziție este considerată optimă pentru toți oxizii și care este cea mai rezistentă la ultrasonare, ea având trei populații de particule și cele mai mari diametre medii.

Sticla cu cele mai mari diametre medii este cea de compoziție PA2, cu un conținut de argint identic (5% Ag<sub>2</sub>O) cu al probei PA4; prin urmare, nu conținutul de argint al sticlelor este cel care influențează comportamentul acestora la ultrasonare. Analiza TG indică faptul că sticla PA2 este cea mai stabilă din punct de vedere termic, aspect ce poate justifica comportamentul la ultrasonare și dimensiunea mare a particulelor.

Deoarece proba PC1 are mai puțin cupru în compoziție (3%) față de proba PC2 (5%) s-ar putea trage concluzia că procentul de metal din matricea vitroasă poate duce la creșterea rezistenței la ultrasonare, coroborat cu dimensiunile diametrelor medii ale acestora. Numărul mic de probe face ca afirmația să fie incertă deoarece acest comportament nu s-a confirmat și în cazul probelor dopate cu argint.

Concluzia generală a analizei DLS asupra celor 10 probe de sticle fosfocalcice sintetizate prin tehnica sol-gel este că toate sunt biocompatibile, putând ajunge la dimensiuni micronice și chiar nanometrice prin procesări ulterioare sintezei.

## **6.6 Determinarea densității relative a sticlelor sintetizate**

Determinarea densității am considerat că este relevantă deoarece literatura de specialitate indică corelații directe între valoarea densității sticlelor și proprietățile lor

fizice, dar și cu comportamentul acestora în mediul biologic în cazul sticlelor cu potențial bioactiv și antimicrobian.

Densitatea sticlelor fosfocalcice este determinată de compoziția chimică și de structura acestora, de condițiile termice de sinteză, deci implicit de metoda de obținere adoptată. Densitatea poate influența proprietăți ca porozitatea, granulometria, suprafața specifică, duritatea.

Densitatea relativă a pulberilor de sticlă obținute prin metoda sol-gel este prezentată în tabelul 6.4.

*Tabelul 6.4 Densitatea relativă a pulberilor de sticlă obținute prin metoda sol-gel*

Proba	Densitate [g/cm <sup>3</sup> ]	Proba	Densitate [g/cm <sup>3</sup> ]	Proba	Densitate [g/cm <sup>3</sup> ]
<b>P1</b>	0,6514	<b>PA1</b>	0,7609	<b>PC1</b>	0,6931
<b>P2</b>	0,7733	<b>PA2</b>	0,8160	-	-
<b>P3</b>	0,6605	<b>PA3</b>	0,7354	-	-
<b>P4</b>	0,6441	<b>PA4</b>	0,6978	<b>PC2</b>	0,8023

Densitatea cea mai mare o are compoziția P2 care are și cel mai mare conținut de SiO<sub>2</sub>, dar care conform analizei DLS are cele mai mici diametre medii ale particulelor (215,1 nm), fapt ce justifică valoarea crescută a densității. Celelalte probe P1, P3, P4 au densități apropiate ca valoare, cu o ușoară creștere în cazul probei P3 care se poate datora faptului că are cel mai mare conținut de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (9%).

Dintre biosticlele dopate cu argint, densitatea maximă o are proba PA2, echivalenta compozițională a probei P2, dar care nu se bazează pe conținutul mare de SiO<sub>2</sub> deoarece în cazul acestor compoziții, cu excepția probei PA1 (47% SiO<sub>2</sub>), toate cele trei probe au același conținut de SiO<sub>2</sub> (50% SiO<sub>2</sub>). Nici conținutul de metal dopant nu este cauza creșterii densității probei PA2 deoarece un conținut maxim de Ag<sub>2</sub>O (5%) are și proba PA4, dar care are densitatea cea mai mică dintre toate compozițiile dopate cu argint.

Conform analizei TG sticla de compoziție PA2, este cea mai stabilă din punct de vedere termic (pierdere de masă 0,64%), iar analiza DLS indică cele mai mari diametre medii ale particulelor dintre toate compozițiile de sticlă sintetizate (4407,6 nm) ceea ce se poate corela cu o duritate ridicată a sticlei.

Sticlele dopate cu ioni de cupru PC1 și PC2 au densități direct proporționale cu conținutul de metal dopant.

Densitatea sticlelor fosfocalcice sintetizate prin topire (tabelul 5.6) a fost determinată pe principiul dezlocuirii unui volum de lichid de către o masă cunoscută de material vitros (principiul balanței Mohr – Westphal sau al lui Arhimede). Rezultatul determinărilor este prezentat în tabelul 6.5.

*Tabelul 6.5 Densitatea relativă a sticlelor obținute prin topire*

Proba	Densitate [g/cm <sup>3</sup> ]
<b>45S5</b>	2,5839
<b>TAg</b>	1,7933
<b>TCu</b>	2,4818

Cea mai mare densitate dintre sticlele sintetizate prin topire o are compoziția Hench 45S5, nedopată, urmată de compoziția dopată cu cupru - TCu și de cea dopată cu argint - TAg.

Densitățile probelor dopate sunt considerabil diferite între ele deși cantitatea de metal dopant este aceeași (5%). Acest lucru poate fi pus pe seama precursorilor folosiți pentru dopare pentru fiecare dintre compoziții, dar și de natura metalului dopant. Toate cele trei sticle sintetizate prin topire au densități supraunitare.

## 6.7 Studiul determinării compoziției chimice elementare a sticlelor fosfocalcice prin spectroscopie cu fluorescență de raze X (WD-XRF)

Determinarea cantitativă a compoziției chimice a sticlelor fosfocalcice sintetizate este un aspect important pentru evaluarea globală a tehnicilor de sinteză adoptate, a parametrilor de lucru aleși, a precursorilor utilizați și a modului în care au fost calculate compozițiile teoretice.

Rezultatele analizelor WD-XRF ale sticlelor fosfocalcice neimersate în lichid uman simulant sunt prezentate în continuare sub formă de histograme la care am atașat tabele cu compozițiile teoretice și practice.

În figura 6.12, a – d, sunt prezentate comparativ compozițiile teoretice și cele reale ale sticlelor fosfocalcice ternare sintetizate prin **tehnica sol-gel**: P1 (fig. 6.12.a), P2 (fig. 6.12.b), P3 (fig. 6.12.c) și P4 (fig. 6.12.d).

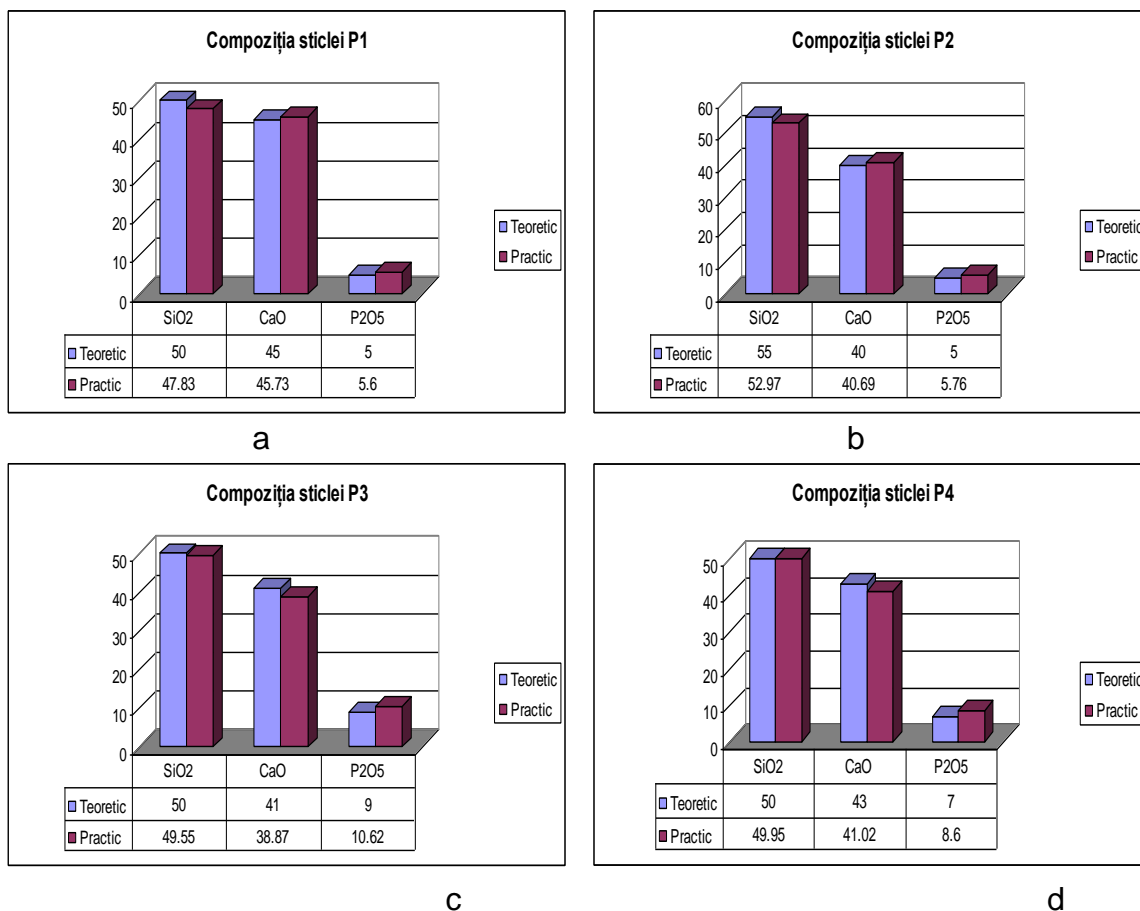


Figura 6.12 Histogramele compozițiilor sticlelor fosfocalcice ternare P1 (a), P2 (b), P3 (c) și P4 (d)

Toate randamentele de sinteză ale sticlelor nedopate sintetizate prin tehnica sol-gel sunt superioare celor indicate în literatură, cel mai mic este cel al sticlei P1 (92,4%) și

cel mai mare este cel al sticlei P4 (95,4%), cu compoziția teoretică optimă în toți oxizii, așa cum indică datele din literatură.

În concluzie, ruta tehnologică adoptată pentru sinteza sol-gel a sticlelor nedopate este corect aleasă și rezultatele sunt reproductibile pentru compozițiile de sticle fosfocalcice studiate în această teză.

Probele de sticlă PA1 și PA3 cu un conținut de circa 3%  $\text{Ag}_2\text{O}$  au randamente de sinteză asemănătoare, de 97,5%, respectiv 97,2% apropiate de randamentul teoretic, în timp ce compozițiile PA2 și PA4 care au 6,2% și respectiv 6,46%  $\text{Ag}_2\text{O}$  au randamente ideale de 100%, ca și sticla PC1, respectiv 99,3% sticla PC2.

Se poate concluziona că creșterea conținutului de metal în compoziția sticlei duce la o creștere proporțională a randamentului de sinteză a materialelor vitroase, deși apar abateri importante în structura rețelei vitroase, de natură a influența proprietățile biofuncționale ale acestora.

Randamentele proceselor de sinteză sunt net superioare în cazul probelor în care s-au introdus ioni de argint, prin urmare metoda de sinteză sol-gel descrisă în cadrul tezei se pretează cu succes la obținerea de sisteme cuaternare, respectiv de sticle dopate cu argint.

Rezultatele analizelor WD-XRF confirmă faptul că rutele tehnologice adoptate pentru sinteza sol-gel sunt bine alese, parametrii de lucru sunt bine aleși și per ansamblu, metoda are o foarte bună repetabilitate.

Sinteza sticlelor fosfocalcice **prin topire** nu este o tehnică la fel de versatilă și de reproductibilă ca metoda sol-gel deoarece controlul stoechiometric al compoziției este dificil de realizat, iar introducerea unor metale dopante presupune adoptarea unor diagrame de topire diferite față de cele ale sticlelor nedopate pentru a ajunge la randamente de sinteză comparabile.

La sinteza prin topire se impune utilizarea unor echipamente de înaltă calitate care să reducă riscul impurificării probelor pe parcursul procesării.

## **6.8 Studiul bioactivității sticlelor fosfocalcice prin analiza de difracție de raze X (XRD)**

Literatura de specialitate confirmă în unanimitate că formarea structurilor cristaline de hidroxiapatită stoechiometrică și nestoechiometrică (carbonată) la suprafața biomaterialelor după imersarea în fluide biologice simulate este asociată cu proprietatea acestora de a fi bioactive

În vederea realizării cercetărilor privind bioactivitatea sticlelor fosfocalcice sintetizate, acestea au fost imersate în LUS cu  $\text{pH} = 7,2 - 7,25$  și termostatate la  $37^\circ\text{C}$  timp de 3, 7, 14 și 21 de zile.

Analiza XRD indică faptul că înainte de imersare toate sticlele sintetizate au o structură preponderent amorfă, însă funcție de compoziție pot prezenta și formațiuni cristaline. Astfel, compozițiile P1, P3, P4 și PA3 au o structură de sticle ceramice (vitroceramice) datorită prezenței unor picuri de HAp în difractograme.

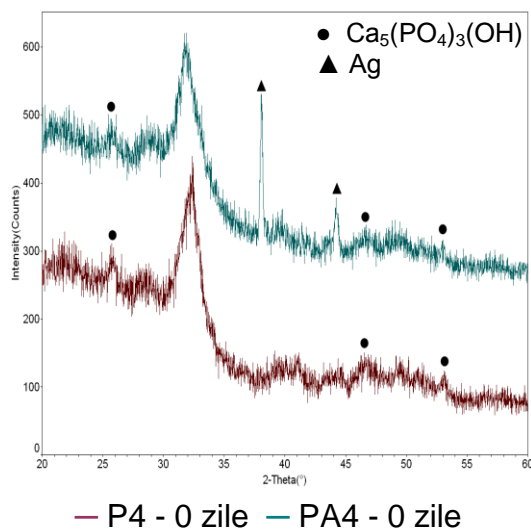
Majoritatea sticlelor prezintă picuri de carbonat de calciu, toate sticlele dopate cu argint prezintă AgCl, iar cele dopate cu cupru prezintă formațiuni cristaline de tenorit.

Prezența acestor compuși cristalini înainte de imersare nu influențează negativ bioactivitatea sticlelor.

Sticla PA4 are în structura vitroasă, pe lângă celelalte faze cristaline și Ag metalic, ceea ce-i conferă o structură de sticlă ranforsată (sticlă vitroceramică cu fază compozită).

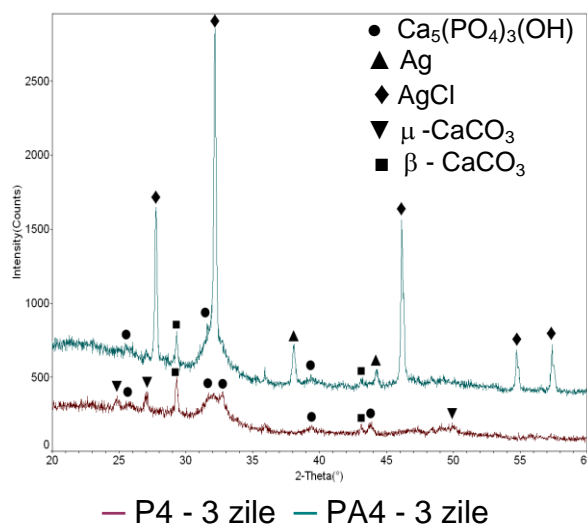
Toate compozițiile sintetizate prin tehnica sol-gel prezintă bioactivitate după primele 3 zile de imersare și ating un maxim după 14 zile de imersare statică în LUS.

Pentru a evidenția acest aspect, în figurile 6.33 – 6.36 sunt prezentate difractogramele probelor perechi compoziționale P4 –PA4, neimersate și imersate timp de 3, 7 și 14 zile în lichid uman simulant.



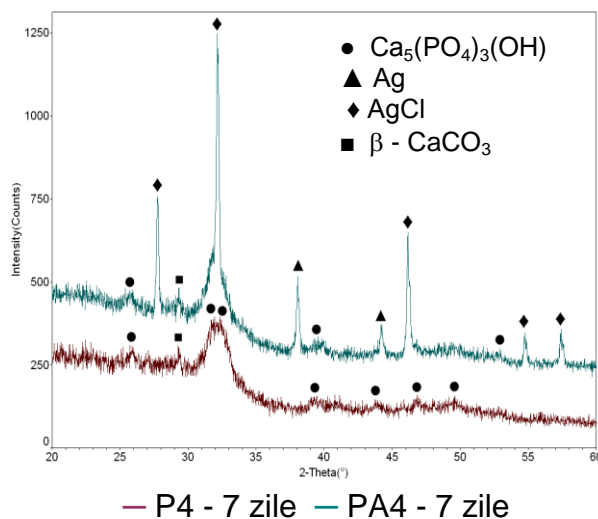
6.33

Figura 6.33 Difractogramele probelor P4 și PA4 neimersate în LUS



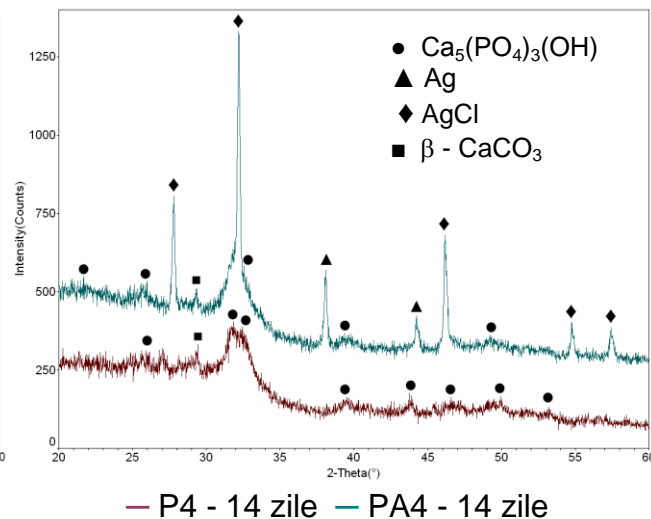
6.34

Figura 6.34 Difractogramele probelor P4 și PA4 imersate timp de 3 zile în LUS



6.35

Figura 6.35 Difractogramele probelor P4 și PA4 imersate timp de 7 zile în LUS



6.36

Figura 6.36 Difractogramele probelor P4 și PA4 imersate timp de 14 zile în LUS

Procentul de oxid metalic din compoziția sticlelor dopate cu argint sau cupru nu influențează comportamentul bioactiv al acestora, însă argintul influențează prin proporția sa și prin forma în care se găsește ( $\text{Ag}^+$  sau  $\text{Ag}^0$ ) structura sticlei: vitroasă, vitroceramică sau de natură compozită (în cazul în care se găsește redus, ca argint metalic, în sticlele cu 5%  $\text{Ag}_2\text{O}$ ).

