



UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI THUNICA 'CHIORCER REACHT'

Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

BIOMATERIALE APATITICE CU APLICAȚII ÎN MEDICINĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI

- Rezumatul Tezei De Doctorat -

Conducător științific: Prof. univ. dr. chim. Constantin LUCA

> Doctorand: ing. Ana Simona ILISEI (căs. Barna)



Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului "STUDII DOCTORALE PENTRU PERFORMANȚE EUROPENE ÎN CERCETARE ȘI INOVARE (CUANTUMDOC)" POSDRU/107/1.5/S/79407.

"STUDII DOCTORALE PENTRU PERFORMANŢE EUROPENE ÎN Proiectul CERCETARE ȘI INOVARE (CUANTUMDOC)" POSDRU/107/1.5/S/79407, este un proiect strategic care are ca obiectiv general "Aplicarea de strategii manageriale, de cercetare si didactice destinate îmbunătățirii formării initiale a viitorilor cercetători prin programul de studii universitare de doctorat, conform procesului de la Bologna, prin dezvoltarea unor competențe specifice cercetării științifice, dar și a unor competențe generale: managementul cercetării, competențe lingvistice și de comunicare, abilități de documentare, redactare, publicare și comunicare științifică, utilizarea mijloacelor moderne oferite de TIC, spiritul antreprenorial de transfer al rezultatelor cercetării. Dezvoltarea capitalului uman pentru cercetare și inovare va contribui pe termen lung la formarea doctoranzilor la nivel european cu preocupări interdisciplinare. Sprijinul financiar oferit doctoranzilor va asigura participarea la programe doctorale în țara și la stagii de cercetare în centre de cercetare sau universități din UE. Misiunea proiectului este formarea unui tânăr cercetator adaptat economiei de piață și noilor tehnologii, având cunoștințe teoretice, practice, economice și manageriale la nivel international. ce va promova principiile dezvoltării durabile și de protecție a mediului înconjurător."

Proiect finanțat în perioada 2010 - 2013

Finanțare proiect: 16.810.100,00 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași

Partener: Universitatea "Babeş Bolyai" din Cluj-Napoca

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Mihai BUDESCU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Alexandru OZUNU

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI RECTORATUL

Către.....

Vă facem cunoscut că, în ziua de 11 octombrie 2013 la ora 11^{co}, în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

> " BIOMATERIALE APATITICE CU APLICAȚII ÎN MEDICINĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI "

elaborată de doamna ing. Ana Simona ILISEI (căsătorită BARNA) în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătultă din:

1. Prof. univ.dr.ing. Dan CAŞCAVAL	președinte
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	
2. Prof. univ. dr. chim. Constantin LUCA	conducător științific
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	
3. Prof. univ. dr. chim. Ion SANDU	referent oficial
Universitatea "Alexandru Ioan Cuza", Iaşi	
4. Cercet. șt. gr. I., prof. asociat, dr. Maria BRUMĂ	referent oficial
Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni", lași	
5. Conf. dr. chim. Gabriela Margareta CIOBANU	referent oficial
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din lași	

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



Secretar universitate,



Mulțumiri

Finalizarea acestei teze de doctorat, prin care se încheie o etapă importantă din pregătirea mea profesională, nu reprezintă doar munca și efortul meu, ci se datorează și unor oameni minunați care au avut un rol esențial atât în evoluția mea știinfică cât și în dezvoltarea mea morală.

Deosebit respect și profundă recunoștiință doresc să aduc domnului Prof. univ. dr. chim. Constantin LUCA, conducătorul meu științific, pentru efortul și răbdarea depuse în formarea mea profesională și pentru îndrumarea competentă și permanentă pe parcursul întregii perioade de doctorat.

De asemenea, țin să mulțumesc în mod special doamnei Conf. dr. chim. Gabriela Margareta CIOBANU pentru ajutorul și contribuția deosebit de importantă la realizarea acestei lucrări. Mulțumesc cu multă căldură pentru sprijinul moral acordat, discuțiile științifice și încurajările permanente care au condus la finalizarea acestei tezei cât și la formarea mea ca cercetător științific.

Vreau să mulțumesc doamnei Prof. dr. Pamela HABIBOVIC și domnului Prof. dr. Clemens A. van BLITTERSWIJK pentru sprijinul și sfaturile acordate pe parcursul stagiului de cercetare efectuat în cadrul Departamentului de Inginerie Tisulară (MIRA) al Facultății de Știinte și Tehnologii, la Universitatea din Twente, Olanda.

Calde mulțumiri soțului meu, părinților și sorei care mi-au fost alături și m-au încurajat în finalizarea acestei lucrări.

Doresc sa adresez mulțumirile cuvenite tuturor celor care, direct sau indirect, prin sprijinul necondiționat, au contribuit la conturarea acestui drum științific și m-au susținut în finalizarea lui.

Vă mulţumesc!

Cu deosebită considerație, Ana Simona Ilisei

CUPRINS

INTRODUCERE
PARTEA I-a STUDIU DE LITERATURĂ
Cap. I. Biomateriale apatitice cu aplicații în medicina regenerativă osoasă
I.1. Concepte teoretice
I.2. Ţesutul osos. Apatita biologică
I.2.1. Structura și compoziția țesutului osos
I.2.2. Celulele osoase
I.2.3. Modelarea tesutului osos
I.3. Fosfații de calciu. Apatita sintetică
I.3.1. Hidroxiapatita
I.3.1.1. Structura hidroxiapatitei
I.3.1.2. Proprietăți ale hidroxiapatitei
I.3.1.3. Metode de obținere a hidroxiapatitei
I.3.1.3.1. Metode de precipitare chimică
I.3.1.3.2. Metode de depunere biomimetică
I.4. Aplicații în medicină ale biomaterialelor apatitice
I.4.1. Biomateriale apatitice aplicate în ortopedie
I.4.2. Biomateriale polimerice aplicate în ortopedie
I.4.3. Forme farmaceutice utilizate în medicamentația tesutului osos
I.4.3.1. Materiale transportoare de principii biologic active în medicină
I.4.3.2. Fosfați de calciu utilizați ca sisteme de eliberare controlată
I.4.3.2.1. Fosfați de calciu - principii biologic active cu acțiune antibacteriană
1.4.4. Funcționalizarea suprafeței biomaterialelor cu substanțe bioactive
I.4.4.1. Vitamine. Vitaminele A, D_2 și B_6
I.4.4.2. Aminoacizi. L-lisina clorhidrat
Cap. II. Materiale apatitice cu aplicații în protecția mediului
II.1. Poluarea apelor uzate provenite din industria textilă
II.2. Coloranți reactivi
II.3. Procese de epurare a apelor poluate cu coloranți
II.3.1. Adsorbția din soluție
II.3.1.1. Modele cinetice ale procesului de adsorbție
II.3.1.2. Evaluarea performanțelor procesului de adsorbție
II.3.2. Proprietăți ale materialelor utilizate în studiul de adsorbție
II.3.2.1. Hidroxiapatita ca material adsorbant
II.3.2.2. Colorantul Reactive Blue 204 ca material adsorbent
PARTEA a-II-a STRATEGIA EXPERIMENTALĂ
Cap. III. Metode și tehnici de caracterizare a biomaterialelor
III.1. Metode de caracterizare a biomaterialelor
III.1.1. Spectroscopia de absorbție în infraroșu (FTIR)
III.1.2. Spectroscopia de absorbție moleculară în ultraviolet (UV-Vis)
III.1.3. Spectroscopia de fotoelectroni cu raze X (XPS)
III.1.4. Microscopia electronică de baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin
dispersie de energie (SEM - EDX)
III.1.5. Difracția de raze X (DRX)
III.1.6. Determinarea suprafeței specifice BET și a distribuției porilor
III.2. Materiale și reactivi utilizați
Con BY Obdiment in the intervention of the intervention
Uap. IV. Obținerea și caracterizarea nidroxiapatitei nanometrice
IV.1. Directo colul de obtinere a hidrovianatitai
IV 1.2. Studiul factorilor ce influentează obtinarea hidrovianatitei
IV.1.2. Studiul lactorilo de influențează obținerea filuloxiapatilei
IV 21 Diffraction do rozo V (VDD)
IV.2.1. Diffacția de faze A (ARD) IV.2.2. Microscopia electronică cu baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin
dispersie de energie (SEM-EDX)
IV.2.3. Determinarea suprafeței specifice BET

IV.2.4. Spectroscopia de absorbție în infraroșu (FTIR)	95
IV.2.5. Determinarea punctul de sarcină electrică zero	97
IV.3. Concluzii	100
Can. V. Biocompozite ne bază de hidroxianatită	103
V 1 Riocompozite poroase ne bază de hidroxianatită și noliuretan	103
V 1.1 Diopineori da bidraviantifica a gunarturi norgana poliuratania prin progodog	105
V.1.1. Deputient de nui oxiapatita pe suportuit poroase ponutetance prin procedee	104
biomimetice	104
V.1.1.1. Protocol de obținere	104
V.1.1.2. Caracterizarea morfologică a biocompozitelor	107
V.1.2. Depuneri de hidroxiapatită și vitamine pe suporturi poroase poliuretanice prin procedee	
biomimetice	112
V.1.2.1. Protocol de obtinere	113
V.1.2.2. Caracterizarea structural - morfologică a biocompozitelor	115
V 1 2 2 1 Microscopia electronică cu baleiai cuplată cu spectroscopia de	
raze X nrin disnersie de energie (SFM-FDX)	115
V 1 2 2 2 Spectroscopia da abcorbtia în infranceu (ETID)	123
V 1.2.2.2. Speciosopie de absolute in minatosu (FTR)	123
v.1.2.5. Caracterizarea biologica a biocompozitelor	124
V.1.2.3.1. Metodologia izolarii și cultivarii celulare.	125
V.1.2.3.2. Vizualizarea celulară prin colorare cu Albastru de metilen	126
V.1.2.4. Studiul procesului de degradare <i>in vitro</i> al biocompozitelor	128
V.1.3. Depuneri de hidroxiapatită și nanoparticule de Ag pe suporturi poroase poliuretanice prin	
procedee biomimetice	130
V.1.3.1. Protocol de obtinere	130
V 1 3 2 Caracterizarea structural - morfologică a biocompozitelor	133
V 1 3 2 1 Microscopia electronică cu balejaj cunlată cu spectroscopia de	100
v 1.5.2.11 Interoscopia dictorina da anergia (SEM EDV)	122
V 1 2 2 2 Diffractia da raza V (DDV)	135
V.1.3.2.2. Diffacția de faze X (DKX)	130
V.1.3.2.3. Spectroscopie de absorbție moleculară în ultraviolet (UV-Vis)	137
V.1.3.2.4. Spectroscopie de fotoelectroni cu raze X (XPS)	140
V.1.3.3. Caracterizarea biologică a biocompozitelor	141
V.1.3.4. Caracterizarea bacteriologică a biocompozitelor	143
V.2. Biocompozite pulverulente pe bază de hidroxiapatită și principii biologic active	144
V.2.1. Protocol de obtinere	145
V.2.2. Caracterizarea structural – morfologică a biocompozitelor	147
V 2 2 1 Microscopie electronică cu baleiai (SEM)	147
V 2 2 2 Spectrosconie de absorbtie în infransu (ETIR)	151
V 2 Crasterizarea biologică a biocompozitalor	151
V.2.5. Caracterizatea obiologica a obiocompozitorio	153
V.2.5.1. Studi de vladinate și choloxicitate celulata.	154
V.2.3.2. Vizualizarea celulelor prin microscopie electronica cu balelaj (SEM)	155
V.2.4. Caracterizarea bacteriologică a biocompozitelor	162
V.2.5. Teste de eliberare <i>in vitro</i> a sulfatului de gentamicină din biocompozite	168
V.2.5.1. Protocol experimental	170
V.2.5.2. Profilul eliberării sulfatului de gentamicină din biocompozite	172
V.3. Concluzii	177
Can VI. Materiale anatitice cu anlicatii în protectia mediului	181
VI 1. Introducere	181
VI.1. Introducero.	101
V1.2. Studiu proprietaților de ausorbție are îndroxiaparter.	102
V1.2.1. Influența parametrilor de adsorbție asupra procesului de adsorbție	183
VI.2.1.1. Studiul influenței pH-ului soluției de colorant	183
VI.2.1.2. Studiul influenței cantității de adsorbant	185
VI.2.1.3. Studiul influenței concentrației colorantului	185
VI.2.1.4. Studiul influenței temperaturii	186
VI.3. Studiul cinetic al procesului de adsorbtie	187
VI.4. Studiul procesului de desorbtie	190
VI 5 Concluzii	191
·	1/1
Can VII. Canaluzii Canarala	102
Cap, y 11, CUICIUZII Utilti alt	175
ACTIVITATE STUNTIEICĂ DIN CADDIIL TEZELDE DOCTODAT	107
AUTIVITATE ȘTIINȚIFICA DIN CADKUL TEZET DE DUUTUKAT	19/
KEFEKIN J E DIBLIUGKAFICE	201

Rezumatul lucrării prezintă, într-o formă succintă, o parte din rezultatele originale obținute și concluziile generale (selecție). În rezumat a fost menținută numerotarea figurilor, tabelelor și a ecuațiilor din cadrul tezei.

INTRODUCERE

Prezenta teză de doctorat are drept preocupare exploatarea ariei de folosire a materialelor apatitice în sfera aplicațiilor biomedicale cât și în domeniul protecției mediului.

Referitor la <u>aplicațiile biomedicale</u>, la momentul actual, în terapia aplicată în chirurgia plastică și reconstructivă a țesutului osos sunt utilizate o diversitate de biomateriale. Aceste biomateriale trebuiesc să îndeplinească o serie de caracteristici legate de structura lor fizico-chimică, de interacțiunea cu mediului fiziologic în care vor fi utilizate și de proprietățile acestora de a permite atașarea și proliferarea celulară. Datorită proprietăților importante necesare, precum biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, proprietăți mecanice și osteoconductivitatea, numărul de materiale ce se pretează pentru astfel de aplicații este restrâns. Asadar soluția ideală ar fi obținerea de biomateriale compozite care să imbine sinergetic proprietățile constituienților din care sunt formați luând naștere astfel noi biomateriale cu proprietăți superioare.

Un alt aspect ce trebuie luat în considerare în proiectarea unui substituent osos îl reprezintă faptul căci biocompozitul trebuie să imite cât mai fidel posibil proprietățile fizico-chimice ale țesutului osos.

Tinând cont de aceste considerente, în prezentul studiu, drept component de bază a compozitelor s-a ales **hidroxiapatita sintetică**, deoarece prezintă o structură similară cu cea a mineralului primar din componența țesutului osos cât și pentru proprietățile sale remarcante cum ar fi, biocompatibilitatea, bioactivitatea, ne-toxicitatea, osteoinducția, osteoinducția, osteointegrarea, demonstrate în diferite studii *in vitro* și *in vivo*.

Hidroxiapatita de puritate avansată a fost utilizată, pînă în prezent, în diferite forme pentru diferite utilizări biomedicale: ca ceramică densă, sinterizată (implant pentru urechea medie, uz alveolar), sub formă poroasă sau granule pentru umplerea defectelor (cavități) osoase, ca materiale pentru depunere pe suprafața implantelor precum și drept materiale de tip vector în eliberarea de principii biologic active.