Investigațiile XRD duc la concluzia generală că toate cele 10 compoziții de sticle sintetizate prin tehnica sol-gel și analizate, atât cele ternare, cât și cele dopate cu argint sau cupru sunt bioactive și generează noi formațiuni de hidroxiapatită postimersare în lichid uman simulat, la suprafața sticlelor încă din primele 3 zile și ating un maxim de bioactivitate după 14 zile de imersare.

În urma analizei XRD se constată că nivelul de bioactivitate al sticlei 45S5 sintetizate prin topire, analizat până la 30 de zile de imersare, este net inferior celui al sticlelor sintetizate prin tehnica sol-gel, deoarece primele semne de bioactivitate apar abia după 14 zile.

Anularea bioactivității la sticlele dopate TAg și TCu se poate datora impurităților din structura sticlei, decelate la determinarea compoziției chimice oxidice prin analiza de fluorescență de raze X - WD-XRF la care sticlele au fost supuse sau conținutului de peste 1% metal dopant, așa cum indică datele identificate în literatură.

Sinteza sticlelor fosfocalcice prin topire nu este o tehnică la fel de versatilă și reproductibilă ca tehnica sol-gel și că modificări minime de compoziție pot schimba radical comportamentul bioactiv al materialului fosfocalcic.

În concluzie, procentul de oxid al materialului dopant din compoziția sticlelor dopate cu ioni metalici, respectiv 3% și 5% nu anulează bioactivitatea sticlelor fosfocalcice dopate sintetizate prin tehnica sol-gel, însă în mod cert influențează celelalte proprietăți fizico-chimice, dar și proprietățile lor biofuncționale (antimicrobiene, cicatrizante, antiinflamatoare).

#### **6.9 Studiul bioactivității sticlelor fosfocalcice prin analiza de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)**

Investigațiile FTIR asupra sticlelor fosfocalcice ternare și a celor dopate cu argint sau cupru confirmă rezultatele analizei prin difracție de raze X, și anume că toate compozițiile probelor sintetizate sunt bioactive și că doparea cu argint sau cupru nu anulează proprietatea de bioactivitate a acestora, unul dintre obiectivele urmărite în cadrul acestei teze.

Modificările la interfața biomaterial – lichid uman simulat sunt sesizabile din spectrele FTIR încă după primele 3 zile de imersare, însă sunt mult mai evidente după 14 zile de la aceasta.

În plus față de analiza XRD, prin FTIR a putut fi confirmată și formarea de hidroxiapatită carbonată, pe lângă cea stoechiometrică, aspect evidențiat prin prezența picurilor și a benzilor scurte de absorbție specifice grupărilor carbonat și a benzilor de apă de cristalizare și asociată HAp și HApC, așa cum a fost prezentat mai sus.

Analiza prin spectroscopie în infraroșu confirmă rezultatul analizei XRD, conform căruia sticla 45S5 sintetizată prin topire este bioactivă, însă după o perioadă mai mare de imersare (14 zile) în LUS, comparativ cu sticlele obținute prin metoda sol-gel.

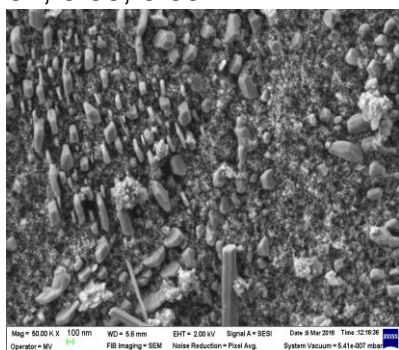
Întrucât literatura de specialitate oferă extrem de puține informații privind caracterizarea FTIR a materialelor fosfocalcice dopate cu ioni metalici, obținute prin topire, numeroase numere de undă marcate pe spectre nu au putut fi atribuite.

#### **6.10 Studiul morfologic al suprafeței sticlelor fosfocalcice sintetizate prin tehnica sol-gel (SEM)**

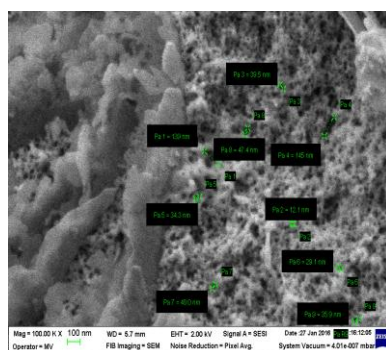
Studiul morfologiei și topografiei suprafețelor sticlelor sintetizate prin tehnica sol-gel indică prezența unor pori de diferite dimensiuni, a unor zone întinse de tip neregulat, rugos, ceea ce este benefic pentru osteogeneză.



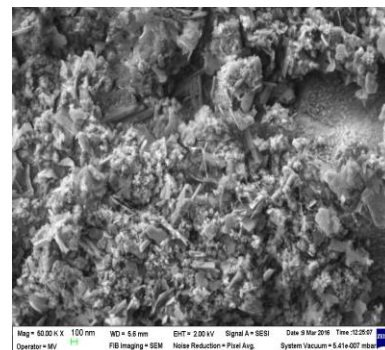
La magnitudini diferite sunt vizibile toate formațiunile identificate prin analiză XRD și FTIR sub forma unor aglomerări micro sau macrocristaline, de diferite intensități luminoase, sub formă de cristalite de diferite forme (sferoide, cubice, aciculare, tetraedrale, etc) și dimensiuni, micro sau nanometrice, așa cum este evidențiat în figurile 6.67, 6.68, 6.69.



6.67



6.68



6.69

*Figura 6.67* Micrografia SEM a sticlei P1 imersată în LUS timp de 14 zile, magnitudine 50.000X

*Figura 6.68* Micrografia SEM a sticlei P2 neimersată în LUS, 100.000X

*Figura 6.69* Micrografia SEM a sticlei P2 imersată în LUS timp de 14 zile, magnitudine 50.000X

Analiza SEM a probelor de sticle ternare și dopate cu ioni de argint sau cupru demonstrează de asemenea, că procesul de dopare nu anulează bioactivitatea sticlelor fosfocalcice sintetizate prin tehnica sol-gel, fenomen confirmat și prin analizele XRD și FTIR din prezenta teză.

Morfologia suprafețelor creează premisele materialelor biologic active la testarea prin imersarea statică in vitro, deoarece acest tip de topografie stimulează osteoinducția prin sinteza de hidroxiapatită și hidroxiapatită carbonată.

### **6.11 Evaluarea activității antibacteriene a sticlelor dopate cu argint sau cupru prin examen microbiologic**

Doparea sticlelor fosfocalcice sintetizate cu ioni ai metalelor tranzitionale face ca acestea să dobândească proprietăți suplimentare, de natură profilactică (antiinflamatoare, cicatrizante, antimicrobiene). În continuare, este prezentat studiul microbiologic efectuat asupra sticlelor dopate în scopul evidențierii caracterului lor antimicrobian și determinării dozei minime bactericide asupra tulpinilor de bacterii luate în studiu.

Pentru realizarea studiului microbiologic al sticlelor dopate cu argint și cupru din sistemul silicofosfocalcic au fost selectate două tulpini de bacterii implicate frecvent în infecțiile intraspitalicești postchirurgicale, una Gram pozitivă și cealaltă Gram negativă. Acestea au fost achiziționate de la societatea Mediclim București, sub formă de culturi pure liofilizate: *Escherichia coli* ATCC reg. 25922 - bacterie Gram negativă, condiționat patogenă, extrem de rezistentă la tratamentul cu antibiotice și *Staphylococcus aureus* ATCC reg 25923 - bacterie Gram pozitivă patogenă, cu cel mai ridicat risc de infecție postoperatorie, în chirurgia de protezare și reconstrucție osoasă [344, 350, 356].

Testarea inițială a sticlelor, pornind de la 0,1 g / ml / 24 h a indicat că această doză este bactericidă pentru ambele tulpini de bacterii, în cazul tuturor sticlelor sintetizate prin tehnica sol-gel.

În urma testelor de tatonare realizate în vederea stabilirii dozelor minime bactericide pentru fiecare compoziție de sticlă și pentru fiecare tulpină, am stabilit că



bacteria Gram negativă (*Escherichia coli*), cu membrană mai subțire de circa 10 ori decât a celei Gram pozitive (*Staphylococcus aureus*) este mai sensibilă la acțiunea ionilor metalici, motiv pentru care testarea *E. coli* s-a realizat pornind de la diluția de bază cu 0,03 g sticlă, iar pentru testarea stafilococului auriu s-a utilizat diluția de bază cu 0,05 g sticlă.

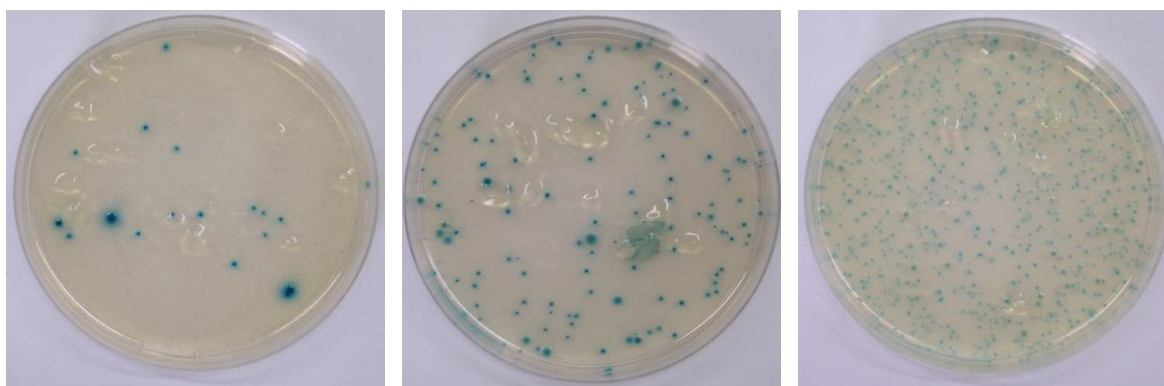
La testarea inițială a capacității bactericide a pulberilor de sticle TAg și TCu la doza inițială de testare de 0,1 g sticlă și 0,1 ml cultură pură din fiecare bacterie, contrar așteptărilor inițiale, ca sticlele să fie biocide, ca și cele sintetizate prin tehnica sol-gel, s-a constatat că plăcile au fost suprainfectate cu colonii specifice fiecărei bacterii.

Dintre toate compozițiile de sticle sintetizate prin tehnica sol-gel, cea mai eficientă din punct de vedere antimicrobian, pentru ambele tulpini de bacterii, este cea dopată cu 5% argint – PA4, cu structură de sticlă ceramică cu fază compozită (sticlă ceramică ranforsată), care prezintă și una dintre cele mai bune stabilități termice și particule cu diametrele medii cele mai mici, conform TG și DLS. Aceasta este mult mai eficientă asupra tulpinii de stafilococ auriu ( $MBC = 5 \times 10^{-7}$ ), decât asupra celei de *E. coli* ( $MBC = 5 \times 10^{-5}$ ).

Comportamentul tulpinilor de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* la diferite diluții decimale ale biosticlelor dopate cu argint sau cupru este asemănător, cu deosebirea că la diferite diluții se dezvoltă un număr diferit de colonii de bacterii, invers proporțional cu concentrația metalului în placă. Acest aspect este reliefat în figurile 6.87, respectiv 6.88.



*Figura 6.87* Plăci cu *Staphylococcus aureus* la diferite diluții ale sticlelor dopate cu argint sau cupru



*Figura 6.88* Plăci cu *Escherichia coli* la diferite diluții ale sticlelor

dopate cu argint sau cupru

Celelalte sticle dopate cu argint sintetizate prin tehnica sol-gel au doze bactericide egale pentru fiecare tip de tulpină, ceea ce arată că doza de metal cu care s-a realizat doparea nu influențează în mod direct proporțional activitatea bacteriostatică a sticlei.

Proba PC1 dopată cu 3% cupru este mai eficientă din punct de vedere antimicrobian decât PC2 cu 5% ioni cuproși, ea având particule de dimensiuni mai mici și o densitate mult mai mică, ceea ce pare să favorizeze difuzia ionilor metalici. Acest lucru este sesizabil doar pentru tulpina de *Staphylococcus aureus* (diferență de un ordin de mărime), deoarece în cazul bacteriei *Escherichia coli* dozele bactericide sunt de același ordin de mărime.

Sticla TAg sintetizată prin topire prezintă doze minime bactericide de același ordin de mărime pentru ambele tulpini de bacterii (10-4 g / ml / 24h).

Sticla dopată cu cupru TCu prezintă o doză bactericidă cu un ordin de mărime mai mic pentru *Staphylococcus aureus* față de *Escherichia coli* ( $5 \times 10^{-4}$  față de  $3 \times 10^{-3}$ ), având deci o eficiență mai bună tot asupra bacteriei Gram pozitive, ca și compoziția PC1.

Ca și concluzie generală a studiului antimicrobian se poate spune că biosticlele dopate cu argint au o activitate antimicrobiană mai eficientă decât cele dopate cu cupru, cu excepția topiturii dopate cu argint, însă pe termen lung, în economia generală a duratei de exploatare a unei grefe sau implant acest aspect poate fi nesemnificativ.

Un procent de 1% sau chiar mai mic cu un ordin de mărime ar putea asigura proprietatea bactericidă a tuturor compozițiilor, fiind optim și pentru păstrarea proprietății de bioactivitate a sticlelor sintetizate prin topire, așa cum s-a arătat la studiul prin difracție cu raze X și prin spectrometrie în IR.

Deoarece compușii cuprului cu care se poate realiza doparea sunt în medie de zece ori mai ieftini decât sărurile de argint folosite la dopare, se poate de asemenea concluziona că biomaterialele dopate cu cupru sunt considerabil mai ieftine și pot asigura un efect antimicrobian comparabil cu al celor dopate cu argint. Acest considerent se poate constitui într-un obiectiv al unei noi direcții de cercetare.

## 7. Concluzii și contribuții proprii

Teza de doctorat **“Sticle fosfocalcice cu proprietăți speciale”** se caracterizează prin următoarele contribuții personale:

a) Toate obiectivele tezei de doctorat au fost îndeplinite cu succes deoarece am reușit să sintetizez sticle fosfocalcice ternare și dopate cu ioni de argint și cupru prin ambele tehnici de sinteză propuse în cadrul obiectivului general al tezei.

b) Tehnica sol-gel a fost utilizată cu succes pentru obținerea sticlelor fosfocalcice simple și dopate cu metale biocide.

c) Deși tehnica sol-gel este un procedeu discontinuu de sinteză, cu durată relativ mare (10 – 12 zile) comparativ cu procedeul clasic de topire, continuu și de scurtă durată, acesta s-a dovedit a fi reproductibil și controlabil atunci când se fac modificări ale compoziției și ale parametrilor de lucru.

d) Modificarea compozițiilor stoechiometrice ale sticlelor sintetizate prin tehnica sol-gel s-a realizat prin substituirea parțială a  $\text{SiO}_2$  sau a  $\text{CaO}$  în vederea realizării dopării cu argint sau cupru. Aceasta a dus la obținerea unor sticle cu faze secundare în structura vitroasă, fără efecte negative asupra bioperformanței.

e) Prezența concomitentă a mai multor faze cristaline în structura unor sticle fosfocalcice sintetizate pentru prezenta activitate de cercetare duce la încadrarea acestora în categoria sticlelor ceramice și a sticlelor ranforsate (cu fază compozită).

▪ Am sintetizat un lichid fiziologic simulat viabil, după o rețetă a lui Kokubo și Takadama revizuită în 2006, numit generic lichid uman simulat.

f) Doparea biosticlelor cu argint și cupru le-a conferit acestora proprietăți antimicrobiene, ceea ce nu s-a observat la sticlele ternare, nedopate.

g) Sticlele sintetizate au compoziții elementale foarte apropiate de cele calculate teoretic, sunt preponderent amorfe și au suprafață specifică mare, caracteristici demonstrate de analizele cărora au fost supuse. Reactivitatea chimică ridicată a fost confirmată prin identificarea cristalitelor de hidroxiapatită formate la interfața sticlă – lichid de testare in vitro prin analiza XRD, FTIR și SEM.

h) Capacitatea antimicrobiană (bactericidă / bacteriostatică) este mai mare în cazul sticlelor dopate cu argint decât în cazul celor dopate cu cupru, asupra ambelor tulpini de bacterii utilizate în studiu, atât Gram pozitive, cât și Gram negative, indiferent de metoda de sinteză. Având în vedere valorile dozelor minime bactericide determinate în cadrul studiului microbiologic efectuat, aceste diferențe privind eficiența antibacteriană tind să scadă, și eventual, pe termen lung să devină neimportante.

i) Deoarece cuprul este de aproximativ 10 ori mai ieftin decât argintul, iar efectele antimicrobiene sunt comparabile, este de dorit continuarea studiilor privind încorporarea de cupru în biomaterialele cu proprietăți profilactice.

În cadrul tezei de doctorat „**Sticle fosfocalcice cu proprietăți speciale,**” au fost aduse următoarele **contribuții personale**:

1) Realizarea unui studiu documentar extins asupra biomaterialelor fosfocalcice, cu precădere asupra sticlelor bioactive, asupra metalelor dopante argint și cupru și a rolului lor terapeutic.

2) Clasificarea biomaterialelor din perspective noi: după proveniență, citotoxicitate, durată și loc de exploatare în organismul uman, funcție și modul de interacțiune cu mediile biologice.

3) Sinteza unor sticle fosfocalcice ternare, cu matrice silicatică dopate cu metale biocide prin tehnica sol-gel și prin topire, la doze de 3% și 5% deși studiile anterioare indicau doar cantități sub 1 – 2%.

4) Doparea cu ioni de cupru a sticlelor este o procedură foarte puțin studiată la nivel mondial, motiv pentru care metodele de sinteză în sine, dar și evaluarea materialelor obținute s-au constituit într-o provocare.

5) Obținerea unor pulberi de sticle cu structură mixtă, ceramică și compozită, ca urmare a variațiilor stoechiometrice compoziționale, dar mai ales a dopării cu metale.

6) Metoda de sinteză sol-gel adoptată pentru sticlele ternare, dar și pentru cele dopate s-a dovedit a fi reproductibilă și a necesitat costuri de producție reduse.

7) Lichidul uman simulat obținut pentru testarea bioactivității sticlelor s-a dovedit a fi viabil, fapt confirmat de formarea apatitei la suprafața pulberilor de sticlă sintetizate prin metoda-sol gel.

8) Am constatat că sticlele dopate sintetizate prin topire și-au pierdut bioactivitatea ca urmare a procentului mare de metal dopant.