În ceea ce privește <u>domeniul protecției mediului</u>, dezvoltarea industrială reprezintă una din sursele de poluare a mediului cu consecințe directe asupra dezechilibrului ecosistemelor, datorită acumulării poluanților. Industria de obținere a coloranților și industria finisajului textil sunt numai două ramuri industriale în care apele uzate conțin diferite tipuri de poluanți cum sunt coloranții și metalele grele. Coloranții pe lângă aspectul inestetic care îl dau apelor sunt considerați sursă de poluare eutrofică și poluanți periculoși care dau efecte mutagene și cancerigene în timp.

Așadar, la nivel mondial se impune nevoia de procese cu impact negativ limitat asupra mediului și identificarea de tehnologii de epurare aplicabile la nivel industrial, pentru îndepărtarea poluanților până la limita acceptată prin standarde pentru deversarea în emisar. Noile cerințe economice duc la dezvoltarea de cercetări cu răspuns aplicativ și la aplicarea de tehnologii cu grad scăzut de poluare, găsirea de noi materiale "economice" care să poată fi folosite în practica depoluării apelor. Analizând metodele de obținere a hidroxiapatitei se poate spune căci aceasta este un "material economic" din punct de vedere al costului de producție dar și un "material prietenos (eco-friendly)" deoarece în obținerea sa nu sunt necesare materii prime și/sau metode/ tehnologii care pot avea un impact negativ asupra mediului inconjurător.

În afară de proprietățile specifice aferente biomaterialelor, hidroxiapatita posedă și o bună capacitate de adsorbție a unor diferite specii chimice cu masă moleculară mică/mare. Ea poate schimba cu ușurință ionii de calciu, fosfat și hidroxil cu alți ioni (anioni sau cationi), aceasta fiind un material adsorbant ideal ce poate fi utilizat cu succes în procesele de depoluare chimică a apelor uzate.

Lunând în considerare acest context, lucrarea de față își propune obținerea și caracterizarea unor biomateriale compozite pe bază de hidroxiapatită și principii biologic active care să aibă structura chimică și morfologică similară cu cele ale țesutului osos precum și obținerea de hidroxiapatită nanocristalină cu aplicații în protecția mediului.

Studiile vizate în această lucrare au avut drept OBIECTIVE, următoarele:

1) Obținerea de biocompozite hidroxiapatită – poliuretan – principii biologic active prin procedee biomimetice.

2) Obținerea unor biocompozite apatită – sulfat de gentamicină – L-lisină clorhidrat prin procedee de coprecipitare chimică cu aplicații medicale, ca sisteme topice cu eliberare controlată de antibiotic.

3) Obținerea de hidroxiapatită nanocristalină sub formă de pulbere și utilizarea sa ca material adsorbant în procesul adsorbție din soluție apoasă a unui colorant textil (Reactive Blue 204).

Teza de doctorat este structurată în două părți: partea I-a studiu de literatură (2 capitole) și partea a II-a, strategia experimentală (5 capitole).

Partea I-a – **Studiu de literatură** - cuprinde două capitole, având o extindere de 58 de pagini și tratează unele aspecte privind aplicabilitatea materialelor apatitice în medicina regenerativă osoasă și protecția mediului.

Capitolul I "*Biomateriale apatitice cu aplicații în ingineria tisulară a osului*" prezintă principalele caracteristici ale tesutului osos precum structura, compoziția și funcția acestuia, împreună cu stadiul actual de cunoaștere în domeniul biomaterialelor apatitice utilizate în ingineria regenerativă a țesutului osos. Materialele utilizate pentru substituția osoasă sunt prezentate împreună cu proprietățile, avantajele și dezavantajele acestora, evidențiindu-se caracteristicie ideale ale unui material cu rol de substituent osos.

În capitolul al II-lea "*Materiale apatitice cu aplicații în protecția mediului*" este prezentat stadiul actual al cunoașterii în domeniul poluării apelor de suprafață cu coloranți textili industriali, sursele de poluare, toxicitatea acestora, folosirea procesului de adsorbție în depoluarea apelor, proprietățile esențiale ale materialelor adsorbtive corelate cu proprietățile poluanților, caracteristicile și teoriile care descriu procesul de adsorbție precum și modelele specifice ale adsorbției. În urma acestui studiu s-au evidențiat principalele obiective de cercetare ale lucrării și elementele de noutate realizate.

Partea a doua a lucrării – **Strategia experimentală** – cuprinde 5 capitole având o extindere de 126 pagini și include materialele și metodele de lucru, rezultatele originale obținute și concluziile generale.

În capitolul al III-lea *"Metode și tehnici de caracterizare a biomaterialelor"* sunt prezentate tehnicile de analiză și respectiv materialele și reactivii utilizați în obținerea materialelor propuse.

Tehnicile de analiză folosite în scopul caracterizării materialelor obținute sunt: spectroscopia de absorbție în infraroșu (FTIR), spectroscopia UV-Vis, spectroscopia de fotoelectroni cu raze X (XPS), microscopia electronică de baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (SEM - EDX), difracția de raze X (DRX), determinarea suprafeței specifice BET și a distribuției porilor.

Capitolul al IV-lea "*Obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei nanometrice*" prezintă sinteza de hidroxiapatită, utilizând metoda de coprecipitare chimică pe cale umedă și caracterizarea pulberii de hidroxiapatită nanocristalină astfel obținută. Se urmărește optimizarea procedeului de sinteză prin studierea factorilor care influențează obținerea de hidroxiapatită stoechiometrică, nanocristalină, de puritate ridicată, sub formă de pulbere (cum ar fi: modalitatea de preparare a gelului de sinteză, timpul de maturare al acestuia, influența pH-ului, temperatura de maturare, temperatura de calcinare) cât și investigarea efectelor produse de chimismul amestecului lichid de sinteză.

Totodată, s-a determinat punctul de sarcină electrică zero (pHpzc) și suprafața specifică prin "metoda BET" pentru probele de hidroxiapatită obținute, în scopul utilizării acestor materiale în procesul de adsorbție a unui colorant anionic, Reactive Blue 204, din soluții apoase.

Capitolul al V-lea intitulat *"Biocompozite pe bază de hidroxiapatită"* este dedicat prezentării rezultatelor experimentale privind obținerea și caracterizarea a două tipuri de biocompozite pe bază de hidroxiapatită: poroase și pulverulente. Biocompozite poroase pe bază de hidroxiapatită -polimeri sintetici (poliuretan) și principii biologic active (vitamina A și vitamina D₂, vitamina B₆, nanoparticule de argint) au fost obținute utilizând procedee biomimetice de procesare (în condiții de temperatură și pH fiziologice: 37 °C și pH 7,42) iar biocompozitele pulverulente pe bază de hidroxiapatită și principii active (sulfat de gentamicină și L- lisină clorhidrat) s-au sintetizat apelând la metoda de coprecipitare chimică pe cale umedă.

Analiza proprietăților fizico-chimice, morfologice, evaluarea efectului antibacterian (teste antimicrobiene *in vitro*, pe culturi bacteriene - *Staphylococcus aureus, Escherichia coli*) și evaluarea proprietății de biocompatibilitate (teste de viabilitate / citotoxicitate celulară *in vitro*) au fost efectuate cu scopul de a obține cât mai multe informații despre structura și caracteristicile biocompozitelor.

Ca o particularitate pentru biocompozitele pulverulente, s-a realizat un studiu de eliberare controlată a sulfatului de gentamicină din structura acestora pentru a fi posibilă descrierea profilului cinetic de eliberare a antibioticului în cazul implantării materialului în calitate de substituient osos.

Capitolul al VI-lea intitulat *"Materiale apatitice cu aplicații în protecția mediului*" dovedește aplicabilitatea hidroxiapatitei drept material adsorbant în procesul de epurare prin metode de adsorbție/schimb ionic a apelor poluate cu coloranți textili. S-a studiat posibilitatea recuperării din apă a colorantului textil Reactive Blue 204, urmărindu-se optimizarea condițiilor experimentale privind procesul de adsorbție, respectiv studiul cineticii procesului de adsorbție.

În capitolul al VII-lea al tezei de doctorat sunt prezentate concluziile generale privind cercetările efectuate.