9) Am realizat un studiu microbiologic asupra sticlelor dopate cu metale în vederea evaluării proprietăților lor antibactericide.

10) Am realizat o caracterizare completă a tuturor compozițiilor de sticle sintetizate prin metode noi, specifice cercetării materialelor biofuncționale.

11) În cadrul tezei am abordat o arie de cercetare de interes în domeniul biomaterialelor, aflată la granița dintre ingineria materialelor și medicină: doparea cu agenți antibacterieni puternici, domeniu aflat la nivel de pionierat în țara noastră, cu largi perspective de inovare și perfecționare.

### 8. Perspective de cercetare

Pentru extinderea ariei de cercetare din domeniul abordat în prezenta teză de doctorat, în investigațiile viitoare s-ar putea avea în vedere următoarele teme:

- corelarea compoziției chimice și a parametrilor de sinteză cu proprietățile fizico-chimice, dar și biofuncționale ale materialelor sintetizate.
- sinteza sol-gel a unor biosticle cu conținut minim de metal dopant și reluarea testelor microbiologice pentru acestea (max. 1%).
- sinteza unor biosticle dopate cu amestecuri de metale cu rol terapeutic și profilactic, cu acțiune sinergică (Ag, Cu, Zn, Mg, Al, etc) din clasa biosticlelor ranforsate și evaluarea proprietăților lor mecanice.
- realizarea de teste de citotoxicitate pe medii de celule și / sau cu matrice proteică.
- extinderea studiilor microbiologice și la alte tulpini de bacterii aflate în topul celor responsabile de infecțiile intraspitalicești și stabilirea dozelor minime bactericide.

### 9. Bibliografie selectivă

- [7] Contract de cercetare nr. 198/2006, faza I, contractor Univ. de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, România, în cadrul programului CEEX, 2006.
- [12] <https://ro.wikipedia.org/wiki/Biomaterial>
- [13] C. N. Cornell - *Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts*, Ortho. Clin. North Am. 30:591-598, 1999.
- [14] E. C. O. Shors - *Coralline bone graft substitutes*, Ortho. Clin. North Am. 30: 599-613, 1999.
- [15] D. F. Williams – *The Williams Dictionnary of Biomaterials*, Liverpool University Press, 1999.
- [102] L. Floroian, M. Badea, I. Șamotă – *Bioglass – the newest type of biomaterial with great potential of osteointegration*, J. M. B., no. 1, p. 20, 2015.
- [103] A. L. Andrade, P. Valerio, A. M. Goes, M. de Fatima Leite, R. Z. Domingues, J. Of Non-Crystalline Solids, 352:3508 -11, 2006.
- [104] M. G. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers - *Biomaterials*, 26:4903-11, 2005.
- [105] E. Saiz, M. Goldman, J. M. Gomez-Vega, A. P. Tomsia, G. W. Marshall, S. J. Marshall - *Biomaterials*, 23:3749-56, 2002.
- [133] M. M. Pereira, A. E. Clark, L. L. Hench - *Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro*, J Biomedical Material Research, 28:693-698, 1994.
- [156] R. Li, A. E. Clark, L. L. Hench, J. Appl. Biomater. 2, p. 231–239, 1991.
- [180] L. L. Hench, J. K. West - *The sol-gel process*. Chemical Reviews, 90: 33-72, 1990.
- [182] L. L. Hench, D. L. Wheeler, D. C. Greenspan - *Molecular control of bioreactivity in sol-gel glasses*. J Sol-gel Science and Technology, 13:245-250, 1998.
- [189] D. C. Greenspan, J. P. Zhong, Z. F. Chen, G. P. La Torre - *The evolution of degradability of melt an sol-gel derived Bioglass in vitro*, In Bioceramics 10, eds. L. Sedel, C. Rey, pp. 391-394, 1997.
- [190] D. C. Greenspan, J. P. Zhong, D. L. Wheeler - *Bioactivity and biodegradability: Melt vs sol-gel derived Bioglass in vitro and in vivo*, In Bioceramics 11, eds R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, pag. 345-348, 1998.

- [312] A. Rámila, M. Vallet-Regí – *Static and dynamic in vitro study of a sol–gel glass bioactivity*, Biomaterials Vol. 22, 16, p. 2301-2306, 2001.
- [313] S. Falaize, S. Radin, P. Ducheyne - *In vitro behaviour of silica-based xerogels intended as controlled release carriers*, J. Am. Ceram. Soc.; 82, p. 969–976, 1999.
- [314] I. I. Barba, A.J. Salinas, M Vallet-Regí - *Effect of the continuous solution exchange on the in vitro reactivity of a CaO-SiO<sub>2</sub> sol-gel glass*, J Biomed Mater Res, 51, p.191–199, 2000.
- [315] M. G. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers - *An analytical model for the dissolution of different particle size samples of bioglass in TRIS-buffered solution*, Biomaterials, 26, p. 4903–4911, 2005.
- [316] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro - *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W*, J. Biomed. Mater. Res., 24, p. 721-734, 1990.
- [317] M. Mami et al. – *Investigation of the surface reactivity of a sol–gel derived glass in the ternary system SiO<sub>2</sub>–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>*, J. Applied Surface Science, 254, p. 7386–7393, 2008.
- [318] T. Kokubo, H. Takadama - *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* Biomaterials 27. 2907 - 2915, ISSN 0142-9612, 10.1016/ J. Biomaterials, 2006.01.017, 2006.
- [344] **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, V. Bratu - *Obtaining simple and doped phosphocalcic glasses by using sol-gel technique*, JOAM, Vol. 17, No. 7-8, p. 1038 – 1043, July – August 2015.
- [350] **D. Avram**, D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Gheboianu, I. Bancuță, M. G. Bratu - *Study of bioactivity and antimicrobial activity in case of glasses from SiO<sub>2</sub>-CaO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ternary system*, The Scientific Bulletin of Valahia University – Materials and Mechanics – Nr. 10 (year 13), 2015.
- [356] **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, I. Ioniță, A. Gheboianu, I. Bancuță, E. M. Lungulescu - *Study of phosphocalcic glasses SiO<sub>2</sub> - CaO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system with and without silver, part II. The bioactivity analysis by FTIR, SEM methods and microbiological study of silver-doped glasses*, Rev. Ch. Română, vol.68, nr. 6, iunie 2017.

## 10. Lista lucrărilor publicate în domeniul tezei de doctorat

### A. Lista lucrărilor publicate în reviste cotate ISI

15 Lucrări dintre care 6 în domeniul tezei de doctorat

1. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, V. Bratu - *Obtaining simple and doped phosphocalcic glasses by using sol-gel technique*, JOAM, Vol. 17, No. 7-8, p. 1038 – 1043, July – August 2015.
2. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, I. Ioniță, A. Gheboianu, I. Bancuță - *Study of phosphocalcic glasses SiO<sub>2</sub> - CaO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system with and without silver, part I. Synthesis of glasses and characterization by WD- XRF and XRD*, Rev. Ch. Română, vol.68, nr. 5, mai 2017.
3. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, I. Ioniță, A. Gheboianu, I. Bancuță, E. M. Lungulescu - *Study of phosphocalcic glasses SiO<sub>2</sub> - CaO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system with and without silver, part II. The bioactivity analysis by FTIR, SEM methods and microbiological study of silver-doped glasses*, Rev. Ch. Română, vol.68, nr. 6, iunie 2017.
4. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, A. Gheboianu, I. Bancuță, T. Setnescu - *Study on bioactivity of phosphocalcic glasses*, JOAM, Vol. 18, No. 7-8, p. 691-696, July – August 2016.

5. D. N. Ungureanu, **D. Avram**, A. Catangiu, F. A. Anghelina, V. Despa - Characterization of calcium phosphate ceramics obtained by chemical precipitation, JOAM, Vol. 17, No. 7-8, P. 1225 – 1230, Brasov, July – August 2015.

6. D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Catangiu, E. V. Stoian, C. Z. Rizescu, **D. Avram** - Synthesis And Characterization of Bioactive Sol – Gel Glass: A Preliminary Study, Advanced Materials Research Journal, ISSN: 1022 – 6680, DOI:10.4028/www.scientific.net /AMR.341-342.21, Vols. 341-342, p. 21-25, 2012.

### **B. Lista lucrărilor publicate în reviste cotate BDI**

28 de lucrări, dintre care 4 în domeniul tezei de doctorat

1. **D. Avram**, D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Gheboianu, I. Bancuță, M. G. Bratu - *Study of bioactivity and antimicrobial activity in case of glasses from SiO<sub>2</sub>-CaO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ternary system*, The Scientific Bulletin of Valahia University – Materials and Mechanics – Nr. 10 (year 13), 2015.

2. D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Catangiu, E. V. Stoian, C. Z. Rizescu, **D. Avram** - *Synthesis And Characterization of Bioactive Sol – Gel Glass: A Preliminary Study*, Advanced Materials Research Vols. 341-342, p. 21-25, Trans Tech Publications, Switzerland, doi:10.4028/ www.scientific.net /AMR.341-342.21, 2012.

3. D. N. Ungureanu, N. Angelescu, **D. Avram** - *Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of SiO<sub>2</sub> – CaO – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sol – gel glasses highlighted by XRD technique*, The Scientific Bulletin of Valahia University Materials and Mechanics, 6, 9, p.115 – 119, 2011.

4. **D. Avram**, Dan Nicolae Ungureanu, Nicolae Angelescu, Anca Gheboianu, Iulian Bancuta, Magda Gabriela Bratu - *Study of bioactivity and antimicrobial activity in case of glasses from SiO<sub>2</sub>-CaO -P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ternary system*, The Scientific Bulletin of Valahia University – Materials and Mechanics – Nr. 10 (year 13), 2015.

### **C. Lista cărților publicate în edituri recunoscute CNCSIS**

7 cărți dintre care una în domeniul biomaterialelor

1. **Daniela Avram**, Dan Nicolae Ungureanu, Angelescu Nicolae, 2011 - *Materiale bioactive pe baza de fosfati de calciu*, Editura Valahia University Press, Targoviste, ISBN 978-606-603-031-1, 149 pag.



UNIUNEA EUROPEANĂ



MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
EGALITĂȚII DE ȘANSE  
AMPOSDRU



FONDUL SOCIAL EUROPEAN  
POS DRU  
2007-2013



INSTRUMENTE STRUCTURALE  
2007-2013

## ANEXA 9: FORMULAR CV



### Curriculum vitae Europass

#### Informații personale

Nume / Prenume	<b>AVRAM Daniela</b>
Adresă(e)	Logofăt Udriște Năsturel, Nr. 8, Bl 26, Sc.A , Ap. 3, Târgoviște, 130056, Dâmbovița, România
Telefon(oane)	Fix: - Mobil: (+4) 0722145165
E-mail(uri)	avramdana75@yahoo.com
Naționalitate(-ități)	Română
Data nașterii	29.08.1975
Sex	Feminin

#### LOCUL DE MUNCA VIZAT / DOMENIUL OCUPAȚIONAL

Teză doctorat – în curs de susținere publică

#### Experiența profesională

Perioada	<b>Din 2002 până în prezent</b>
Funcția sau postul ocupat	<b>Asistent universitar doctorand inginer la Departamentul Ingineria Produselor Alimentare din cadrul Facultății Ingineria Mediului și Știința Alimentelor</b>
Activități și responsabilități principale	<p>Activități didactice de nivel universitar și activități de cercetare științifică (îndrumare lucrări practice, seminarii la discipline fundamentale din planul de învățământ, îndrumare proiecte tehnologice și de licență, membru în echipele de cercetare ale unor proiecte de cercetare si POSDRU).</p> <p>Susținerea de lucrări de laborator, respectiv proiecte de an și de licență la disciplinele: tehnologia cărnii și preparatelor din carne, procesarea industrială a peștelui, tehnologia uleiurilor vegetale și a derivatelor, tehnologia berii, chimia alimentelor, operații și aparate în industria alimentară, fenomene de transfer, tehnologia făinurilor alimentare, igienă și toxicologie acvatică, tehnologia vinurilor, etc.</p> <p>Elaborare de cărți universitare (8 cărți ), îndrumare de lucrări practice de laborator, culegere de probleme și îndrumare de proiectare pentru disciplina operații și aparate în industria alimentară.</p> <p>Îndrumarea practicii în producție a studenților în unitățile de producție din industria alimentară.</p>

Numele și adresa angajatorului	<b>Universitatea Valahia din Târgoviște</b> , bvd. Regela Carol I, nr.2, Târgoviște, Dâmbovița, România Tel: (+4) 0245 206 101 – Fax (+4) 0245 217 692 – E-mail: <a href="mailto:rectorat@valahia.ro">rectorat@valahia.ro</a> Website: <a href="http://www.valahia.ro">http://www.valahia.ro</a>
Tipul activității sau sectorul de activitate	Învățământ superior
Perioada	<b>1 martie 1999 – 1 octombrie 2002</b>
Funcția sau postul ocupat	<b>Preparator universitar la Catedra de Chimie din cadrul Facultății de Științe și Arte</b>
Activități și responsabilități principale	Susținerea de lucrări de laborator la disciplinele: chimie analitică, chimie organică, chimie fizică și coloidală, chimie tehnică.
Numele și adresa angajatorului	<b>Universitatea Valahia din Târgoviște</b> , blvd. Regela Carol I, nr.2, Târgoviște, Dâmbovița, România Tel: (+4) 0245 206 101 – Fax (+4) 0245 217 692 – E-mail: <a href="mailto:rectorat@valahia.ro">rectorat@valahia.ro</a> Website: <a href="http://www.valahia.ro">http://www.valahia.ro</a>
Tipul activității sau sectorul de activitate	Învățământ superior
<b>Educație și Formare</b>	
Perioada	<b>August 2014</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de competente profesionale</b> seria D, Nr. 049029, pentru ocupatia <b>Formator</b> , in conformitate cu standardul ocupational, cod COR 242401.
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Competente dobândite: Pregatirea formarii; realizarea activitatilor de formare; evaluarea participantilor la formare; aplicarea metodelor si tehnicilor speciale de formare; marketingul formarii; proiectarea programelor de formare; organizarea programelor si a stagiilor de formare; evaluarea, revizuirea si asigurarea calitatii programelor si stagiilor de formare.
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Centrul de evaluare si certificare Asociatia „Inapoi la munca,, (ASIM).
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Nationala
Perioada	<b>Mai 2014</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de absolvire No. 00362427, a programului de specializare pentru ocupatia - Manager de proiect, cod COR 242101</b> , în cadrul proiectului „Îmbunătățirea capacității beneficiarilor de a implementa proiecte finanțate din Instrumente Structurale”, Proiect co-finanțat din Fondul European de Dezvoltare Regională prin POAT 2007 - 2013 – <i>în curs de emitere</i>
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Discipline specifice Managementului Proiectelor. Competente dobândite: Stabilirea scopului si obiectivelor proiectului, planificarea activitatilor si jaloanelor proiectului, gestiunea utilizarii costurilor si resurselor operationale, managementul comunicarii, managementul calitatii proiectului,etc.
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Structural Consulting Group București în colaborare cu Archidata SRL Italia , acreditat de Ministerul Educației Naționale, Ministerul Muncii, Familiei, Protecției sociale și Persoanelor Vârstnice și Autoritatea Națională pentru Calificări.
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Noiembrie 2013</b>



Calificarea / diploma obținută	<b>Diplomă de participare și absolvire a "Programului de instruire în domeniul Managementului Calității în Învățământul Superior"</b> în cadrul proiectului POSDRU / 86 / 1.2 / S / 60720, „Dezvoltarea și implementarea unui sistem de monitorizare, îmbunătățire continuă și evaluare a calității în învățământul superior deschis și la distanță pe baza indicatorilor de performanță și standardelor internaționale de calitate „
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Noțiuni și standarde specifice Managementului Calității în Învățământul Superior
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea Spiru Haret, București, România în parteneriat cu Academia Comercială din Satu Mare, TEHNE- Centrul pentru Dezvoltare și Inovare în Educație și TUV Austria – România
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Noiembrie 2013</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de absolvire</b> pentru „Programul de formare și conștientizare în asigurarea calității în Învățământul la Distanță – ID” în cadrul proiectului POSDRU / 86 / 1.2 / S / 60720, „Dezvoltarea și implementarea unui sistem de monitorizare, îmbunătățire continuă și evaluare a calității în învățământul superior deschis și la distanță pe baza indicatorilor de performanță și standardelor internaționale de calitate “
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Noțiuni și standarde specifice asigurării calității în învățământul superior
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea Spiru Haret, București, România în parteneriat cu Academia Comercială din Satu Mare și TUV Austria – România
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Aprilie 2012</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Diplomă de participare</b> la Sesiunile de formare „Elaborarea și furnizarea unui program de instruire pentru personalul universităților pentru utilizarea instrumentelor TIC, precum și pentru îndrumarea studenților cu dizabilități în utilizarea curentă a acestora ” în cadrul proiectului „Dezvoltarea și implementarea unui program-pilot integrat pentru creșterea accesului la învățământul superior pentru persoane” cu dizabilități ”, <b>contract POSDRU / 86 / 1.2 / S / 63951</b>
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Discipline specifice tehnologiei informației și comunicării
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	SC The Red Point SA, Iași, Ministerul Educației, Cercetării și Sportului, România
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Martie 2012</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Diplomă de participare</b> la „Programul de formare pentru mentoratul educațional al studenților cu dizabilități, adresat personalului didactic al universităților partenerie (implicat în dezvoltarea programelor de studii universitare), al partenerilor, precum și personal al partenerilor sociali în educație ” în cadrul proiectului „Dezvoltarea și implementarea unui program-pilot integrat pentru creșterea accesului la învățământul superior pentru persoane” cu dizabilități ”, <b>contract POSDRU / 86 / 1.2 / S / 63951</b>
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Psihologia educației, Pedagogia educației persoanelor cu dizabilități, Inițiere în patologia și manifestarea clinică a bolilor cronice și degenerative, Legislație actuală privind drepturile persoanelor cu dizabilități
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Ministerul Educației, Cercetării și Sportului, România
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Martie 2011</b>

Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de absolvire</b> pentru absolvirea cursului „ <b>Metode inovative de predare e-Learning</b> ”, în cadrul proiectului „ <i>Dezvoltarea performanțelor de cercetare aplicativă pentru personalul din învățământul superior în domeniul Protecției Mediului și al Siguranței alimentare</i> ”, <b>contract POSDRU 19/ 1.3 / G/ 8867</b>
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Inițiere în e-Learning, Interacțiune cursant-tutor în procesul de predare învățare, Elaborarea, testarea și evaluarea materialelor didactice multimedia, Tehnologii educaționale, echipamente și metode specifice sistemului e-Learning, Arhitecturi software de principiu, limbaje de programare, etc; Aptitudinea de a lucra independent în practicarea tehnicilor e-Learning
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	U.S.A.M.V București, Catedra UNESCO #177 de Dezvoltare Rurală Integrată
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Martie 2011</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de absolvire</b> pentru absolvirea cursului „ <b>Introducere în IBM SPSS Statistics și în statistică</b> ”, în cadrul proiectului „ <i>Dezvoltarea performanțelor de cercetare aplicativă pentru personalul din învățământul superior în domeniul Protecției Mediului și al Siguranței alimentare</i> ”, <b>contract POSDRU 19/ 1.3 / G/ 8867</b>
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Noțiuni de prelucrare a datelor, statistică
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Centrul de training IT ROMSYM,București
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național, cod RSPSSIntro +Stats
Perioada	<b>Februarie 2011</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de calificare</b> în domeniul <b>Food Science</b> în cadrul proiectului " <i>Developing the applicative research performances for the higher education personnel in the field of environmental protection and food safety</i> ", <b>contract POSDRU 19/ 1.3 / G/ 8867</b>
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Tehnici de cercetare în domeniul tehnologiilor alimentare
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea din Molise, Campobasso, Italia
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Internațional
Perioada	<b>Iulie 2009</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de competență lingvistică-limba engleză</b>
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Competență de înțelegere a discursului oral, Competență de exprimare orală, Competență de citire și înțelegere a textului scris, Competență de exprimare scrisă
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea "Valahia" din Târgoviște
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Octombrie 2005</b>
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de absolvire</b> a Școlii de Vară „ <b>Biotehnologii. Patologie si farmacologie moleculară</b> „,- Universitatea de Vest Vasile Goldiș din Arad
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Tehnici moleculare de studiu în patologie. Abilități în utilizarea echipamentelor moderne de analiză
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Vest Vasile Goldiș din Arad, România
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național
Perioada	<b>Februarie 2004</b>

Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de absolvire</b> în domeniul „ <b>Pregătirea teoretică și practică în specialitatea: modalități de acordare de asistență tehnică de specialitate și consultanță pentru industria alimentară, noțiuni de H.A.C.C.P., efectuarea de analize fizico-chimice și microbiologice de control pentru produsele alimentare</b> ”							
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Metode clasice și moderne de analiză fizico-chimică și microbiologică a produselor alimentare. Noțiuni de implementare a sistemului H.A.C.C.P. în industria alimentară. Consultanță și implementare a sistemului de calitate H.A.C.C.P. în unitățile de industrie alimentară.							
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	S.C.Institutul de Cercetari Alimentare S.A. București							
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național							
Perioada	<b>2002-2003</b>							
Calificarea / diploma obținută	<b>Certificat de absolvire</b> a studiilor de calificare în <b>modulul psiho-pedagogic</b> organizat de <b>Departamentul pentru Pregătirea Personalului Didactic</b>							
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	<b>Psihologia educației</b> , Introducere în pedagogie, Teoria și metodologia curriculumului, <b>Teoria și metodologia instruirii, Teoria și metodologia evaluării</b> , Didactica specialității, Practică pedagogică, <b>Sociologia educației</b> , Managementul clasei de elevi							
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea Valahia din Târgoviște, Ministerul Educației și Cercetării, România							
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Național							
Perioada	<b>1993-1998</b>							
Calificarea / diploma obținută	<b>Diplomă de inginer- specializarea: Tehnologia Prelucrării Produselor Agricole</b>							
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Discipline fundamentale (biochimia și microbiologia produselor alimentare, chimie anorganică, chimie organică, chimie fizică și coloidală, procese și aparate în industria alimentară) Discipline de specialitate ( <b>toate tehnologiile alimentare</b> )							
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea “Valahia” din Târgoviște, Facultatea Știința Materialelor și Tehnologii, România, Bd. Unirii nr. 18-20, Tel : (+4) 0245-206108, FAX : (+4) 0245-206108, Website: <a href="http://www.fimbvalahia.ro">http://www.fimbvalahia.ro</a>							
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	ISCED 5							
<b>Aptitudini și competențe personale</b>								
Limba(i) maternă(e)	<b>Limba Română</b>							
Limba(i) străină(e) cunoscută(e)								
Autoevaluare								
Nivel european (*)								
<b>Limba Franceză</b>								
<b>Limba Engleză</b>								

(\*) Nivelul Cadrului European Comun de Referință Pentru Limbi Străine

Competențe și abilități sociale	<p>Activitate socială intensă, cu receptivitate la nou, alternând munca individuală cu munca în echipă, în funcție de specificul și cerințele diverselor activități.</p> <p>Capacitate de comunicare foarte bună, dobândită ca urmare a experienței profesionale.</p> <p>Capacitate de adaptare la medii culturale diverse, dobândită ca urmare a participării la conferințe naționale și internaționale.</p>
Competențe și aptitudini organizatorice	<p>Organizarea și coordonarea colectivelor studențești în activitatea didactică și de cercetare științifică.</p> <p>Organizarea lucrărilor practice la disciplinele fundamentale și de specialitate din programele de studiu.</p> <p>Putere de muncă, asiduitate, conștiinciozitate, adaptabilitate la nou, răbdare și putere de înțelegere, tact pedagogic.</p> <p>Organizarea cercurilor științifice studențești.</p> <p>Responsabilități privind achiziționarea și gestionarea reactivilor toxici și uzuali.</p>
Competențe și aptitudini tehnice	<p>Utilizare calculator - aptitudine dobândită prin studiu individual și exercițiu dar și prin cursuri parcurse ulterior în domeniul statistică, e+learning, TIC, etc.</p> <p>Utilizarea echipamentelor clasice și moderne specifice de determinare a compoziției alimentelor și a contaminanților acestora (spectrofotometru, cromatograf, WD-XRF, XRD, SEM etc.)</p> <p>Cunoașterea proceselor de control a calității produselor alimentare și implementarea sistemului de siguranță a alimentelor (HACCP- Analiza hazardului. Puncte critice de control. Examen microbiologic.)</p>

## Informații suplimentare

- Responsabil cu achiziționarea și gestionarea reactivilor toxici și uzuali, la nivelul Departamentului Ingineria Produselor Alimentare din cadrul Facultății de Ingineria Mediului și Știința Alimentelor, Universitatea Valahia Târgoviște
- Membră a **Societății de Chimie din România**
- Membră a **Centrului de Cercetare Științifică pentru Biotehnologii și Științe ingineresti aplicate din Universitatea Valahia din Târgoviște** (Centrul de Cercetare tip B - Certificat CNCIS nr.72 București, 2 iunie 2005)

### Publicații

#### Cărți, monografii și materiale de studiu

1. Bratu M., **Avram D.** – Chimia și analiza alimentelor, Editura Printech, București, **2006**, ISBN 973-718-437-8, 978-973-718-437-5, 171 pag. **42,75**
2. Buruleanu, **D. Avram**, **2009**, Calcule de operații și aparate în industria alimentară, *Ed. Bibliotheca, Târgoviște*, ISBN 978-973-712-440-1, 290 pag. **72,5**
3. L. Buruleanu, **D. Avram**, **2009**, Operații cu transfer de căldură în industria alimentară, *Ed. Printech, București*, ISBN 978-606-521-312-8, 192 pag. **48**
4. L. Buruleanu (coord.), C.L. Nicolescu, I. Manea, M.G. Bratu, **D. Avram**, C.E. Popescu, **2008**, Aspecte biochimice, microbiologice și tehnologice ale conservării sucurilor de legume prin fermentație lactică, *Ed. Bibliotheca, Târgoviște*, ISBN 978-973-712-348-0, 285 pag. **12,51**
5. Iuliana Manea, **Daniela Avram** -Aditivi și auxiliari alimentari, Ed. Printech, București, 2008, ISBN 978-606-521-183-4, 170 pag. **42,5**
6. **Daniela Avram**, Dan Nicolae Ungureanu, Angelescu Nicolae, 2011 - *Materiale bioactive pe baza de fosfați de calciu*, Editura Valahia University Press, Targoviste, ISBN 978-606-603-031-1, 149 pag. **24,83**
7. Lavinia Buruleanu, Iulia Manea, Andreea Georgescu, **Daniela Avram**, 2011 - *Proteine functionale*, Editura Valahia University Press, Targoviste, ISBN 978-606-603-024-6 pag. **18,25**
8. Buruleanu L(coord), C.L.Nicolescu, I.Manea, Bratu M.G., **Avram D** - Lactic Acid Bacteria (un capitol în vol internațional) – „Lactic acid fermentation of Lactobacillus Acidophilus” - 35 pag **7**

**Articole susținute și publicate în reviste de specialitate și în volumele manifestărilor naționale și internaționale** - peste 45 lucrări, dintre care 9 cotate / indexate ISI

Din 2003-prezent - membru în echipa de cercetare a 8 proiecte și granturi, câștigat prin competiții și 2 proiecte POSDRU.

**Lucrări / proiecte de diplomă / licență coordonate în domeniul industriei alimentare** – peste 50 lucrări publicate, peste 40 proiecte de diplomă.

Data:  
27 iulie 2017

Semnătura,  
Asistent univ. drd. ing. Daniela Avram



**MINISTERUL EDUCAȚIEI NAȚIONALE  
UNIVERSITATEA VALAHIA DIN TÂRGOVIȘTE  
FACULTATEA DE INGINERIA MATERIALELOR  
ȘI MECANICĂ  
Domeniul: INGINERIA MATERIALELOR**

**BRIEF  
Thesis  
PHOSPHOCALCIC GLASSES WITH  
SPECIAL PROPERTIES**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:  
Prof. univ. dr. Honoris Causa Nicolae ANGELESCU**

**DOCTORAND:  
Asist. univ. ing. Daniela ȘTEFAN  
(AVRAM)**

**TÂRGOVIȘTE  
2017**

## Brief Contents

1. The content of the PhD thesis.....	3
2. Keywords .....	5
3. Introduction.....	6
4. Purpose and objectives of the PhD thesis.....	7
5. Presentation of the thesis structure.....	8
6. Own experimental research.....	9
6.1 Investigational techniques used in the study .....	9
6.2 Synthesis of Phosphocalcic Glasses.....	10
6.3 Obtaining Kokubo - Takadama Simulant Human Liquid.....	16
6.4 Thermal analysis of phosphcalcic glasses synthesized by sol-gel method....	16
6.5 Study by dimensional and granulometric distribution analysis of the glasses synthesized by sol-gel technique.....	18
6.6 Determination of relative density of synthesized glasses.....	19
6.7 Study of elemental chemical composition determination of phosphocalcic glasses by X-ray fluorescence spectroscopy (WD-XRF).....	20
6.8 Study of phosphocalcic glasses bioactivity by X-ray diffraction analysis (XRD).....	21
6.9 Study of phosphocalcic glasses bioactivity by spectroscopy analysis in Fourier transform infrared (FTIR) .....	24
6.10 Morphological study of the surface of phosphocalcic glasses synthesized by sol-gel technique.....	24
6.11 Evaluation of the antibacterial activity of doped silver or copper glasses by microbiological test.....	25
7. Conclusions and own contributions .....	27
8. Research perspectives .....	28
9. Selective bibliography.....	29
10. List of papers published in the field of PhD thesis.....	30

In this Brief of the PhD Thesis:

\* the contents are according to the theses;

\*\* the figures and tables keep the numbering in the sentence;

\*\*\* the indicated bibliography is selective.

## 1. The content of the PhD thesis

List of tables .....	iv
List of figures.....	v

### THE STAGE OF KNOWLEDGE

1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Brief history of glass.....	2
1.2 Purpose and objectives of the PhD thesis .....	5
1.3 Description of the thesis chapters .....	7
1.4 Bone tissue. Bone modeling, reconstruction and prosthesis.....	8
1.4.1 Long bone structure and anatomy .....	9
1.4.2 Bone modeling, reconstruction and prosthesis.....	11
2. BIOMATERIALS - THE ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE.....	15
2.1 Definition of biomaterials.....	15
2.2 Classification of biomaterials.....	16
2.3 Clinical applications of biomaterials .....	18
2.4 Calcium Phosphates - Biocompatible Materials.....	21
2.4.1 Classification of bioactive phosphocalcic materials.....	22
2.4.2 Bioactivity of phosphocalcic materials between bioconduction and bioinduction .....	25
2.4.2.1 Hydroxyapatite .....	26
2.4.2.2 Calcium phosphates.....	28
2.4.2.3. Ceramic, vitroceramic and calcium phosphate composites .....	30
2.4.2.4 Cements and coatings based on calcium phosphate .....	31
3. PHOSPHOCALIC GLASSES.....	33
3.1 Structural and compositional characteristics of biocompatible glasses.....	34
3.1.1 Structure of phosphocalcic glasses.....	34
3.1.2 Influence of the chemical composition on the glass bioactivity .....	37
3.2 Synthesis of biocompatible glasses .....	41
3.2.1 Method of melting oxidic mixture components .....	41
3.2.1.1 Compositions of phosphocalcic glasses obtainable by melting.....	45
3.2.2 Sol-gel synthesis method.....	47
3.2.3 Other synthesis methods of biocompatible glasses.....	51
3.2.4 New methods of synthesis vs. traditional methods.....	53
3.3 Bioperformance of phosphocalcic glasses obtained by sol-gel method.....	55



3.3.1 Bioperformance dynamic process.....	56
3.3.2 Bioactivity of phosphocalcic glasses - the mechanism of hydroxyapatite formation on the bioglass surface .....	60
3.3.3 Factors influencing bioactivity and biodegradation of phosphocalcic glasses.....	63
3.4 Phosphocalcic glasses with antimicrobial properties.....	66
3.4.1 Nosocomial infections and pathogenic micro-organisms involved .....	67
3.4.2 Antimicrobial property of silver and copper.....	70
3.5 Solutions used for in vitro testing of bioactivity of phosphocalcic materials.....	75
3.5.1 Stages of Kokubo Simulating Human Liquid.....	78
 <b>OWN CONTRIBUTIONS - EXPERIMENTAL PART</b>	
4. INVESTIGATION TECHNIQUES USED IN THE STUDY.....	80
4.1. X-ray Fluorescence Spectroscopy (WD-XRF).....	81
4.2. X-ray Diffraction (XRD).....	81
4.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	82
4.4. Scanning Electronic Microscopy (SEM).....	83
4.5 Thermogravimetric analysis (TGA) coupled with differential scanning calorimetry (DSC).....	83
4.6 Dimensional analysis and granulometric distribution by the dynamic diffusion of pulsed laser light (DLS) .....	84
4.8 Determination of relative density of glasses.....	84
4.8 Microbiological techniques used in the study.....	85
5. SYNTHESIS OF PHOSPHOCALCIC GLASSES .....	89
5.1 Synthesis of phosphocalcic glasses by sol-gel method.....	89
5.1.1 Description of experimental synthesis procedure of phosphocalcic glasses in the ternary system $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ .....	90
5.1.2 Description of experimental synthesis procedure of phosphocalcic glasses in the quaternary system $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ .....	100
5.1.3 Description of experimental synthesis procedure of phosphocalcic glasses in the quaternary system $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Cu}_2\text{O}$ .....	105
5.2 Synthesis of phosphocalcic glasses by melting mixtures of oxidic precursors used as raw materials.....	108
5.3 Obtaining Kokubo - Takadama simulant human liquid.....	113
6. INVESTIGATIONS ON PHOSPHOCALCIC GLASSES. RESULTS AND DISCUSSIONS.....	115
6.1 Thermal analysis of glasses synthesized by sol-gel method.....	115
6.2 Dimensional analysis and granulometric distribution of phosphocalcic glasses synthesized by sol-gel method by the dynamic diffusion of pulsed laser light (DLS)	127

6.3 Determination of the phosphocalcic glasses density.....	130
6.3.1 Determination of density of phosphocalcic glasses synthesized by sol-gel technique.....	131
6.3.2 Determination of density of phosphocalcic glasses synthesized by melting.....	132
6.4 Determination of the elemental chemical composition of phosphocalcic glasses by X-ray fluorescence spectroscopy (WD-XRF).....	133
6.4.1 Determination of chemical composition of phosphocalcic glasses synthesized by sol-gel method.....	134
6.4.2 Determination of chemical composition of phosphocalcic glasses synthesized by melting.....	140
6.5 Study of bioactivity of phosphocalcic glasses by X-ray diffraction analysis (XRD).....	142
6.5.1 XRD analysis of glass powder synthesized by sol-gel technique.....	143
6.5.2 XRD analysis of glasses synthesized by melting oxide mixtures.....	173
6.6 Study of bioactivity of phosphocalcic glasses by Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis (FTIR) .....	176
6.6.1 FTIR analysis of glass powder synthesized by sol-gel technique.....	177
6.6.2 FTIR analysis of glass powders synthesized by melting oxide mixtures.....	194
6.7 The morphological study of the surface of phosphocalcic glasses synthesized by sol-gel technique.....	199
6.8 Evaluation of antibacterial activity of glasses doped by microbiological test.....	212
7. CONCLUSIONS AND OWN CONTRIBUTIONS.....	224
7. Conclusions.....	224
7.2 Own contributions.....	239
7.3 Research Perspectives.....	240
REFERENCES .....	241
SCIENTIFIC RESEARCH ACTIVITY.....	269
ANNEXES.....	279

**2. Keywords:** phosphocalcic glasses, biomaterials, bioactivity, antimicrobial activity, sol-gel synthesis, XRD, FTIR, SEM, DLS, TG-DTG-DSC, hydroxyapatite, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, microbiological test.

### 3. Introduction

The approach of this PhD thesis to problems related to fundamental aspects of biocompatible nanomaterials for clinical applications is part of the general objectives of excellence research programs with which Romania promotes scientific knowledge in the field of biomaterials in order to develop and accelerate the integration of economic agents to the requirements of the European Union, to the CEEX consortium level and to the requirements of the developed European countries.

In 2004, the Nanotoday journal estimated that there are over 300 nanomaterial companies in the world, of which about 30% produce biomaterials for the medical and pharmaceutical fields. In this respect, Romania is also keen to become one of the leading manufacturers of such biomaterials, which would lead to an improvement in the quality of life for many patients by significantly reducing the cost of prosthetic materials and the surgery itself.

The last decades has brought to the attention of researchers and technology in materials science and solid physics the study of solid non-crystalline solids and ceramics with valuable practical applications for science, industry and medicine. These studies have an interdisciplinary and synergistic character, especially regarding the discovery of new classes of biomaterials, because tissue engineering is at the frontier between engineering and life sciences, representing the most advanced approach in the vast sphere of implantology.