Teza de doctorat are o întindere de 214 și mai cuprinde activitatea științifică și referințele bibliografice care au stat la baza cercetărilor științifice.

Acest manuscris, aduce contribuții esențiale în domeniul biomaterialelor compozite cu aplicabilitate terapeutică în medicina regenerativă osoasă și respectiv în domeniul controlului poluării apelor industriale cu coloranți textili.

Contribuțiile originale ale activității de cercetare din cadrul doctoraturii au fost valorificate prin diseminarea rezultatelor în 10 lucrări științice (dintre care 6 lucrări publicate în reviste cotate ISI, 2 în reviste BDI și 2 lucrări publicate în volumele simpozioanelor) și respectiv prin participarea la 10 manifestări științifice (naționale și internaționale).

Capitolul IV. OBŢINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROXIAPATITEI NANOMETRICE

IV.1. Sinteza hidroxiapatitei

În cadrul acestui capitol se prezintă rezultatele privind obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei nanometrice sub formă de pulbere cristalină și de puritate ridicată, aplicând metoda precipitării chimice din soluție (*Ilisei* și colab., 2012^a; Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2013^a).

Principalele obiective urmărite în acest studiu au fost:

- \triangleright sinteza hidroxiapatitei nanometrice și optimizarea procedeului de sinteză prin studierea factorilor care influențează obținerea de hidroxiapatită stoechiometrică, sub formă de pulbere nanocristalină și de puritate ridicată;
- caracterizarea structural morfologică a materialelor obținute apelând la metode și tehnici de analiză avansate și \triangleright performante. Probele obținute au fost caracterizate fizico-chimic aplicând metode moderne precum:

- difractie de raze X (DRX) în vederea stabilirii gradului de cristalinitate, a dimensiunii cristalitelor și identificarea fazelor cristaline din materialul pulverulent;

- spectroscopie în IR cu transformată Fourier (FTIR) pentru evidentierea principalelor grupări functionale din structura apatitică;

- microscopie electronică cu baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (SEM-EDX) pentru stabilirea morfologiei cristalelor de hidroxiapatită;

- metoda Brunauer - Emmett - Teller (BET) pentru determinarea ariei suprafeței specifice, în timp ce volumul și distribuția dimensiunii porilor au fost determinate cu ajutorul metodei Barrett - Joyner - Halenda (BJH).

IV.1.1. Protocolul de obținere a hidroxiapatitei

Pulberea de hidroxiapatită a fost sintetizată prin metoda precipitării chimice în soluție (*Ilisei* și colab., 2012^a; Ciobanu, Ilisei și colab., 2013^a), pe baza metodologiei prezentate în literatura de specialitate (Nathanael și colab., 2010; Pop și colab., 2003). S-au folosit următoarele materii prime:

- surse (precursori) de calciu si fosfor: azotat de calciu tetrahidratat Ca(NO₃), 4H₂O și fosfat acid de amoniu (NH₄), HPO₄,

- hidroxid de amoniu NH₄OH cu rol de reglare a pH-ului.

Metoda prezintă o serie de avantaje și anume: se utilizează reactivi usor de procurat, protocolul de sinteză este relativ simplu, nu necesită aparatură complexă, nu se utilizează solvenți organici, iar produsul obținut este de puritate ridicată. De asemenea, prin această metodă se pot produce cantități relativ mari de hidroxiapatită și la un cost rezonabil.

Protocolul procesului de obținere a hidroxiapatitei, cu parametrii de proces optimi, presupune parcurgerea următoarelor etape:

1. Prepararea soluțiilor inițiale de precursori pe bază de calciu și fosfor:

- soluția A = soluție apoasă de Ca(NO₃)₂·4H₂O cu concentrația 0,01 1,0 M;
- soluția B = soluție apoasă de $(NH_4)_2$ HPO₄ cu concentrația 0,006 0,5 M;
- **2.** Amestecarea soluțiilor de Ca $(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ și $(NH_4)_2HPO_4$:
 - cantitățile de soluții A și B luate în lucru se aleg în așa fel încât raportul molar Ca/P să fie egal cu 1,67 corespunzător cu cel al hidroxiapatitei;
 - viteza de agitare a suspensiei este de 1.200 1.500 rot/min;
 - pH-ul mediului de reacție se menține la valori > 10 prin adăugare de NH₄OH;
 încălzirea suspensiei la 70 90 °C cu scopul accelerării vitezei de reacție;
- **3.** Maturarea suspensiei timp de 24 de ore, la 20 60 °C, sub agitare;

Separarea din suspensie a precipitatului obținut prin filtrare la vid, spălarea, uscarea și calcinarea lui. Spălarea se face 4. în mod repetat cu apă ultra pură pentru a îndepărta NH₄OH rezidual (până când conductivitatea supernatantului are valori apropiate cu cea corespunzătoare apei ultra pure) și cu etanol 96 % pentru a îndepărta H₂O. Uscarea precipitatului obținut se realizează în etuvă la temperatura de 110 °C, sub vid, timp de 24 h. Calcinarea pulberii albe uscate se realizează într-un cuptor de calcinare la 850 °C, timp de 1 h.

În etapele de amestecare a soluțiilor precursoare (A și B) și de maturare a sistemului coloidal de sinteză au loc o serie de procese fizico - chimice. Dintre acestea cel mai important este procesul chimic de precipitare a hidroxiapatitei, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, din precursorii pe bază de calciu și fosfor, la pH > 10. Procesul este descris de următoarea ecuație chimică:

$$10Ca(NO_3)_2 + 6(NH_4)_2HPO_4 + 2NH_4OH \rightarrow (IV 1)$$

$$\rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \downarrow +14NH_4NO_3 + 6HNO_3$$

sau în formă simplicată:

$$10Ca^{2+} + 6PO_4^{3-} + 2OH^- \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \downarrow$$
 (IV.2)

În studiile efectuate pe parcursul tezei s-au folosit două variante de hidroxiapatită: necalcinată (notată HA-N) și calcinată (notată HA-C).

În figura IV.1 este prezentă schema protocolului de obtinere a hidroxiapatitei nanometrice, cu etapele si conditiile corespunzătoare.



Figura IV.1. Schema protocolului de obținere a pulberii de hidroxiapatită

IV.1.2. Studiul factorilor ce influențează obținerea hidroxiapatitei

Rezultatele finale ale sintezei hidroxiapatitei depind în primul rând de compoziția amestecului de reacție și apoi de timpul și temperatura la care se realizează cristalizarea. De asemenea, același amestec de reacție se poate realiza folosind o mare diversitate de reactanți/precursori (solubili în mediul de reacție), astfel că, uneori evoluția unui amestec spre o fază cristalină depinde mai mult de factorii cinetici decât de cei termodinamici. Extinzând legea transformărilor consecutive a lui Ostwald la sinteza hidroxiapatitei, în general, în prima etapă se formează o fază mai puțin stabilă care evoluează în timp prin una sau mai multe faze intermediare, spre faza cea mai stabilă. Detaliind și mai mult fenomenul, cristalizarea depinde esențial de concentrația fazei solide, care la rândul ei influențează viteza de formare a germenilor de cristalizare. Desigur, germinația este influențată și de alți factori de natură netermodinamică printre care se menționează: calitatea și structura materiilor prime (precursorii), modul de amestecare (succesiunea), interacțiunile cu cationi sau cu adaosuri cu efect mineralizant etc.

După formarea amestecului de reacție, în prima etapă, în faza nucleație, au loc diverse etape de transfer de masă între faze, solubilizări și transfer de structuri care apar și dispar, ca etapă premergătoare organizării germenilor de cristalizare.

În principiu, pentru sinteza hidroxiapatitei, în condiții optime, trebuiesc alese cu grijă materiile prime și succesiunea lor de amestecare. Are importanță uneori și pregătirea materiilor prime înainte de sinteză, maturarea lor sau diluția.

a) Prepararea gelului de sinteză

Modul de preparare a gelului de sinteză prezintă o mare importanță deoarece el poate influența în special perioadele de nucleație și de inducție, ceea ce înseamnă o anumită viteză de cristalizare și o anumită puritate fazică a produsului final.