Bioactive and prophylactic glasses represent a relatively new class of inorganic biocompatible materials that are far from demonstrating their full applicative potential in implantology. They induce the postimplantation nucleus of a layer of carbonated hydroxyapatite at their surface and are readily colonizable by skeletal cells (osteoblasts, tenocytes, chondrocytes), which leads to the formation of a strong bond with bone tissue. These glasses are the subject of study of this PhD thesis.

Because over the last decades the average age and life expectancy of the population has increased, it has become imperative to discover new types of bioactive materials and a much longer lifetime of exploitation. The main challenge was to discover biomaterials capable of creating a biochemical link at the interface between biomaterial and tissue, where the material is more exposed to stress.

In 1968, Larry L. Hench and his colleagues found out that certain non-porous glasses of silicophosphorus composition are able to form a stable bond in relatively short periods after implantation. This year, the well-known Bioglass 45S5 composition has been patented.

The mechanism of interaction at the bioglass interface - tissue began to be investigated in 1973 by Hench et al. They showed that in contact with biological fluids, these glasses generated the formation of a non-stoichiometric hydroxyapatite layer similar to the bone mineral phase on their surface, and by incorporating the collagen molecules into this layer, the tissue-implant biological bond was formed.

Incorporating silver and copper into the silicophosphorus network of glasses is a relatively new method in bioglasses synthesis, relatively easy to achieve thanks to the sol-gel technique. With the incorporation of silver ions into the glass structure, in addition to their bioactivity, they also have antimicrobial properties to prevent and combat in-hospital infections that may occur as a result of prosthetic surgery. Doping with copper ions provides, in addition to antimicrobial activity, anti-inflammatory and healing properties of biomaterials.

The medical prosthesis with synthetic materials became secure only at the end of the 19th century, with the use of aseptic techniques in surgery. The 60's marked the start of obtaining strict medical supplies, and stopping the previous stage where the materials used were industrially produced.

In order to be used in prosthesis, a material must meet the following minimum requirements: not to be toxic, allergic, carcinogenic, teratogenic, not to cause rejection, not to alter pH and blood composition, coagulation mechanism, not to cause sedimentation or biodegradation in tissues. To be available in unlimited quantities, able to be sterilized, to be easy to store, easy to handle clinically, and affordable [12].

Materials for bone substitution must, in addition, be biocompatible, osteoconductive, osteoinductive, if possible to be bioabsorbable and able to provide mechanical support [13,14].

Biomaterials are natural or synthetic materials that are used to replace individual parts, organs or tissues from living organisms and function in close correlation with them without harming them. [15]

Although it has been over 45 years since Hench patented the first bioactive glass - the well-known Bioglass 45S5 synthesized by melting in 1968 - which is based on an alkaline silico-phosphocalcic glass, the addition of other elements in the composition of these biomaterials can confer further properties, in addition to bioactivity (Si, Ca, P), such as those antimicrobial (Ag, Cu, Zn), anti-inflammatory and healing (Zn, Cu), magnetic (Fe), superior mechanical strength (Mg, Mn, Al, Fe), each of them with major beneficial implications for reconstruction, prosthesis and recovery. These are additional arguments that make this class of biomaterials an object of primary interest for research in the field [102, 103, 104, 105].

#### 4. The purpose and objectives of the PhD thesis

The purpose of this Ph.D. thesis, '**Phosphocalcic Glasses with Special Properties**', is to investigate the possibilities of conferring to vitro-ceramic materials in clinical use additional, potentially synergistic properties with respect to biofunctionality in contrast with those already known.

In this respect, it was focused the sol-gel synthesis of certain phosphocalcic glasses with bioactive potential, from the ternary system  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  and some of their compositional variants from the quaternary systems  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$  and  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Cu}_2\text{O}$  with prophylactic and therapeutic potential. For a comparatively relevant study (especially prophylactically) some similar compositions were synthesized by the classic fusion process (melting of oxide mixtures).

Sol-gel technique is an alternative to biosynthesis that has been extensively studied worldwide since the early 1990s, but still pioneering in our country. This method was adopted for technologically and economically advantageous reasons. The same can be said about doping glasses and biomaterials in general with silver or copper ions. Although silver and copper have been known for their antimicrobial properties since ancient times, the technique of bioglasses doping with biocide metals by sol-gel technique has begun to be researched and applied only after 2000. The first silver-doped bioglasses, synthesized by sol-gel technique, have been obtained from 2005 to 2008 by Balamurugan and Balossier.

The properties of the synthesized glasses are compared in each system (ternary and quaternary), but also inter-systems to identify possible synergistic properties: bioactivity and bioprophylaxis. Analysis of synthesized glasses was performed on

powders without attempting other morphologies. For this reason, the results obtained and presented in this Ph.D. thesis can be confirmed by in vivo testing. The results of the thesis may be the subject of new research.

**The general objective** of this PhD thesis is the synthesis of simple phosphocalcic glasses and the incorporation of metals with antimicrobial potential (silver, copper) by sol-gel technique and melting and analysis of their properties.

**Specific objectives:**

- Synthesis of powdered glass compositions of a predominantly amorphous form in the ternary system  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$  by the sol-gel method, at temperatures as low as most of the synthesis using a small number of reagents and specific technical equipment with minimal economic and logistical implications.
- Identify and establish the frame technology for obtaining silver / copper doped glasses from the quaternary system  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{Ag}_2\text{O}$  /  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{Cu}_2\text{O}$ , vizând momentul optim de încorporare al precursorului pentru ionii de argint / cupru, targeting the optimum incorporation time of the silver / copper ion precursor, so that the sol-gel synthesis technique not be adversely affected in terms of standard steps and working parameters.
- Synthesis of glasses doped with metals with biocidal potential by melting the precursor mixtures.
- Verification of elemental chemical compositions for synthesized glasses by quantitative wavelength X-ray fluorescence spectroscopy (WD-XRF) analysis to confirm calculated theoretical compositions and adopted technological routes.
- Thermal stability test of sol-gel glass samples by thermogravimetric (TG) analysis and differential scanning calorimetry (DSC).
- Determination of particle size of pulverulent glass particles synthesized by sol-gel technique by Dynamic Light Diffusion Analysis (DLS).
- Determination of the relative density of the glasses by the picnometric method.
- Obtaining a simulated, aprotic and acellular biological fluid following a revised 2006 recipe of Kokubo, commonly called simulant human fluid (LUS or SBF).
- Investigation of biocompatibility and bioactivity properties of glasses by in vitro study, after immersion in simulant human liquid, variable durations (3- 21 days), using modern methods of analysis - X-ray diffraction for structural analysis (XRD), infrared spectroscopy after Fourier Transform (FTIR) to identify functional groups, Scanning Electron Microscopy (SEM) to study the neoformations at the surface of the in vitro tested glasses.
- Study of antibacterial properties of silver and copper doped glasses, determined qualitatively and semi-quantitatively by establishing the minimum bactericidal (MBC) and bacteriostatic concentration on two strains of pathogenic bacteria from the series most involved in hospital infections.

## **5. Presentation of the thesis structure**

The Ph.D. thesis, '**Phosphocalcic Glasses with Special Properties**', is structured in 7 chapters. The first three chapters are devoted to the study of the current state of knowledge in the vast field of biomaterials, and the following 4 experimental research and its own contributions.

**Chapter 1** is an introductory one introducing a brief insight into the history of glass, the general and specific aims and objectives of the thesis, information on anatomy and long bone structure, and concepts of bone modeling, reconstruction and bone prosthesis.

**Chapter 2** of the thesis contains a detailed description of biomaterials in general and especially phosphocalcic, starting from their definition, classification and clinical applications depending on bioactivity.

**Chapter 3** is dedicated exclusively to phosphocalcic glasses which are the subject of this PhD thesis study. These were presented in structural, compositional, synthesis and bioprocessing (prophylactically and bioactively). The chapter contains information on the possibility of doping metal glasses with biocidal properties and their effect on pathogenic microorganisms involved in nosocomial infections. The last subchapter presents the solutions used for in vitro bioavailability testing of glasses.

The experimental part of the Ph.D. thesis begins with **chapter 4** in which I made a brief presentation of the investigative techniques we used in the study of synthesized glasses.

In **chapter 5** are presented the technological routes adopted for the synthesis of phosphocalcic glasses by the sol-gel method and the melting of the oxide mixtures, as well as the adopted working parameters. The chapter also shows the Kokubo - Takadama method in order to obtain simulant human liquid, which has been used to test the bioactivity of glasses in vitro.

**Chapter 6** presents the investigations on synthesized glasses and discusses the results. The glasses were studied in composition by X-ray fluorescence spectroscopy after wavelength (WD-XRF). Thermal stability was determined by thermogravimetric (TG) analysis and differential scanning calorimetry (DSC and DTG), granulometric size and distribution of glass powders synthesized by the sol-gel technique were analyzed by DLS. The chapter also includes the determination of glass density by the pycnometric method; the study of bioactivity of immersed glasses in simulated human liquid for different periods of time; it was performed by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy after Fourier transformation (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The antimicrobial capacity of the doped glasses was presented in the same chapter.

In **chapter 7** of the thesis are presented the conclusions and own contributions.

## **6. Own experimental research**

### **6.1 Investigation techniques used in the study**

In order to achieve the specific objectives of this PhD thesis, namely the characterization of glasses synthesized as regards their bioactive and prophylactic properties, physical, chemical and microbiological analyzes were carried out.

In this chapter the methods of investigation used to characterize the glasses with special properties are presented and the working techniques and equipment used in the experimental studies are described.

The elemental chemical composition of the glasses studied was determined by wavelength dispersion (WD-XRF) fluorescence spectroscopy. Characterization as regards the crystalline phases present or formed in the structure of the analyzed glasses, after immersion in the LUS, was performed by means of X-ray diffraction (XRD).

Molecular chemical groups present in glass structure or postimmersing formed in SBF were identified by Fourier Transformed Infrared (FTIR) spectroscopy, and the morphology of the analyzed powders was performed by scanning electron microscopy (SEM).

In order to determine the thermal stability over time and some physico-chemical properties of the glasses, these were subjected to differential scanning calorimetry (DSC)

and thermogravimetric (TGA) analysis. The granulometric distribution and effective dimensional analysis of the bioactive-potential glasses was achieved by the dynamic diffusion technique of pulsed laser light (DLS). Relative density determination was also performed because it correlates with the morphology and specific surface of the synthesized glasses.

The evaluation of the antimicrobial activity of phosphocalcic glasses with the incorporation of transition metals with biocidal potential (Ag, Cu) was carried out by microbiological study on two pure cultures of the top five bacteria involved in nosocomial infections (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*).

## **6.2. Synthesis of phosphocalcic glasses**

In this chapter of the thesis are presented the experimental procedures, the materials and the equipment used, as well as the working techniques adopted for the preparation of phosphocalcic glass compositions from the ternary system  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ , as well as of some doped with silver ions ( $\text{Ag}^+$ ) or copper ions ( $\text{Cu}^+$ ) in the quaternary system  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ , respectively  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Cu}_2\text{O}$ , both by the sol-gel method and by the classical method of melting the oxide precursor mixtures.

In order to obtain glasses with properties compatible with medical applications in the field of repair and reconstructive orthopedic surgery, dental and other branches of medicine (ENT, ophthalmology, oncology, cardiology, nephrology, etc.) high purity chemical reagents were purchased from recognized companies in the country and abroad.

### **Sol-gel method of synthesis of simple and doped phosphocalcic glasses**

The choice of the sol-gel method for the synthesis of most of the glass samples studied was mainly based on the fact that vitreous materials with predetermined structure can be obtained, depending on the working parameters and the precursors used, glasses which are obtained quite hard by conventional techniques Melting the oxide mixtures [7]. Improvement and predictability of end - product properties make sol - gel synthesis particularly advantageous and attractive to the biocompatible material range compared to the classical method. Last but not least, this synthesis technique is more feasible because it allows for much lower production costs, preserving properties such as specific surface area and porosity with high values but also the possibility of metal doping (silver, magnesium, zinc, copper , etc.) that can confer additional special properties (anti-inflammatory, antimicrobial, healing, etc.) without losing its bioactivity.

Although these materials are currently under study as regards improving synthesis methods and bioperformance (through preclinical and clinical tests), most biomaterial researchers have concluded that the sol - gel method has a good repeatability and that the glasses obtained have a higher bioactivity than those obtained by the traditional method [133, 156, 180, 182, 184, 189, 190].

The sol-gel method of synthesizing bioactive glasses involves performing some typical frame steps; they consist of catalytic hydrolysis and the condensation of the oxidic precursors in the sol form, the gelation of the sol in a saturated atmosphere, the aging of the gel, its drying and the thermal stabilization of the xerogel obtained.

*Table 5.1* Chemical composition in oxides of ternary glasses (% by weight)

No. sample	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Obs.
P1	50	45	5	Optimal composition, with P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> at the lower limit
P2	55	40	5	SiO <sub>2</sub> at the higher limit, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> at the lower limit
P3	50	41	9	SiO <sub>2</sub> și CaO at optimal values, with P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> at the higher limit
P4	50	43	7	Optimal composition for all oxides

Figures 5.2 and 5.3 illustrate the most important phases of synthesis of phosphocalcic glasses by the sol-gel method.



a – matured gels

b – gels in the oven before drying

*Figure 5.2* Gels matured at 60°C for 54-60 hours



a



b



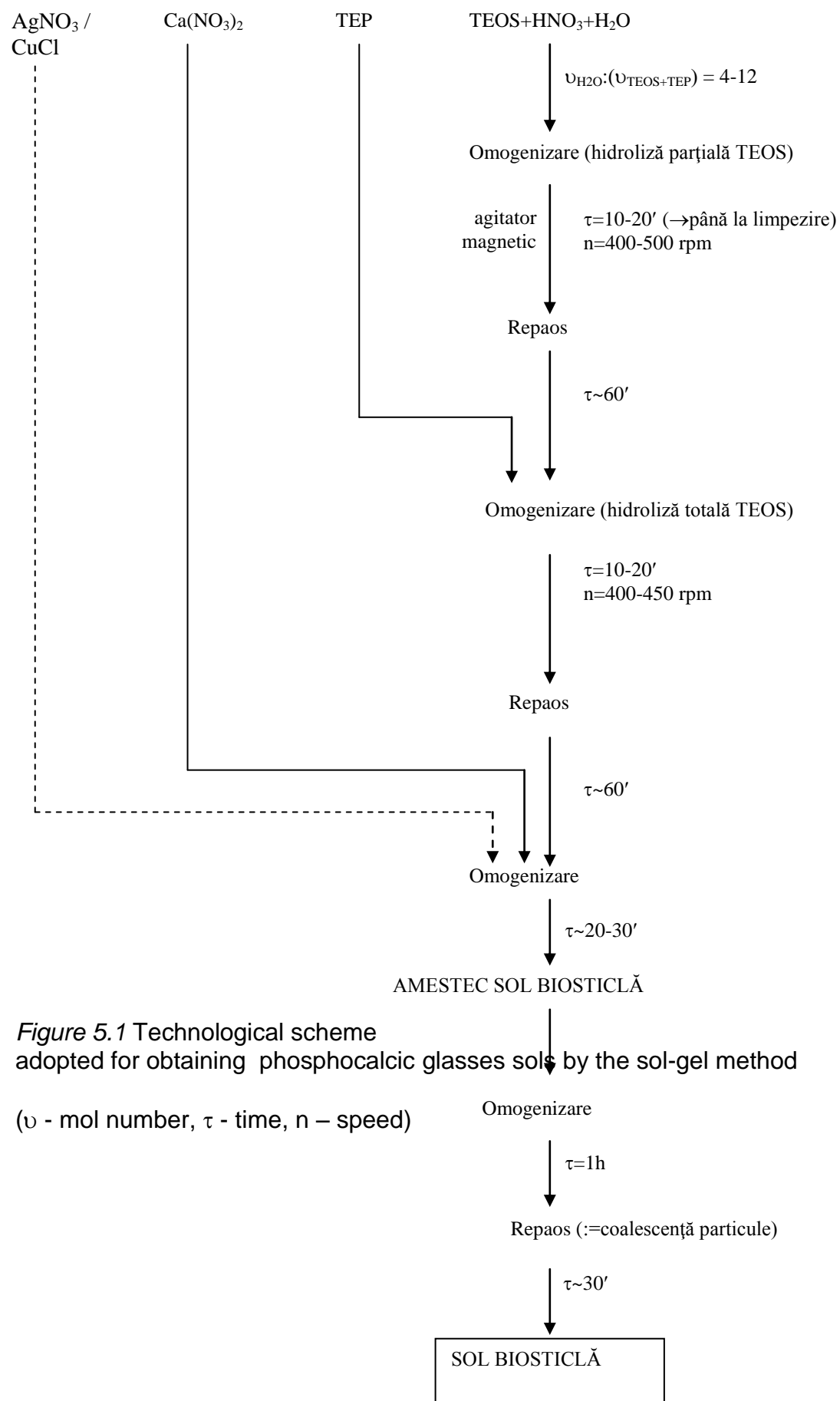
c

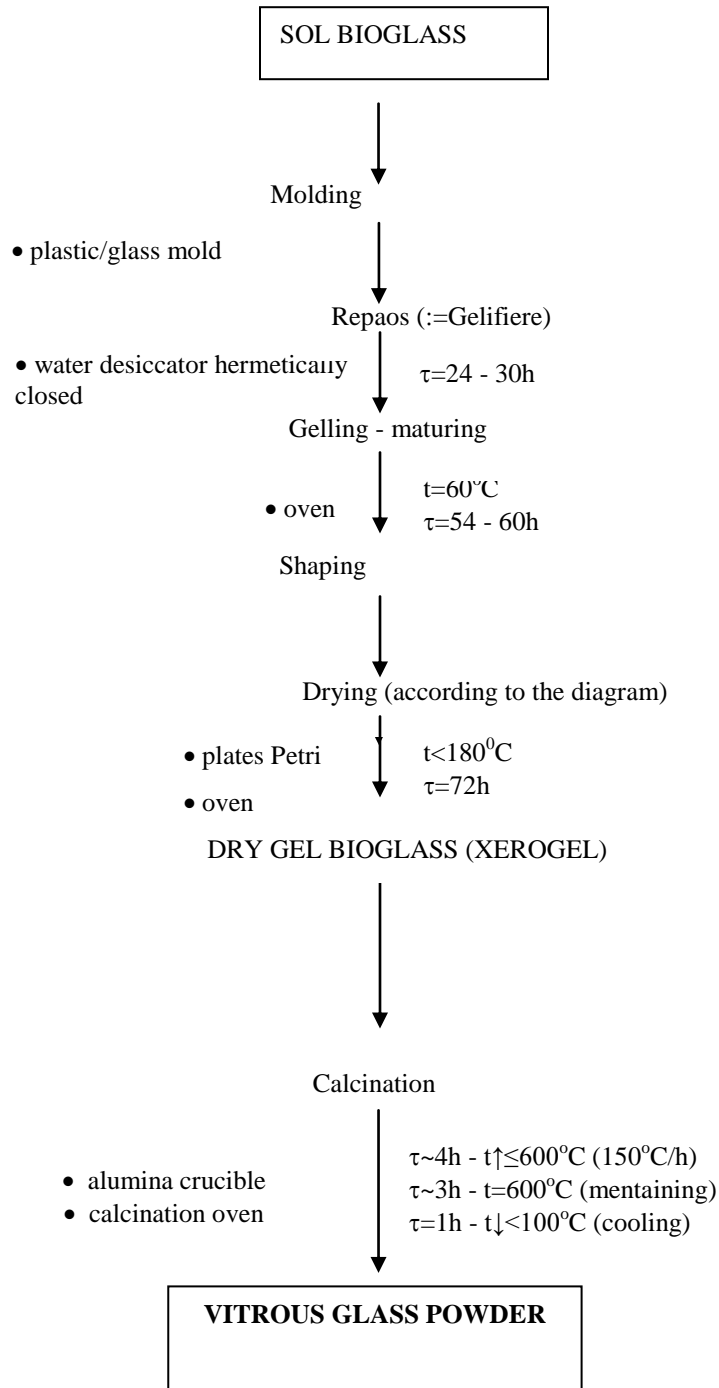
*Figure 5.3* Xerogels in the oven (a) and in preparation for calcination (b, c)

Figures 5.1 and 5.7 present schematically, but succinctly, the technological process of obtaining ternary and quaternary phosphocalcic glasses (doped with silver or copper), referring to the adopted working parameters and the materials used in the syntheses.

Metal ion doping was performed using silver nitrate or cuprous chloride as precursors.







*Figure 5.7* Block diagram of operations associated with the technological process of gelling, maturation and stabilization of glass gels  
( $\tau$  - time,  $t$  – temperature)

The silver doped glass compositions synthesized for this study are presented in Table 5.3.

Table 5.3 Chemical composition in oxides of Ag<sub>2</sub>O doped glasses (% by weight)

No Sample	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ag <sub>2</sub> O	Obs.
PA1	47*	45	5	3	Optimal composition, with P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> și Ag <sub>2</sub> O at the lower limit
PA2	50*	40	5	5	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> at the lower limit, Ag <sub>2</sub> O at the higher limit
PA3	50	38*	9	3	SiO <sub>2</sub> , CaO optimal, with P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> at the higher limit, Ag <sub>2</sub> O at the lower limit
PA4	50	38*	7	5	Optimal composition for all oxides, Ag <sub>2</sub> O at the higher limit

\* indicates which oxides have been substituted in the original composition (from Table 5.1) to introduce Ag<sub>2</sub>O.

Figure 5.8 shows the xerogel of a doped silver glass (a) and the appearance of a silver quaternary glass (b).



Figure 5.8 Xerogel in preparation for calcination (a) and glass powder doped with silver (b)

In order to study the possible antimicrobial activity of the phosphocalcic glasses doped with first-group transition metals, for this thesis two quaternary glass compositions from the system SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Cu<sub>2</sub>O (table 5.5) were synthesized in addition to those doped with silver.

Table 5.5 Chemical composition in oxides of Cu<sub>2</sub>O doped glasses (% by weight)

No.sample	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Cu <sub>2</sub> O
PC1	47*	45	5	3
PC2	50	38*	7	5

\* Indicates which oxides have been substituted in the initial composition (in Table 5.1) to introduce Cu<sub>2</sub>O.

### Synthesis of glasses by melting precursor oxide mixtures

In the context of the difficulty of synthesizing homogeneous glasses at a molecular scale by melting and with practical compositions close to those calculated theoretically, transitional metal doping has been a challenge, both in terms of the choice of melting parameters and the evaluation properties of clinical interest in doped glasses because the glass has low porosity and specific surface area, high density, and vitreous

grains and are compact, of large size, aspects which can negatively influence properties such as biocompatibility and the therapeutic role of this type of glass [99,106 , 192,196].

Starting from the premise of bioactivity of the well-known silico-phosphocalcic alkaline-45S5 composition synthesized by Larry L. Hench in 1968 by melting, we synthesized three compositions of such glasses presented in Table 5.6.

*Table 5.6 Chemical composition in oxides of melt synthesized glasses (% by weight)*

<b>Oxides No sample</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>CaO</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>Na<sub>2</sub>O</b>	<b>Ag<sub>2</sub>O</b>	<b>Cu<sub>2</sub>O</b>
<b>45S5</b>	45	24,5*	6*	22,5*	-	-
<b>TAg</b>	45	22,5	5	22,5	5	-
<b>TCu</b>	45	22,5	5	22,5	-	5

\* Indicates what oxides have been substituted in the initial 45S5 composition to make silver and copper doping.

The working steps of the technological route adopted are as follows:

I – heating up to 1100°C within one hour and 35 minutes (heating rate of about 10°C / minute);

II – maintenance at 1100°C for one hour;

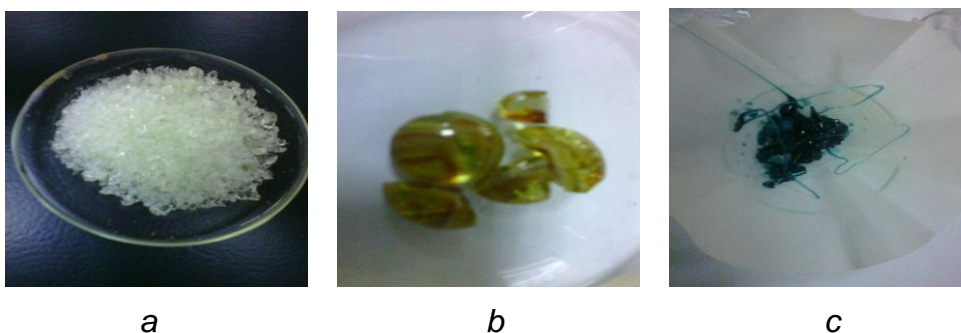
III – heating up to a melting temperature of within 30 minutes, with the same heating rate as in the first stage;

IV – holding at 1415°C for 30 minutes (Figure 5.11.a);

V – rapid cooling down to temperatures below 1300°C (fig. 5.11.b), followed by removal of the crucibles from the furnace and pouring of the liquid glass onto metallic supports or water (fig. 5.11.c și 5.11.d);

VI – heat the glass samples at 180 – 200°C, for 4 hours in the oven, for partial relief.

Figure 5.12 shows the melt glasses in pill shapes or frits before being ground



*Figure 5.12 Glasses synthesized by melting before milling: a - 45S5 glass, b - TAg glass pills, c - glass frit TCu*

### 6.3 Obtaining Kokubo - Takadama simulant human fluid

Simulating human fluid is a solution that mimics the composition, concentration and pH of human plasma and physiological fluids. It is metastable, acellular and nonprotective. However, it is the most widely used bioassay test medium for different biomaterials since 1990, when it was first synthesized by Kokubo et al. [312-315]. Both plasma and SBF have salts which provide sufficient amounts of Ca<sup>2+</sup> and HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ions to support the formation of hydroxyapatite at the surface of biomaterials [315-318].

Table 5.8 shows the LUS composition synthesized for in vitro testing of glasses synthesized and studied in this PhD thesis.

*Table 5.8* The composition and ion concentration of 1L SBF at 1.5 N concentration

Reactive	Quantity [g]	Ion concentration [mmol/l]	
		Cations	Anions
NaCl	11.994	Na <sup>+</sup>	-
NaHCO <sub>3</sub>	0.525	213.0	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 6.3
KCl	0.336	K <sup>+</sup>	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.342	7.5	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 1.5
MgCl <sub>2</sub>	0.458	Mg <sup>2+</sup> 2.3	-
HCl 1M	60 cm <sup>3</sup>	-	Cl <sup>-</sup> 221.7
CaCl <sub>2</sub>	0.417	Ca <sup>2+</sup> 3.8	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.107	-	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 0.8
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> -C-NH <sub>2</sub>	9.086	-	-
HCl 1M	Up to pH= 7.2-7.4	pH= 7.25	

#### 6.4 Thermal analysis of phosphocalcic glasses synthesized by sol-gel method

Phosphocalcical glass powder samples synthesized by the sol - gel method were subjected to thermal analysis before in vitro bioactivity testing, ie before immersion in simulant human fluid.

Thermal analysis of glass powders mainly aimed at mass variation (TGA) and critical thermal points with temperature difference (DTA) and heat (DSC).

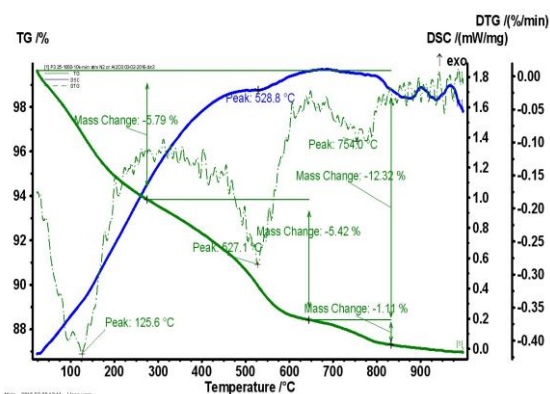
The thermal stability assessment was performed in relation to the total mass loss values. The ten glass composition synthesized by the sol - gel technique was heated up to 1000°C at a rate of 10°C/minute for thermogravimetric analysis.

Thermal stability of synthesized glasses is of interest because, before being implanted in the human body, they require rigorous sterilization at temperatures at least 120oC to prevent post-surgical infections.

It is also important for the materials to reach the living body at temperatures close to those of the surrounding tissues because larger differences of several degrees

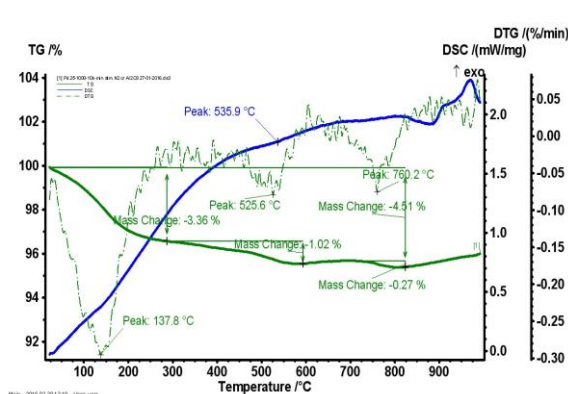
between implant and tissue can lead to inflammatory processes and subsequently to graft rejection reactions.

The comparative analysis of the 4 non-metallic ternary glasses compositions showed that the most thermally stable is P4 phosphocalcicle, which, according to the bibliographic sources consulted, has an optimal composition in all oxides (50% SiO<sub>2</sub> – 43%CaO - 7% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). The most thermolabile is P3 glass (50% - 41% - 9%). Their total mass losses are: 12,32% - P3, 4,51% - P4. Glasses P1 and P2 have comparable mass losses (8,30% - P1, 8,78% - P2). Their histograms are shown in Figures 6.3 and 6.4, respectively.



6.3

Figure 6.3 Thermogravimetric analysis (TG / DTG) and differential scanning calorimetry (DSC) for P3 glass



6.4

Figure 6.4 Thermogravimetric analysis (TG / DTG) and differential scanning calorimetry (DSC) for P4 glass

Compared to glasses P1 and P2, composition P3 shows the highest mass loss (12,32), a phenomenon that may be due to a lower content of stabilizer oxide - CaO - with a maximum of 4% and a P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content by 4% higher than the other two compositions.

Mass losses occur in 3 stages, at different thermal intervals, except for P1 glass (4 stages). Of interest for clinical use is the temperature range at all samples between 25° – 275°C.

Major mass losses occur during this time, so after thermally sterilization (mandatory), the glasses are thermally stable at the temperatures they reach the human body.

Mass losses are associated with the removal of water molecules from the structure of glasses, molecules physically adsorbed to the surface of the powders after thermal stabilization, organic residues (mainly ethanol) and nitrogen oxides, resulted from the decomposition of the precursors used.

All 4 ternary compositions are thermally stable up to 1000°C, the temperature at which they were analyzed.

Among the silver-doped glass compositions, the most thermally stable silver compositions on the analyzed range are PA2 (0.64%) and PA4 (2.33%) compared to PA1 (3.93%) and PA3 (5.53%).

This is due to the higher silver content - 5%, compared to 3% of the structure of the first two. The silver doping of phosphocalcic glasses significantly improves their thermal stability.

Compared to ternary glasses, undoped, it is noted that mass losses for all doped glass compositions are much lower.

Copper-doped phosphocalcic glasses PC1 and PC2 have a mass loss of 12.25% and 12.77%, respectively.

The copper content (3%, 5%) did not influence their visible thermal stability, as in the case of silver.

Compared to the equivalent composition glasses (P1 and PA1), PC1 glass is less stable than both, as in the case of PC2, relative to P4 and PA4 glasses.

In conclusion, silver ion doping is preferred for cuprous ion doping.

All synthesized glass compositions are thermally stable over the interval in which they were analyzed and are amenable to clinical use from this point of view.

### **6.5 The dimensional analysis and granulometric distribution of glasses synthesized by the sol-gel technique**

The only unimodal population with the lowest average diameters was observed for sample P2 although it had the highest silicon content (55% SiO<sub>2</sub>).

The other samples, P1, P3 and P4, although having an identical content of SiO<sub>2</sub> (50%) have a different ultrasound behavior.

Corroborating the concentrations of the other oxides in the vitreous glass structure one cannot conclude after their composition, as is the P4 glass, the composition of which is considered optimal for all oxides and which is the most resistant to ultrasonography, having three populations of particles and the highest average diameters.

The glass with the highest average diameters is that of composition PA2, with identical silver content (5% Ag<sub>2</sub>O) with the sample PA4; Therefore, it is not the silver content of the glasses that influences their behavior at ultrasonography. TG analysis indicates that PA2 glass is the most thermally stable, which can justify ultrasonic behavior and large particle size.

Since the PC1 sample has less copper in the composition (3%) than the PC2 sample (5%), it could be concluded that the percentage of metal in the vitreous matrix can increase the resistance to ultrasonography, corroborated with their average diameters. The small number of samples makes this claim uncertain because this behavior has not been confirmed in the case of silver-doped samples.

The overall conclusion of the DLS analysis on the 10 phosphocalcic glass samples synthesized by the sol-gel technique is that they are all biocompatible, reaching micronic and even nanometric dimensions through post-synthesis processing.

### **6.6 Determination of relative density of synthesized glasses**

The density determination was considered relevant because the literature indicates direct correlations between the density of the glasses and their physical properties, but also their behavior in the biological environment in the case of bioactive and antimicrobial glasses.

Density of phosphocalcic glasses is determined by their chemical composition and structure, by the thermal conditions of synthesis, thus implicit by the method of production adopted. Density can influence properties such as porosity, granulometry, specific surface area, hardness.

The relative density of the glass powders obtained by the sol-gel method is shown in Table 6.4.

*Table 6.4* Relative density of glass powders obtained by the sol-gel method

<b>Sample</b>	<b>Density [g/cm<sup>3</sup>]</b>	<b>Sample</b>	<b>Density [g/cm<sup>3</sup>]</b>	<b>Sample</b>	<b>Density [g/cm<sup>3</sup>]</b>
<b>P1</b>	0,6514	<b>PA1</b>	0,7609	<b>PC1</b>	0,6931
<b>P2</b>	0,7733	<b>PA2</b>	0,8160	-	-
<b>P3</b>	0,6605	<b>PA3</b>	0,7354	-	-
<b>P4</b>	0,6441	<b>PA4</b>	0,6978	<b>PC2</b>	0,8023

The highest density is P2, which also has the highest SiO<sub>2</sub> content, but which, according to DLS analysis, has the smallest average particle diameters (215.1 nm), which justifies the increased density. The other samples P1, P3, P4 have values close to value, with a slight increase in sample P3 due to the fact that it has the highest content of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (9%).

Among the silver-doped bioglasses, the maximum density has the PA2 sample, the compositional equivalent of sample P2, but which is not based on the high content of SiO<sub>2</sub>, since for these compositions, except for PA1 (47% SiO<sub>2</sub>), all three samples have the same content of SiO<sub>2</sub> (50% SiO<sub>2</sub>). Neither the dopant metal content is the cause of the increase in PA2 sample density because a maximum content of Ag<sub>2</sub>O (5%) also has the PA4 sample but which has the lowest density of all silver-doped compositions.

According to the TG analysis, PA2 composition glass is the most thermally stable (0.64% mass loss) and DLS analysis indicates the highest average particle diameters of all synthesized glass compositions (4407.6 nm) Which can be correlated with a high glass hardness.

Glasses doped with PC1 and PC2 copper ions have densities directly proportional to the dopant metal content.

The density of phosphocalcic glasses synthesized by melting (Table 5.6) was determined on the principle of displacing a volume of liquid by a known mass of vitreous material (Mohr-Westphal or Archimede balance principle). The result of the determinations is presented in Table 6.5.

*Table 6.5* Relative density of melted bottles

<b>Sample</b>	<b>Density [g/cm<sup>3</sup>]</b>
<b>45S5</b>	2,5839
<b>TAg</b>	1,7933
<b>TCu</b>	2,4818

The highest density of the glasses synthesized by melting is Hench 45S5, undoped, followed by the copper doped composition - TCu and the silver doped - TAg.

The densities of the doped samples are considerably different, although the amount of doping metal is the same (5%). This can be attributed to precursors used for doping for each of the compositions but also to the nature of the dopant metal. All three melt synthesized glasses have supraunit densities.

## **6.7 Study of the determination of the elemental chemical composition of phosphocalcic glasses by X-ray fluorescence spectroscopy (WD-XRF)**

The quantitative determination of the chemical composition of synthesized phosphocalcic glasses is an important aspect for the overall assessment of the adopted



synthesis techniques, the chosen working parameters, the precursors used and the way the theoretical compositions were calculated.

The results of the WD-XRF analyses of non-simulated phosphocalcic glasses in simulant human fluid are presented below as histograms to which we attached tables with theoretical and practical compositions.

In Figure 6.12, a - d, the theoretical and actual compositions of ternary phosphocalcic glasses synthesized by the sol-gel technique: P1 (Figure 6.12.a), P2 (Figure 6.12.b), P3 (Figure 6.12.c) and P4 (Figure 6.12.d).