Este necesar să se urmeze o anumită ordine de adăugare a reactivilor, viteza de adăugare a acestora, temperatura de lucru, precum și un anumit regim de amestecare al dispersiei. Amestecarea este necesară în toate preparările întrucât există posibilitatea unor gelifieri secvențiale și, deci, formarea unor faze mixte nedorite.

b) Maturarea gelului de sinteză

De asemenea, în multe cazuri, după prepararea gelului de sinteză, este necesară o **perioadă de maturare** a acestuia care se realizează prin păstrarea în repaus, un timp determinat, la temperatura ambiantă a amestecului. În acest interval de timp are loc o reorganizare chimico-structurală a fazelor lichid / solid din sistemul geliform.

Deși au fost făcute multe studii asupra gelului de sinteză, totuși nu se cunoaște cu mare precizie mecanismul perioadei de maturare, premergătoare sintezei propriu-zise. Rolul maturării solului amorf se pare că este de a da posibilitatea formării unor nuclee, mai puțin active la temperatura la care se află; acestea, în timpul sintezei, la temperaturi ridicate, devin active și favorirează cristalizarea. Nucleele formate sunt germenii de cristalizare pe care se dezvoltă materialul cristalin.

c) <u>Influența pH-ului</u>

S-a studiat precipitarea hidroxiapatitei la pH diferit, respectiv la: pH = 4, 6, 9 și 10, păstrând constanți ceilalți parametri de proces: timpul de maturare ($t_m = 24$ h) și temperatura de maturare ($T_m = 60$ °C). În tabelul IV.1 sunt expuse observațiile privind efectul pH-ului asupra caracteristicilor pulberii de hidroxiapatită.

Proba	pН	T _m (°C)	t _m (h)	Observații
HA-6	4	60	24	 cristale vizibile, mari existența și a unor faze amorfe
HA-7	6			 cristale fine, aspect mat existența și a unor faze amorfe
HA-1	9			 cristale fine existența și a unor faze amorfe
HA-2	10			- cristale fine, bine definite

Tabelul IV.1	. Influența	pH-ului	asupra	sintezei	hidro	oxiapatitei
--------------	-------------	---------	--------	----------	-------	-------------

Experimente efectuate la diferite valori ale pH-lui au dovedit faptul că gradul de cristalinitate al probelor atinge valoarea maximă la pH = 10 când și produsul obținut este hidroxiapatită pură. La alte valori de pH produsul de sinteză nu este cel dorit, așa cum au confirmat datele de difracție de raze X (DRX) și microscopie electronică cu baleiaj (SEM). În figura IV.2 se prezintă imagini SEM ale probelor HA-2 (obținută la pH = 10) și HA-7 (obținută la pH = 6). Se observă diferențe foarte mari în ceea ce privește forma și mărimea cristalelor din probele necalcinate obținute la pH-uri diferite. Proba HA-2 s-a dovedit a fi hidroxiapatită, conform analizelor prezentate în paragraful IV.2.



Figura IV.2. Imagini SEM ale probelor HA-2 (obținută la pH = 10) și HA-7 (obținută la pH = 6) (*Ilisei* și colab., 2012^a)

d) <u>Influența temperaturii de maturare</u>

S-a studiat influența temperaturii de maturare asupra procesului de obținere a pulberii de hidroxiapatită variind temperatura în domeniul 30 - 90 °C, păstrând constanți ceilalți parametri de proces: pH-ul (pH = 10) și respectiv timpul de maturare (t_m = 24 h). În tabelul IV.2. sunt expuse observațiile privind efectul temperaturii de maturare asupra caracteristicilor pulberii de hidroxiapatită.

Tabelul IV.2.	Influența	temperaturii	de maturare asupra	a sintezei hidroxiapatite	i
		1	1	1	

Proba	рН	T _m (°C)	t _m (h)	Observații
HA-9		40		 cristale fine existența și a unor faze amorfe
HA-2	10	60	24	- cristale fine, bine definite
HA-8		80		 - cristale mari - existența și a unor faze amorfe

Experimente efectuate, la diferite temperaturi de maturare, au dovedit faptul că gradul de cristalinitate maxim al probelor este atins la temperatura de 60 °C când și produsul obținut este hidroxiapatită pură. La temperaturi sub și peste 60 °C cristalizarea este mult mai lentă, iar produsul de sinteză nu este cel dorit, așa cum au confirmat datele de difracție de raze X (DRX) și microscopie electronică cu baleiaj (SEM).

e) Influența timpului de maturare

S-a studiat influența timpului de maturare la perioade diferite de timp: $t_m = 0,5$ h (30 min), 1 h, 6 h, 12 h, 24 h și 46 h, păstrând constanți ceilalți parametri de proces: pH-ul (pH = 10) și temperatura de maturare ($T_m = 60$ °C). În tabelul IV.3 sunt expuse observațiile concluzionate în urma studiului experimental.

Proba	рН	T _m (°C)	t _m (h)	Observații
HA-3			0,5	 cristale foarte fine miros puternic de amoniac existența și a unor faze amorfe
HA-4	10	60	1	 cristale foarte fine miros puternic de amoniac existența și a unor faze amorfe
HA-2			24	- cristale fine, bine definite
HA-5			48	 cristale de mărime medie existența și a unor faze amorfe

Tabelul IV.3. Influența timpul	ii de maturare asupra	sintezei hidroxiapatitei
--------------------------------	-----------------------	--------------------------

Experimente efectuate la diferiți timpi de maturare au dovedit faptul că gradul de cristalinitate maxim al probelor se atinge la circa 24 h de maturare când și produsul obținut este hidroxiapatită pură. La alți timpi de maturare produsul de sinteză nu este cel dorit, așa cum au confirmat datele de difracție de raze X (DRX) și microscopie electronică cu baleiaj (SEM).

f) Influența temperaturii de calcinare

Un ultim studiu a constat în stabilirea temperaturii optime de calcinare a pulberii de hidroxiapatită în scopul observării stabilității termice și modificărilor structurale a compusului obținut. S-a variat temperatura de calcinare ($T_c = 300$ °C, 400 °C, 500 °C, 850 °C, 1000 °C, 1250 °C), păstrând constanți ceilalți parametri de proces: pH-ul amestecului (pH = 10), timpul de maturare ($t_m = 24$ h) și temperatura de maturare ($T_m = 60$ °C).

În urma caracterizării structurale și morfologice a probelor studiate s-a constatat că la o temperatură de calcinare $T_c = 850$ °C produsul obținut este hidroxiapatită pură.

IV.2. Caracterizarea structural - morfologică a materialelor apatitice

IV.2.1. Difracția de raze X (DRX)

Analiza probelor obținute prin difracție de raze X s-a efectuat cu ajutorul unui difractometru X'PERT PRO MRD, folosindu-se radiația caracteristică K α a cuprului (CuK α radiation, $\lambda = 0,15418$ nm), la o tensiune de 40 kV și intensitate de 30 mA, în domeniul unghiular $2\theta = 20 - 80^{\circ}$.

Difractogramele caracteristice pentru pulberile de hidroxiapatită *necalcinată* (proba notată **HA-N**) și *calcinată* (proba notată **HA-C**) obținute în cadrul cercetările noastre se prezintă în figura IV.3 (<u>Ilisei</u> și colab., 2012^a, Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2013^a). Ambele difractograme DRX indică faptul că atât proba necalcinată (figura IV.3.a) cât și cea calcinată (figura IV.3.b) prezintă picuri (linii de difracție) caracteristice hidroxiapatitei în domeniul unghiular 20 cuprins între 20° și 70°. Cele mai importante picuri sunt în zona $26^{\circ} - 34^{\circ}$ care corespund planelor cristaline (002), (211), (112) și (300), ele indicând gradul de cristalinitate a structurii apatitice. Valorile obținute sunt în bună concordanță cu difractograma standard pentru hidroxiapatita pură conform cartotecii difractometrice JCPDS 09-0432, din baza de date cristalografice elaborată de către Comitetul Reunit privind Standardele de Difracție al Pulberilor (Joint Committee on Powder Diffraction Standards - JCPDS).

Detaliind, se poate observa că difractograma DRX a probei necalcinate HA-N (figura IV.3.a) conține picurile de difracție caracteristice hidroxiapatitei, dar intensitatea și lățimea lor indică faptul că materialul prezintă o cristalinitate mai scăzută, în material existând atât fază cristalină cât și fază amorfă. Se observă o foarte slabă deplasare a întregului spectru către unghiuri de difracție puțin mai mari ($\Delta \theta = 0, 1 \div 0, 5^{0}$). Proba are o structură cu cristalinitate mai scăzută fapt ce poate fi explicat prin efectul temperaturii: această probă nu a fost supusă calcinării ci doar uscării la temperatură redusă (90 °C).

După calcinare, se obține proba HA-C care prezintă un spectru DRX asemănător (figura IV.3.b), ce conține picurile de difracție intense și ascuțite, caracteristice hidroxiapatitei, ceea ce indică faptul că materialul prezintă o înaltă cristalinitate și o puritate ridicată. Se observă o creștere a intensității și o îngustare a principalelor linii de difracție precum și o foarte slabă deplasare a întregului spectru către unghiuri de difracție puțin mai mari ($\Delta \theta = 0, 1 \div 0, 5^{0}$).

Deplasarea picurilor de difracție (pentru ambele probe) spre unghiuri 20 mai mari față de cele ale hidroxiapatitei standard indică o mică scădere a parametrilor de rețea cauzată de o abatere de la stoechiometrie ceea ce conduce la o micșorare a lungimii legăturilor chimice din rețeaua cristalină, deci la o scădere a distanței interatomice. Aceasta se poate observa și în tabelul IV.4 unde se compară parametrii de rețea pentru probele obținute în acest studiu și hidroxiapatitei standard. Prin scăderea distanței interatomice se poate spune că structura devine mai compactă, în special în cazul apatitei calcinate, în corelație cu imaginile microscopice SEM (figura IV.4) prezentate anterior (a se vedea paragraful IV.2.2).



Figura IV.3. Difractogramele DRX ale probelor de hidroxiapatită: a) HA-N și b) HA-C (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2013^a)

Așa cum se observă în tabelul IV.4, parametrii celulei elementare pentru sistemul hexagonal în cazul materialelor apatitice proprii, sunt comparabili cu cei pentru hidroxiapatita standard (JCPDS 09-0432).

Tabelul IV.4. Parametrii celulei elementare	pentru structura l	hidroxia	patitei ob	tinute
---	--------------------	----------	------------	--------

Parametrul (Å)	HA standard	HA-N (uscată la 90 °C)	HA-C (calcinată la 850 °C)
a = b	9,418	9,372	9,357
С	6,883	6,848	6,833

Calculul mărimii medii a cristalitelor apatitice s-a realizat prin utilizarea lărgimii $B_{1/2}$ corespunzătoare planului de difracție (002) ce determină picul de la unghiul 20 cu valoarea 26,02° (pentru proba HA-N) și 26,08° (pentru proba HA-C). S-a ales acest pic datorită faptului că el este bine conturat și nu interferă cu alte picuri. Din datele prezentate în tabelul IV.5 se observă că cele două probe apatitice sunt formate din cristale nanometrice, cu dimensiuni sub 60 nm.

Din datele prezentate în tabelul IV.5 se observă că gradul de cristalinitate variază, fiind foarte ridicat în cazul probei calcinate HA-C. Se poate concluziona că difractogramele de raze X ale probelor analizate indică faptul că înaintea tratamentului termic, proba necalcinată HA-N are o structură cristalin-amorfă și o structură înalt cristalină în cazul probei HA-C tratată termic la 850 °C.

Tabelul IV.5. Mărimea cristalelor (*D*) și gradul de cristalinitate (X_C) obținute din spectrele XRD pentru probele de hidroxiapatită analizate

Proba	B _{1/2} (radiani)	D (nm)	X _C (%)
HA-N	0,004186	34,022	73,53
НА-С	0,002442	58,327	97,78

Tratamentul termic la 850 °C determină dezvoltarea unei faze cristaline corespunzătoare hidroxiapatitei cristalizate în sistem hexagonal și de dimensiuni nanometrice, cu nanocristale de până la 60 nm.

IV.2.2. Microscopia electronică cu baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (SEM-EDX)

În scopul examinării și stabilirii corecte a morfologiei și dimensiunii cristalelor de hidroxiapatită obținute au fost studiate eșantioane din fiecare probă folosind un microscop electronic cu baleiaj de tip VEGA//TESCAN (SEM).

Conform literaturii de specialitate, morfologia și dimensiunea cristalelor de hidroxiapatită studiată cu ajutorul microscopului electronic cu baleiaj (SEM) este destul de variată, forma și dimensiunea cristalelor de hidroxiapatită depinzând de compoziția gelului utilizat în sinteză și de condițiile de sinteză. Astfel, s-au obținut diverse forme ale cristalelor apatitice: plăcuțe hexagonale, prisme hexagonale sau agregate sub formă de mănunchiuri sau sferulite (Nathanael și colab., 2010).

În figura IV.4 sunt prezentate imaginile SEM ale probelor de hidroxiapatită sintetizate în lucrarea de față, respectiv probele HA-N și HA-C. Cristalele de hidroxiapatită, au dimensiuni nanometrice (sub 70 nm), valori care concordă cu cele obținute în urma analizei DRX. Așa cum se observă în figura IV.4a, pulberea de hidroxiapatită necalcinată are un aspect pulverulent, pufos și conține cristalite cu formă aciculară, cu dimensiuni diferite. În schimb, pulberea de hidroxiapatită calcinată este constituită din aglomerări de particule cristaline de formă sferică cu un diametru mediu variind între 60 și 90 nm

(figura IV.4.b). Totodată, se observă efectul temperaturii de calcinare asupra morfologiei particulelor. Temperatura ridicată induce tendința cristalitelor de a-și schimba forma aciculară și pufoasă într-una sferică compactizată, fapt ce determină atingerea unui grad mai mare de împachetare a particulelor pulverulente.

Compoziția chimică elementală a probelor sintetizate a fost determinată prin metoda SEM-EDX cu ajutorul unui microscop electronic QUANTA 200 3D Dual Beam with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM + EDX). În figura IV.5 se prezintă spectrele SEM-EDX ale probelor analizate (HA-N şi HA-C). Conform spectrelor EDX apar și urme de C datorate puținelor grupări carbonat ce au substituit o mică parte din grupările fosfat sau hidroxil din structura cristalină a hidroxiapatitei. Aceasta presupune faptul că probele sunt hidroxiapatită carbonatată (cu un grad de carbonatare extrem de scăzut), rezultatele conjugându-se cu datele de spectroscopie FTIR prezentate în paragraful IV.2.4.



Figura IV.4. Imagini SEM ale probelor de hidroxiapatită: a) HA-N și b) HA-C (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2013^a)

Rapoartele molare Ca/P au valorile 1,682 pentru hidroxiapatita necalcinată (proba HA-N) și 1,665 pentru hidroxiapatita calcinată (proba HA-C), valori apropiate de valoarea raportului molar Ca/P = 1,667 caracteristic hidroxiapatitei, conform literaturii de specialitate (Raynaud și colab., 2001).



Figura IV.5. Spectrele de raze X de dispersie SEM-EDX ale probelor de hidroxiapatită: a) HA-N și b) HA-C.

Analiza SEM-EDX confirmă prezența în principal a elementelor Ca, P, și O în cristalele apatitice. Compoziția elementală a probelor de hidroxiapatită obținute se prezintă în tabelul IV.6.