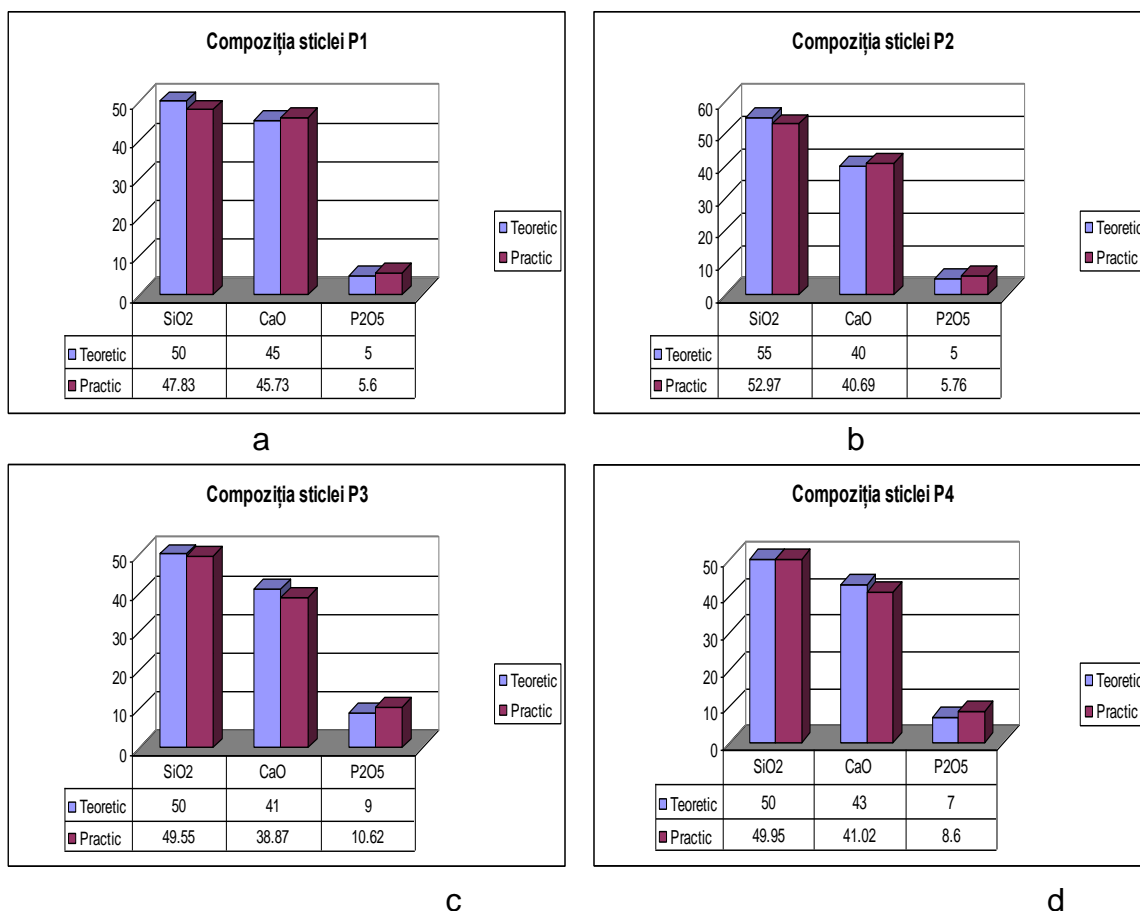


Figure 6.12 Histograms of ternary phosphocalcic glass compositions P1 (a), P2 (b), P3 (c) and P4 (d)

All synthesis yield of undoped glasses synthesized by the sol-gel technique are superior to those indicated in the literature, the smallest is that of P1 glass (92.4%) and the highest is that of P4 glass (95.4%), with the optimal theoretical composition in all oxides, as indicated by literature data.

In conclusion, the technological path adopted for the sol-gel synthesis of undoped glasses is correctly chosen and the results are reproducible for the phosphocalcic glass compositions studied in this thesis.

PA1 and PA3 glass samples containing about 3% Ag<sub>2</sub>O have similar synthetic yields of 97.5% and 97.2%, respectively, appropriate to theoretical yield, while PA2 and PA4 compositions having 6.2% and respectively 6.46% Ag<sub>2</sub>O have ideal yields of 100%, like PC1 glass and 99.3% PC2 glass respectively.

It can be concluded that increasing the metal content in the glass composition leads to a proportional increase in the yield of the vitreous material synthesis, although important deviations occur in the structure of the vitreous network, which may influence their biofunctional properties.

The yields of the synthesis processes are clearly superior to those in which silver ions have been introduced, so the sol-gel synthesis method described in the thesis is successful in obtaining quaternary or silver-doped glasses.

The WD-XRF analysis results confirm that the technological paths adopted for the sol-gel synthesis are well-chosen, the working parameters are well-chosen and overall, the method has a very good repeatability.

The synthesis of **melting** phosphocalcic glasses is not an equally versatile and reproducible technique as in sol-gel method because the stoichiometric control of the composition is difficult to achieve, and the introduction of doping metals implies the adoption of melting charts different from those of undoped glasses to achieve comparable synthesis yields.

In melt synthesis, high quality equipment is required to reduce the risk of impurities during processing.

## **6.8 Study of phosphocalcic glasses bioactivity by X-ray diffraction analysis (XRD)**

Scientific literature unanimously confirms that the formation of crystalline structures of stoichiometric and non-stoichiometric (carbonated) hydroxyapatite at the surface of biomaterials after immersion in simulated biological fluids is associated with their bioactive property.

In order to carry out research on the bioactivity of synthesized phosphocalcic glasses, they were immersed in LUS with pH = 7.2 - 7.25 and thermostated at 37°C for 3, 7, 14 and 21 days.

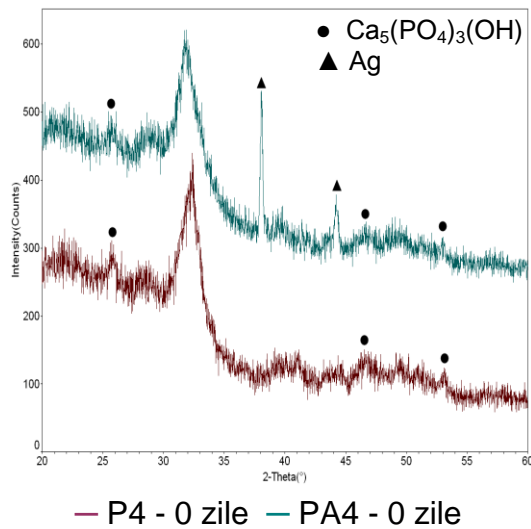
XRD analysis indicates that prior to dipping all synthesized glasses have a predominantly amorphous structure, but crystalline formations may also be present in the composition. Thus, compositions P1, P3, P4 and PA3 have a ceramic (vitroceramic) glass structure due to the presence of some HAp peaks in diffractograms.

Most glasses contain calcium carbonate peaks, all silver-doped glasses exhibit AgCl, and those doped with copper have crystalline tenorite formations.

The presence of these crystalline compounds before immersion does not adversely affect the bioactivity of the glasses.

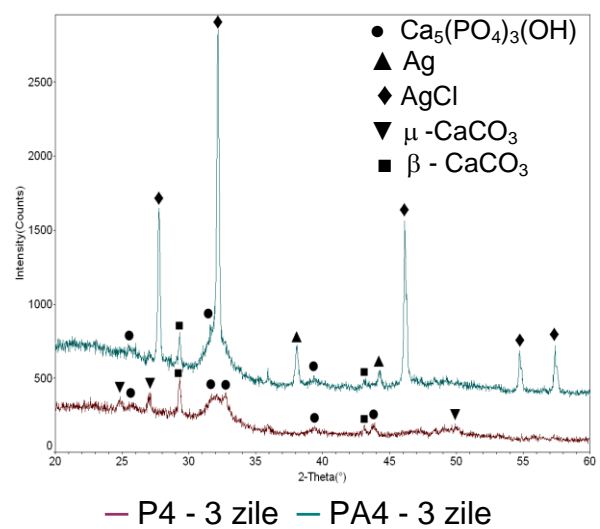
PA4 glass has Ag metallic, in addition to the other crystalline phases, in its vitreous structure, which gives it a reinforced glass structure (vitroceramic glass with composite phase).

All compositions synthesized by the sol-gel technique exhibit bioactivity after the first 3 days of immersion and reach a maximum after 14 days of static immersion in LUS. To highlight this aspect, Figures 6.33 - 6.36 show the diffractograms of P4 -PA4 compositional samples, unimmigrated and immersed for 3, 7 and 14 days in simulant human fluid.



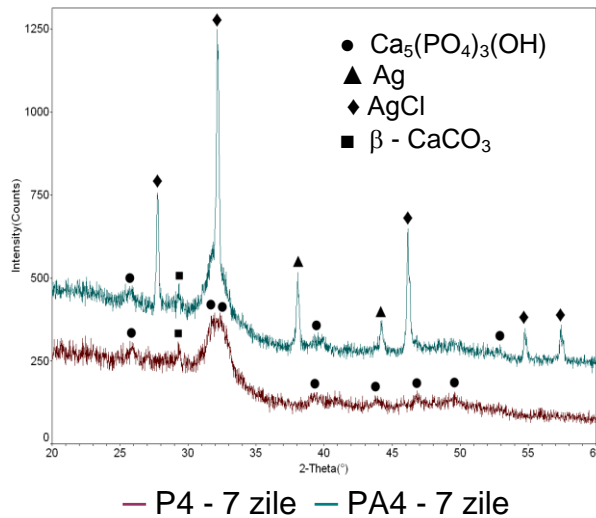
6.33

Figure 6.33 Diffractograms of P4 and PA4 samples unimmersed in LUS



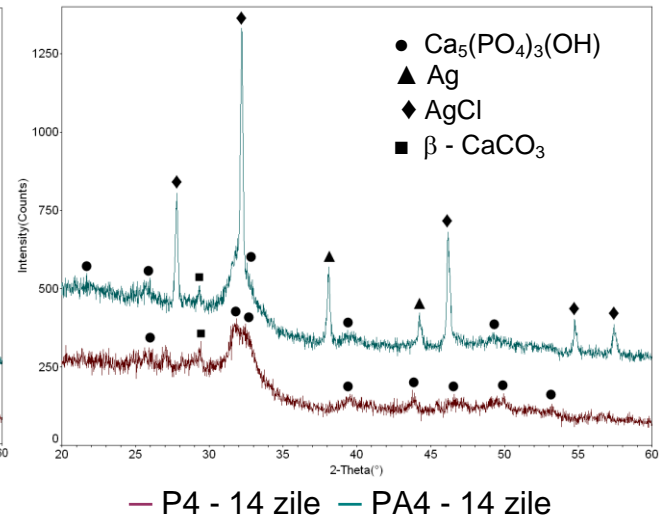
6.34

Figure 6.34 Diffractograms of P4 and PA4 samples immersed for 3 days in LUS



6.35

Figure 6.35 Diffractograms of P4 and PA4 samples immersed for 7 days in LUS



6.36

Figure 6.36 Diffractograms of P4 and PA4 samples immersed for 14 days in LUS

The percentage of metal oxide in the composition of silver or copper doped glasses does not influence their bioactive behavior, but silver influences by its proportion and its shape ( $\text{Ag}^+$  or  $\text{Ag}^0$ ) glass structure: vitreous, vitroceramic or composite (when it is reduced, to metallic silver, in 5%  $\text{Ag}_2\text{O}$  glasses).

XRD investigations lead to the general conclusion that all 10 glass compositions synthesized by the sol-gel technique and analyzed, both ternary and doped with silver or copper, are bioactive and generate new post-hydroxyapatite formations in simulant human fluid at the surface of the glasses from the first 3 days and reach a maximum of bioactivity after 14 days of immersion.

XRD analysis reveals that the bioactivity level of 45S5 glass synthesized by melting, analyzed up to 30 days of immersion, is well below that of glasses synthesized by the sol-gel technique since the first signs of bioactivity appear only after 14 days.

The removal of bioactivity in TAg and TCu doped glasses may be due to the impurities in the glass structure as detected by the determination of the oxide chemical composition by the X-WD-XRF fluorescence analysis at which the glasses were subjected to the content of more than 1% dopant metal, as indicates the data identified in the literature.

Synthesis of melting phosphocalcic glasses is not a technique as versatile and reproducible as the sol-gel technique, and that minimal compositional changes can radically change the bioactive behavior of phosphocalcic material.

In conclusion, the percentage of oxide of the doping material in the composition of the metallic doped glasses, respectively 3% and 5%, does not abolish the bioactivity of doped phosphocalcic glasses synthesized by the sol-gel technique but certainly influences the other physicochemical properties and also their bio-functional (antimicrobial, cicatrizant, anti-inflammatory) properties.

### **6.9 Study of bioactivity of phosphocalcic glasses by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR)**

FTIR investigations on ternary phosphocalcic and silver or copper doped glasses confirm the X-ray diffraction analysis results that all synthesized sample compositions are bioactive and that silver or copper doping does not abrogate their bioactivity property, one of the objectives pursued in this thesis.

Changes to the biomaterial-simulant human fluid interface are noticeable from the FTIR spectra after the first 3 days of immersion, but are more apparent after 14 days.

In addition to the XRD analysis, the formation of carbonated hydroxyapatite, in addition to the stoichiometric one, could be confirmed by the FTIR, which is evidenced by the presence of short beams and short absorption bands specific for carbonate groups and the bands of crystallization water and associated HAp and HApC, as presented above.

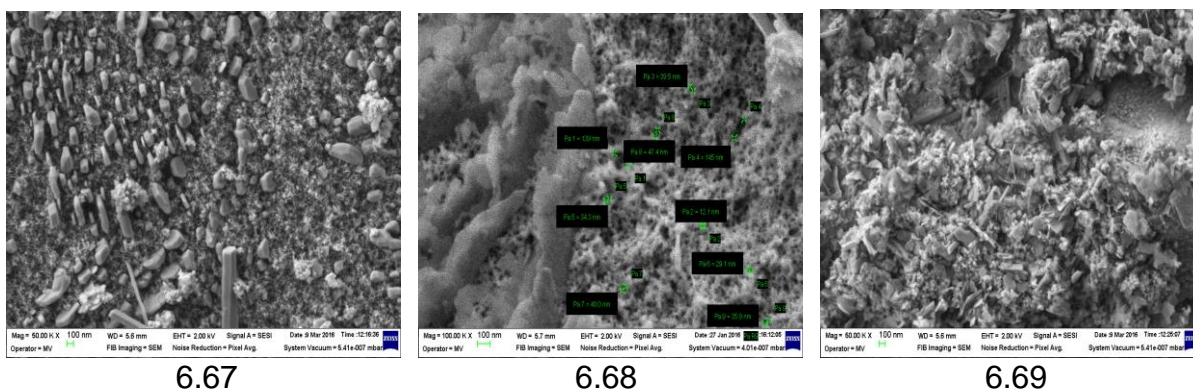
Infrared spectroscopy analysis confirms the result of the XRD analysis, according to which the 45S5 synthesized by melting glass is bioactive but after a longer immersion time (14 days) in the LUS compared to the sol-gel glasses.

Since literature offers very little information on the FTIR characterization of phosphocalcic materials doped with metallic ions, obtained by melting, numerous wavelengths marked on the spectra could not be attributed.

### **6.10 The morphological study of the surface of phosphocalcic glasses synthesized by the sol-gel technique (SEM)**

The study of morphology and surface topography of glasses surfaces synthesized by the sol-gel technique indicates the presence of pores of different sizes, of large areas of uneven, rugged type, which is beneficial for osteogenesis.

At different magnitudes, all formations identified by XRD and FTIR analysis are visible in the form of micro or macrocrystalline agglomerates of different luminous intensities in the form of crystals of different shapes (spheroids, cubic, acicular, tetrahedral, etc.) and micro, or nanometric dimensions, as outlined in figures 6.67, 6.68, 6.69.



6.67  
Figure 6.67 SEM micrograph of P1 glass immersed in LUS for 14 days, magnitude 50,000X

6.68  
Figure 6.68 SEM micrograph of P2 non-dimmed glass, 100,000X

6.69  
Figure 6.69 SEM micrograph of P2 glass immersed in LUS for 14 days, magnitude 50,000X

SEM analysis of silver and copper ternary and doped glass samples also demonstrates that the doping process does not abolish the bioactivity of phosphocalcyls synthesized by the sol-gel technique, which is also confirmed by the XRD and FTIR assays of this thesis.

Surface morphology creates the premises of biologically active materials for static immersion testing because this type of topography stimulates osteoinduction by the synthesis of hydroxyapatite and carbonated hydroxyapatite.

### 6.11 Evaluation of the antibacterial activity of doped silver or copper glasses by microbiological examination

The doping of phosphocalcic glasses synthesized with transition metal ions causes them to acquire additional prophylactic properties (anti-inflammatory, cicatrizant, antimicrobial). Next, the microbiological study on doped glasses is presented in order to highlight their antimicrobial character and to determine the minimum bactericidal dose on the bacteria strains studied.

In order to carry out the microbiological study of silver and copper doped glasses from the silicophosphocalcic system, two strains of bacteria frequently involved in post-surgical in-hospital infections, one Gram positive and the other Gram negative, were selected. These were purchased from Mediclim Bucharest, in the form of lyophilized pure cultures: Escherichia coli ATCC Reg. 25922 - Gram negative pathogenic bacteria, highly resistant to antibiotic treatment and Staphylococcus aureus ATCC reg 25923 - Pathogenic gram positive bacterium with the highest risk of post-operative infection in prosthetic and bone reconstruction surgery [344, 350, 356 ].

Initial glasses testing, ranging from 0.1 g / ml / 24 h, has indicated that this dose is bactericidal for both bacterial strains in all glasses synthesized by the sol-gel technique.

As a result of the tests conducted to establish the minimum bactericidal doses for glass composition and for each strain, we established that Gram negative bacterium (Escherichia coli) with a thinner membrane of about 10 times that of Gram positive (Staphylococcus aureus) is more sensitive to the action of metal ions, which is why the E. coli assay was performed starting from the basic dilution with 0.03 g of glass, and for gold staphylococcal testing the basic dilution with 0.05 g of glass was used.