Proba	Ca	Р	0	С	Ca/P
	(%)	(%)	(%)	(%)	
HA-N	40,32	18,58	39,08	2,02	1,682
НА-С	39,12	18,21	41,32	1,35	1,665

IV.2.3. Determinarea suprafeței specifice BET

Stabilirea parametrilor texturali (suprafața specifică, volumul porilor sau porozitatea, forma și mărimea porilor) reprezintă un aspect important în caracterizarea biomaterialelor. Metoda folosită în scopul determinării acestor mărimi se bazează pe fizisorbția N_2 gazos la 77 K (- 196 °C), cu obținerea unei izoterme de adsorbție - desorbție. Ea redă dependența dintre cantitatea de gaz (exprimată în volum adsorbit) funcție de presiunea parțială a azotului, la temperatură constantă. Aria suprafeței specifice a fost obținută prin metoda Brunauer - Emmett - Teller (BET), în timp ce volumul și distribuția

dimensiunii porilor au fost determinate cu metoda Barrett - Joyner - Halenda (BJH). Înainte de fiecare determinare, probele sub formă de pulbere au fost supuse unui tratament termic la 120 °C pentru câteva ore pentru a elimina urmele de lichide și impurități. Izotermele de adsorbție/desorbție a azotului la 77 K (- 196 °C) și distribuția porilor corespunzătoare pulberilor de hidroxiapatită sub formă necalcinată și calcinată obținute în acest studiu sunt prezentate în figura IV.6.



Figura IV.6. Izotermele de adsorbție/desorbție ale azotului la 77 K și distribuția porilor pentru probele de hidroxiapatită: a) HA-N și b) HA-C

Forma izotermelor ne oferă o primă informație privind tipul de porozitate a materialului. Astfel, izotermele de adsorbție pentru probele HA-N și HA-C se prezintă sub forma unei curbe histerezis de tipul IV (în clasificarea IUPAC) prezentă la presiune p/p_o înaltă, caracteristică materialelor mezostructurate. Izotermele indică faptul că ambele probe sunt materiale poroase, ce conțin atât micropori (volumul adsorbit la presiuni relativ mici) cât și mezopori (bucla histerezis de la presiuni parțiale medii și ridicate). De asemenea, distribuția Barrett-Joyner-Halenda (BJH) a porilor indică o textură micro-(diametrul porilor < 2 nm) și mezoporoasă (2 - 10 nm) pentru ambele probe.

Tabelul IV.7 rezumă rezultatele adsorbției N₂ și distribuția porilor caracteristice pentru probele HA-N și HA-C. Diametrul mediu al porilor obținut pentru probele HA-N și HA-C este de 1,159 și respectiv 1,060 nm. Volumul adsorbției este relativ apropiat pentru presiuni scăzute ($p/p_o < 0,1$), în timp ce o creștere mai pronunțată a fost observată pentru HA-N la presiuni relativ mai mari în comparație cu proba HA-C. Acest lucru indică o suprafață specifică mai mare pentru HA-N comparativ cu HA-C, cu valori de 325 m²/g, și respectiv 69 m²/g.

Proba	Suprafața specifică (m ² /g)	Volumul total al porilor (cm ³ /g)	Diametrul porilor (nm)
HA-N	325	0,357	1,159
HA-C	69	0,065	1,060

Tabelul IV.7. Date obținute din măsurători de adsorbție - desorbție a N2 pentru probele de hidroxiapatită

Temperatura de calcinare influențează puternic suprafața specifică, în sensul că aceasta scade odată cu creșterea temperaturii. Se observă o scădere semnificativă a suprafeței specifice datorită coalescenței/fuzionării și densificării particulelor apatitice în urma procesului de calcinare, ducând și la o scădere a porozității. Pulberea de hidroxiapatită a fost calcinată pentru a îndepărta o serie de impurități volatile (cum ar fi amoniacul) și a fazei amorfe, mărindu-se astfel gradul de cristalinitate a materialului obținut.

IV.2.4. Spectroscopia IR

Caracterizarea fizico-chimică a pulberilor de hidroxiapatită s-a realizat și prin spectroscopie IR folosind un spectrofotometru SPECTRUM BX II / PerkinElmer cu Transformată Fourier (FTIR). Parametrii de lucru au fost: rezoluția de scanare de 0,8 cm⁻¹, viteza de scanare de 0,1 - 1,5 cm/s și regiunea de frecvențe cuprinsă între 400 – 4.000 cm⁻¹. Spectroscopia FTIR s-a utilizat pentru a determina picurile caracteristice hidroxiapatitei și interacțiunile ce au loc în structura acesteia. Studiul spectrelor FTIR ale probelor analizate oferă informații privind grupările existente în structura hidroxiapatitei, respectiv grupările fosfat (PO_4^{3-}), hidroxil (OH⁻) și eventual carbonat CO_3^{2-} .

În figura IV.7 sunt prezentate spectrele FTIR ale probelor de hidroxiapatită înainte și după tratamentul termic la 850 °C, respectiv pentru probele HA-N și HA-C. Benzile caracteristice grupărilor fosfat (PO_4^{3-}) pot fi identificate în spectrele ambelor probe HA-N și HA-C, ele fiind poziționate la 492, 566, 604, 982, 1040 și 1105 cm⁻¹ în concordanță cu datele din literatură (Fowler, 1974). Se observă faptul că în cazul probei HA-C supusă tratamentului termic (calcinare la 850 °C), intensitatea acestor picuri este mai mare, fapt ce denotă o creștere a gradului de cristalinitate a pulberii apatitice. Modificarea profilului acestor linii indică o schimbare a raportului dintre fazele cristaline și amorfe și o mică abatere locală de la stoechiometrie prin substituirea unor grupări fosfat cu grupări carbonat, rezultate suținute și de studiile de difracție DRX și SEM-EDX. La 878 - 891 cm⁻¹ și 1400 - 1500 cm⁻¹ se observă benzi de intensitate scăzută, specifice vibrațiilor legăturii C–O

din grupările carbonat $(CO_3^{2^-})$, grupări care apar datorită faptului că fosfații în general rețin CO₂ din aerul atmosferic (Komath & Varma, 2003). Existența benzilor specifice grupărilor carbonat $(CO_3^{2^-})$ sugerează că probele obținute sunt hidroxiapatită carbonatată, în care o foarte mică parte din grupările fosfat $(PO_4^{3^-})$ sau hidroxil (OH), din structura apatitei au fost substituite cu grupări carbonat $(CO_3^{2^-})$, cu observația că gradul de carbonatare este extrem de scăzut. Acest fapt este caracteristic atât apatitei de sinteză cât și apatitei biologice din oase, după cum prezintă literatura de specialitate (Elliott și colab., 1985). Grupările hidroxil (OH) din structura hidroxiapatitei au fost identificate în cazul ambelor probe prin picurile situate la 3575 cm⁻¹ și 638 cm⁻¹, intensitatea lor crescând la proba HA-C în urma calcinării și concomitent cu creșterea gradului de cristalinitate.

Grupările OH libere de pe suprafața particulelor pentru ambele probe de hidroxiapatită studiate apar în zona 3400 - 3500 cm⁻¹, iar benzile specifice punților de hidrogen din gruparea OH...O sunt vizibile la 3486 cm⁻¹ pentru proba HA-N și 3495 cm⁻¹ pentru proba HA-C. Banda de adsorbție cu maximul de intensitate la 3450 cm⁻¹ este atribuită prezenței apei de cristalizare din structura hidroxiapatitei. Vibrațiile asociate legăturii de hidrogen din apa adsorbită fizic la suprafață sunt evidențiate la 1656 cm⁻¹. Se observă faptul că aceste benzi se diminuează drastic la proba HA-C în urma calcinării. Banda de intensitate scăzută situată la 1386 cm⁻¹ în cazul probei de HA-N netratată termic se atribuie grupărilor azotat (NO_3^-) reziduale provenite din precursorii de sinteză. Prezența acestor impurități este mai accentuată în proba HA-N comparativ cu proba de HA-C tratată la 850 °C. Astfel, rezultă că aplicarea tratamentului termic duce la diminuarea impurităților din probă și creșterea cristalinității.