In the initial testing of the bactericidal capacity of TAg and TCu glass powders at the initial test dose of 0.1 g of glass and 0.1 ml of pure culture in each bacterium, contrary to the initial expectation that the glasses are biocidal, as well as those

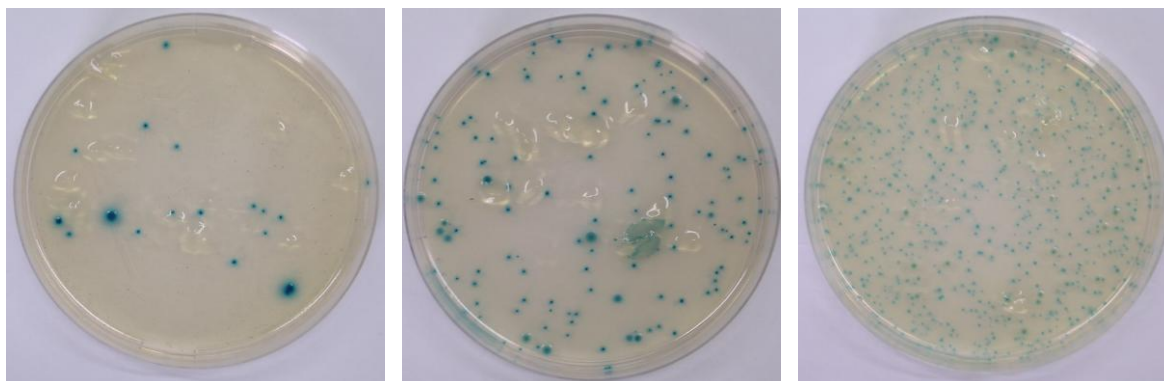
synthesized by sol-gel technique, plaques were found to have been infected with colonies specific to each bacterium.

From all the glasses synthesized by the sol-gel technique, the most antimicrobial effective for both strains of bacteria is that one doped with 5% silver PA4 with composite phase ceramic glass (reinforced ceramic glass) , Which also has one of the best thermal stability and particles with the smallest average diameters, according to TG and DLS. This is much more effective on the gold staphylococci ( $MBC = 5 \times 10^{-7}$ ) than on the E. coli strain ( $MBC = 5 \times 10^{-5}$ ).

The behavior of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains at various decimals of silver or copper doped bioglasses is similar, with the difference that different dilutions develop a different number of bacteria colonies, inversely proportional to the metal concentration in the plate. This is illustrated in Figures 6.87 and 6.88, respectively.



*Figure 6.87 Staphylococcus aureus plates at different glasses dilutions doped with silver or copper*



*Figure 6.88 Escherichia coli plates at different glasses dilutions doped with silver or copper*

The other silver-doped glasses synthesized by the sol-gel technique have equal bactericidal doses for each strain type, indicating that the doped metal dose did not directly influence the bacteriostatic activity of the glass directly.

The 3% copper-doped PC1 sample is more antimicrobial than PC2 with 5% cuprous ions, with smaller particles and much lower density, which seems to favor diffusion of metal ions. This is only noticeable for the strain of *Staphylococcus aureus*



(difference of one order of magnitude), because in the case of *Escherichia coli* the bactericidal doses are of the same order of magnitude.

The TAG glass synthesized by melting has minimal bactericidal doses of the same order of magnitude for both strains of bacteria ( $10^{-4}$  g / ml / 24h).

TCu copper doped glass exhibits a smaller bactericidal dose for *Staphylococcus aureus* versus *Escherichia coli* ( $5 \times 10^{-4}$  versus  $3 \times 10^{-3}$ ), thus having a better efficacy on Gram-positive bacteria as well as the composition PC1.

As a general conclusion of the antimicrobial study, it can be said that silver-doped bioglasses have an antimicrobial activity more effective than those copper-doped, with the exception of silver-doped melt, but in the general economy of a graft or implant lifetime, this aspect may be insignificant.

1% or even lower with one order of magnitude could provide the bactericidal property of all compositions, being optimal also for preserving the bioactivity property of melt synthesized glasses, as shown in the X-ray diffraction study and IR spectroscopy.

Since copper doping compounds are on average ten times cheaper than silver salts used for doping, it can also be concluded that copper-doped biomaterials are considerably cheaper and can provide an antimicrobial effect comparable to those doped with silver. This consideration may be an objective of a new research direction.

## **7. Conclusions and own contributions**

The doctoral thesis "Phosphocalcic Glasses with Special Properties" is characterized by the following personal contributions:

a) All the objectives of the doctoral thesis have been successfully accomplished because I managed to synthesize ternary phosphocalcic glasses and doped with silver and copper ions through both synthesis techniques proposed within the general objective of the thesis.

b) The sol-gel technique has been successfully used to obtain simple phosphocalcic glasses and doped with biocidal metals.

c) Although the sol-gel technique is a discontinuu process of relatively long duration (10 to 12 days) compared to the classic continuous and short-term melting process, it has proved to be reproducible and controllable when making changes of the composition and working parameters.

d) The modification of the stoichiometric compositions of glasses synthesized by the sol-gel technique was accomplished by the partial substitution of  $\text{SiO}_2$  or  $\text{CaO}$  for the doping with silver or copper. This resulted in glasses with secondary phases in the vitreous structure, with no negative effects on bioperformance.

e) Simultaneous presence of several crystalline phases in the structure of phosphocalcic glasses synthesized for the present research activity leads to their classification in the category of ceramic glasses and reinforced glasses (composite phase).

▪ We synthesized a physiologically simulated viable fluid following a revised Kokubo and Takadama recipe in 2006, called generic simulant human fluid.

f) The doping of bioglasses with silver and copper gave them antimicrobial properties, which was not seen in the ternary, undoped glasses.

g) Synthesized glasses have elemental compositions very close to those calculated theoretically, are predominantly amorphous and have a high specific surface area, characteristics demonstrated by the analyzes to which they were subjected. High

chemical reactivity was confirmed by identifying hydroxyapatite crystals formed at the glass-liquid interface for in vitro testing by XRD, FTIR and SEM analysis.

h) Antimicrobial capacity (bactericidal / bacteriostatic) is higher for silver doped glasses than for copper doped on both strains of bacteria used in the study, both Gram positive and Gram negative, regardless of the synthesis method. Considering the minimum bactericidal doses determined in the microbiological study performed, these differences in antibacterial efficacy tend to decrease, and eventually, on the long term, become irrelevant.

i) Since copper is about 10 times cheaper than silver and the antimicrobial effects are comparable, it is desirable to continue the studies on the incorporation of copper into prophylactic biomaterials.

Within the PhD thesis, "**Phosphocalcic Glasses with Special Properties**", the following **personal contributions** were made:

1) Carrying out an extensive documentary study on phosphocalcic biomaterials, especially on bioactive glasses, on silver and copper doping metals and their therapeutic role.

2) Biomaterials classification from new perspectives: by origin, cytotoxicity, duration and place of operation in the human body, function and mode of interaction with biological media.

3) Synthesis of ternary phosphocalcic glasses with silicate matrix doped with biocidal metals by sol-gel technique and melting at 3% and 5%, although previous studies indicated only quantities below 1 - 2%.

4) Copper ionization of glasses is a very poorly studied procedure worldwide, which is why the synthesis methods themselves, as well as the evaluation of the obtained materials, have been a challenge.

5) Obtaining mixed glass, ceramic and composite glass powders, due to compositional stoichiometric variations, but especially to metal doping.

6) The sol-gel synthesis method adopted for both ternary and doped glasses proved to be reproducible and required low production costs.

7) The simulant human fluid obtained for bioactivity testing of glasses proved to be viable, fact confirmed by the formation of apatite on the surface of glass powders synthesized by the gel-sol method.

8) We have found that doped glasses synthesized by melting have lost their bioactivity due to the high percentage of dopant metal.

9) We conducted a microbiological study on metal doped glasses to evaluate their antibacterial properties.

10) We have carried out a complete characterization of all glass compositions synthesized by new methods, specific to the research of biofunctional materials.

11) In the thesis we approached an area of biomaterial research, located at the boundary between materials engineering and medicine: doping with strong antibacterial agents, a pioneering field in our country with wide perspectives of innovation and improvement.

## **8. Research Perspectives**

In order to extend the area of research in the field addressed in this PhD thesis, the following topics could be considered in future investigations:

- the correlation of the chemical composition and the synthesis parameters with the physico-chemical and biofunctional properties of the synthesized materials.



- sol-gel synthesis of some bioglasses containing minimal doping metal and resumption of microbiological tests for these (max. 1%).
- Synthesis of doped bioglasses with therapeutic and prophylactic metal mixtures with synergistic action (Ag, Cu, Zn, Mg, Al, etc.) of the reinforced bioglasses class and evaluation of their mechanical properties.
- Performing cytotoxicity assays on cell media and / or protein matrix.
- Extend microbiological studies to other strains of bacteria in the top of those responsible for in-hospital infections and establish minimal bactericidal doses.

## 9. Bibliografie selectivă

- [7] Contract de cercetare nr. 198/2006, faza I, contractor Univ. de Medicină și Farmacie Carol Davila, București, România, în cadrul programului CEEX, 2006.
- [12] <https://ro.wikipedia.org/wiki/Biomaterial>
- [13] C. N. Cornell - *Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts*, Ortho. Clin. North Am. 30:591-598, 1999.
- [14] E. C. O. Shors - *Coralline bone graft substitutes*, Ortho. Clin. North Am. 30: 599-613, 1999.
- [15] D. F. Williams – *The Williams Dictionnary of Biomaterials*, Liverpool University Press, 1999.
- [102] L. Floroian, M. Badea, I. Șamotă – *Bioglass – the newest type of biomaterial with great potential of osteointegration*, J. M. B., no. 1, p. 20, 2015.
- [103] A. L. Andrade, P. Valerio, A. M. Goes, M. de Fatima Leite, R. Z. Domingues, J. Of Non-Crystalline Solids, 352:3508 -11, 2006.
- [104] M. G. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers - *Biomaterials*, 26:4903-11, 2005.
- [105] E. Saiz, M. Goldman, J. M. Gomez-Vega, A. P. Tomsia, G. W. Marshall, S. J. Marshall - *Biomaterials*, 23:3749-56, 2002.
- [133] M. M. Pereira, A. E. Clark, L. L. Hench - *Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro*, J Biomedical Material Research, 28:693-698, 1994.
- [156] R. Li, A. E. Clark, L. L. Hench, J. Appl. Biomater. 2, p. 231–239, 1991.
- [180] L. L. Hench, J. K. West - *The sol-gel process*. Chemical Reviews, 90: 33-72, 1990.
- [182] L. L. Hench, D. L. Wheeler, D. C. Greenspan - *Molecular control of bioreactivity in sol-gel glasses*. J Sol-gel Science and Technology, 13:245-250, 1998.
- [189] D. C. Greenspan, J. P. Zhong, Z. F. Chen, G. P. La Torre - *The evolution of degradability of melt an sol-gel derived Bioglass in vitro*, In Bioceramics 10, eds. L. Sedel, C. Rey, pp. 391-394, 1997.
- [190] D. C. Greenspan, J. P. Zhong, D. L. Wheeler - *Bioactivity and biodegradability: Melt vs sol-gel derived Bioglass in vitro and in vivo*, In Bioceramics 11, eds R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, pag. 345-348, 1998.
- [312] A. Rámila, M. Vallet-Regí – *Static and dynamic in vitro study of a sol–gel glass bioactivity*, Biomaterials Vol. 22, 16, p. 2301-2306, 2001.
- [313] S. Falaize, S. Radin, P. Ducheyne - *In vitro behaviour of silica-based xerogels intended as controlled release carriers*, J. Am. Ceram. Soc.; 82, p. 969–976, 1999.
- [314] I. I. Barba, A.J. Salinas, M Vallet-Regí - *Effect of the continuous solution exchange on the in vitro reactivity of a CaO-SiO<sub>2</sub> sol-gel glass*, J Biomed Mater Res, 51, p.191–199, 2000.
- [315] M. G. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers - *An analytical model for the dissolution of different particle size samples of bioglass in TRIS-buffered solution*, Biomaterials, 26, p. 4903–4911, 2005.

- [316] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro - *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W*, J. Biomed. Mater. Res., 24, p. 721-734, 1990.
- [317] M. Mami et al. – Investigation of the surface reactivity of a sol–gel derived glass in the ternary system  $\text{SiO}_2$ – $\text{CaO}$ – $\text{P}_2\text{O}_5$ , J. Applied Surface Science, 254, p. 7386–7393, 2008.
- [318] T. Kokubo, H. Takadama - *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?*.Biomaterials 27. 2907 - 2915, ISSN 0142-9612, 10.1016/ J. Biomaterials, 2006.01.017, 2006.
- [344] **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, V. Bratu - *Obtaining simple and doped phosphocalcic glasses by using sol-gel technique*, JOAM, Vol. 17, No. 7-8, p. 1038 – 1043, July – August 2015.
- [350] **D. Avram** , D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Gheboianu, I. Bancuță, M. G. Bratu - *Study of bioactivity and antimicrobial activity in case of glasses from  $\text{SiO}_2$  - $\text{CaO}$  -  $\text{P}_2\text{O}_5$  ternary system*, The Scientific Bulletin of Valahia University – Materials and Mechanics – Nr. 10 (year 13), 2015.
- [356] **D. Avram** , N. Angelescu, D. N. Ungureanu, I. Ioniță, A. Gheboianu, I. Bancuță, E. M. Lungulescu - *Study of phosphocalcic glasses  $\text{SiO}_2$  -  $\text{CaO}$  -  $\text{P}_2\text{O}_5$  system with and without silver, part II. The bioactivity analysis by FTIR, SEM methods and microbiological study of silver-doped glasses*, Rev. Ch. Română, vol.68, nr. 6, iunie 2017.

## CURRICULUM VITAE

1. Surname: **AVRAM**
2. First name: **DANIELA**
3. Date of birth: 29/08/1975, Târgoviște, Dâmbovița County
4. Citizenship: Romanian
5. Marital status: Married, 1 children
6. Education: Undergraduate and postgraduate: - 1998, Food industry engineering degree, Materials Science and Technology Faculty, Valahia University from Targoviste  
- 2009, PhD in the field of Materials Science, University Valahia from Targoviste. The title of the thesis „ Phosphocalcic glasses with special properties”
7. **Scientific title:** Dipl. Eng., Assistant Professor, Department of Food Engineering, Faculty of Environmental Eng. and Food Science

### 8. Professional experience:

<b>Period:</b>	1.03. 1999 – 1.10.2002	2002 – at present
<b>Place:</b>	Targoviste	Targoviste
<b>Institution:</b>	Valahia University from Targoviste, Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Arts	Valahia University from Targoviste, Department of Food Engineering, Faculty of Environmental Engineering and Food Science
<b>Job:</b>	University Tutor	Dipl. Eng., Assistant Professor
<b>Description:</b>	Supporting the lab disciplines: analytical chemistry, organic chemistry, physical chemistry and colloidal, chemistry technique	Teaching activities at university level and scientific research (practical guidance, seminars on basic subjects in the curriculum, guidance technology and licensing projects, member of the research team of some research projects and POSDRU)

### Biomaterials research results:

#### Published books:

1. **Bioactive Materials Based on Calcium Phosphates**, Avram Daniela, Dan Nicolae Ungureanu, Nicolae Angelescu, Valahia University Press, Targoviste, ISBN 978-606-603-031-1, 2011, 149 p.

#### ISI articles:

1. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, V. Bratu - *Obtaining simple and doped phosphocalcic glasses by using sol-gel technique*, JOAM, Vol. 17, No. 7-8, p. 1038 – 1043, July – August 2015.
2. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, I. Ioniță, A. Gheboianu, I. Bancuță - *Study of phosphocalcic glasses SiO<sub>2</sub> - CaO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system with and without silver, part I. Synthesis of glasses and characterization by WD- XRF and XRD*, Rev. Ch. Română, vol.68, nr. 5, mai 2017.
3. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, I. Ioniță, A. Gheboianu, I. Bancuță, E. M. Lungulescu - *Study of phosphocalcic glasses SiO<sub>2</sub> - CaO - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system with and without silver, part II. The bioactivity analysis by FTIR, SEM methods and microbiological study of silver-doped glasses*, Rev. Ch. Română, vol.68, nr. 6, iunie 2017.

4. **D. Avram**, N. Angelescu, D. N. Ungureanu, A. Gheboianu, I. Bancuță, T. Setnescu - *Study on bioactivity of phosphocalcic glasses*, JOAM, Vol. 18, No. 7-8, p. 691-696, July – August 2016.
5. D. N. Ungureanu, **D. Avram**, A. Catangiu, F. A. Anghelina, V. Despa - *Characterization of calcium phosphate ceramics obtained by chemical precipitation*, JOAM, Vol. 17, No. 7-8, P. 1225 – 1230, Brasov, July – August 2015.
6. **D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Catangiu, E. V. Stoian, C. Z. Rizescu, D. Avram** - *Synthesis*

And

*Characterization of Bioactive Sol – Gel Glass: A Preliminary Study, Advanced Materials Research Journal, ISSN: 1022 – 6680, DOI:10.4028/www.scientific.net /AMR.341-342.21, Vols. 341-342, p. 21-25, 2012.*

*BDI and B articles:*

1. **D. Avram**, D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Gheboianu, I. Bancuță, M. G. Bratu - *Study of bioactivity and antimicrobial activity in case of glasses from  $\text{SiO}_2$ -CaO -  $\text{P}_2\text{O}_5$  ternary system*, The Scientific Bulletin of Valahia University – Materials and Mechanics – Nr. 10 (year 13), 2015.
2. D. N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Catangiu, E. V. Stoian, C. Z. Rizescu, **D. Avram** - *Synthesis And Characterization of Bioactive Sol – Gel Glass: A Preliminary Study*, Advanced Materials Research Vols. 341-342, p. 21-25, Trans Tech Publications, Switzerland, doi:10.4028/ www.scientific.net /AMR.341-342.21, 2012.
3. D. N. Ungureanu, N. Angelescu, **D. Avram** - *Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of  $\text{SiO}_2$  – CaO –  $\text{P}_2\text{O}_5$  sol – gel glasses highlighted by XRD technique*, The Scientific Bulletin of Valahia University Materials and Mechanics, 6, 9, p.115 – 119, 2011.
4. **D. Avram**, Dan Nicolae Ungureanu, Nicolae Angelescu, Anca Gheboianu, Iulian Bancuta, Magda Gabriela Bratu - *Study of bioactivity and antimicrobial activity in case of glasses from  $\text{SiO}_2$ -CaO - $\text{P}_2\text{O}_5$  ternary system*, The Scientific Bulletin of Valahia University – Materials and Mechanics – Nr. 10 (year 13), In curs de publicare, 2015.

**Research results in food science and biotechnology (microbiology , biochemistry, food chemistry, analytical chemistry):**

Research contracts - 5 national, 1 international - research collaborator;

Books – 6 in national publishing , 1 article (34 pages) in international volume;

ISI articles - 15;

BDI and B articles - 28 and 12, other items over 15.

Guidance licensed projects – over 50.

**POSDRU** projects – 4.

*Awards, distinctions, Belonging to Professional Associations: 1 prize of CNCSIS - Chemistry Magazine 2009,*

*Being a member of the society of Chemistry - Chemistry Society of Romania.*

Date: 27.07. 2017

Daniela Avram

Assist. drd. eng.