Figura IV.7. Spectrele FTIR pentru probele de hidroxiapatită: a) HA-N și b) HA-C

Concluzionând, se poate afirma că cele două probe studiate sunt hidroxiapatită, cu un foarte scăzut grad de carbonatare, asemănătoare cu apatita din țesutul dur uman. Aplicarea tratamentului termic duce la îndepărtarea impurităților și a urmelor de solvenți din material și creșterea cristalinității.

IV.2.5. Determinarea punctul de sarcină electrică zero

Hidroxiapatita, pe lângă proprietățile specifice caracteristice biomaterialelor, prezintă și proprietăți adsorbante. Acestea sunt influențate printre altele și de pH-ul mediului în care este imersată. În vederea stabilirii influenței pH-ului asupra comportamentului materialului apatitic adsorbant în medii electrolitice este necesară determinarea <u>punctului de sarcină</u> <u>electrică zero (nulă)</u> al acestuia. Punctul sarcină electrică zero reprezintă valoarea pH-ului la care suprafața unui material adsorbant scufundat într-un lichid se află în echilibru și prezintă o sarcină electrică netă nulă. El este notat cu pH_{pzc}. *Punctul izoelectric* (isoelectric point - IP), ca și punctul de sarcină electrică zero, reprezintă pH-ul la care suprafață are o încărcare electrică nulă, în schimb ionii care determină potențialul interfețelor sunt alții decât ionii H⁺ și OH⁻.

Când un solid adsorbant este imersat într-o soluție electrolitică, suprafața sa se încarcă electric în urma unor procese de disociere a grupărilor hidroxil superficiale și complexare a unor ioni din mediul electrolitic, respectiv procese de protonare – deprotonare.

Datele din literatură indică faptul că pe suprafața cristalelor de hidroxiapatită pot exista grupări încărcate pozitiv $(\equiv CaOH_2^+)$ în condiții de pH acid sau grupări încărcate negativ $(\equiv OPO_3H^-)$ în condiții de pH bazic (Bengtsson &

Sjöberg, 2009). Aceasta presupune faptul că suprafața solidă a hidroxiapatitei, care se caracterizează printr-un anumit pH_{pzc} , manifestă proprietăți amfotere în funcție de pH-ul mediului în care se află:

- când pH $< pH_{pzc}$ procesul de suprafață predominant este protonarea:

$$HA \equiv CaOH + H^{+} \rightarrow HA \equiv CaOH_{2}^{+}$$
(IV.7)

- când pH> pH_{pzc} procesul de suprafață predominant este deprotonarea:

$$HA \equiv OPO_{3}H_{2} \rightarrow HA \equiv OPO_{3}H^{-} + H^{+}$$
(IV.8)

unde "≡" simbolizează suprafața hidroxiapatitei.

Prin urmare, în medii acide suprafața solidă a hidroxiapatitei se încarcă pozitiv, iar în medii bazice se încarcă negativ. Acest comportament al hidroxiapatitei o face un bun candidat ca adsorbant în procesele de separare prin adsorbție a unor specii încărcate electric.

Punctul de sarcină electrică zero al unui material adsorbant poate fi evaluat apelând la o serie de metode specifice cum sunt: metoda titrării potențiometrice, metoda aducerii la echilibru (pH drift method or drift equilibrium) (Alkan și colab., 1997; Alkan & Doğan, 1998; Jia și colab., 2002). În studiul de față s-a utilizat *metoda aducerii la echilibru* care se bazează pe ideea că protonii H⁺ și ionii hidroxil OH⁻ sunt ionii care determină potențialul suprafeței adsorbantului. Metoda permite determinarea punctului de sarcină electrică zero al probelor de hidroxiapatită obținute în acest studiu prin parcurgerea următoarelor etape:

1) prepararea unei soluții inițiale de electrolit tare NaCl 0,01 M;

2) ajustarea pH-ului soluției de electrolit cu HCl 0,5 M sau NaOH 0,5 M în intervalul de valori pH = 2 - 10; se notează acest pH inițial cu **pH**_i;

3) materialul solid adsorbant se amestecă cu soluția electrolitului tare (NaCl) cu pH-ul și concentrația cunoscută (pentru asigurarea unei tării ionice constante), într-un raport solid/lichid bine determinat și constant. În studiul de față s-au luat 0,5 g de probă de probă apatitică (HA-N și HA-C) care se pune în contact cu 50 ml soluție de electrolit;

4) suspensia se agită câteva minute după care se lăsă în repaus până la atingerea echilibrului (24 de ore) moment în care se măsoară pH-ul final care se notează \mathbf{pH}_{f} ;

5) Se reprezintă grafic $pH_i = f(pH_i)$ sau $pH_i = f(\Delta pH)$ unde $\Delta pH = pH_f - pH_i$. Din interceptul dreptei cu abscisa se determină punctul de sarcină electrică zero al probelor de hidroxiapatită, așa cum se prezintă în figura IV.9.

Punctul de sarcină electrică zero (pHpzc) determinat pentru probele HA-N și HA-C are valoarea 7,5 și respectiv 7,9. Datele obținute indică faptul că suprafețele materialelor apatitice obținute (probele HA-N și HA-C) se încarcă pozitiv la pH < pHpzc=7,5 sau 7,9 și negativ pH > pHpzc=7,5 sau 7,9. Acest lucru ar putea fi o proprietate favorabilă pentru adsorbția colorantului Reactive blue 204 la pH < 6, după cum se prezintă în capitolul VI.



Figura IV.9. Determinarea punctului de sarcină electrică zero (pH_{pzc}) pentru probele de hidroxiapatită: a) HA-N și b) HA-C

Capitolul V. BIOCOMPOZITE PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ

Ținând cont de stadiul actual al cercetărilor științifice realizate în sfera biomaterialelor pentru substituția osoasă și de cerințele din acest domeniu, prezentul studiu a abordat o strategie de cercetare care a avut drept **scop obținerea de noi biocompozite pe bază de hidroxiapatită cu potențiale aplicații în medicina regenerativă osoasă drept substituenți osoși.** Studiile efectuate au vizat o serie de **obiective** precum:

> obținerea prin metode biomimetice a unor noi **biocompozite poroase** în care drept component anorganic este hidroxiapatita depusă ca strat osteoconductiv pe suporturi poroase poliuretanice de tip scaffold. Înglobarea unor principii active precum vitamina A, vitamina D₂, vitamina B₆ și nanoparticule de argint în stratul apatitic în scopul îmbunătățirii sau inducerii unor proprietăți specifice biomaterialelor compozite.

➢ realizarea unor biocompozite pulverulente pe bază de hidroxiapatită şi principii active, precum sulfatul de gentamicină, cu rol de medicament şi L-lisina, cu rol important în integrarea implantului în organismul gazdă.

vevaluarea proprietăților fizico-chimice ale biomaterialelor obținute prin efectuarea de analize specifice: microscopie electronică cu baleaj cuplată cu spectroscopie de reflexie prin dispersie de energie (SEM-EDX), spectroscopie IR etc.

➢ evaluarea proprietăților specifice ale biomaterialelor obținute: teste de biocompatibilitate, biodegradare, antimicrobiene, citotoxicitate etc.

V.1. Biocompozite poroase pe bază de hidroxiapatită și poliuretan

În cadrul prezentului studiu s-a urmărit *obținerea de biomateriale compozite poroase pe bază de hidroxiapatită și poliuretan,* respectiv realizarea de *depuneri/straturi subțiri biocompatibile de hidroxiapatită cristalină pe suporturi poroase (de tip "scaffold") de natură poliuretanică și includerea în aceste depuneri a unor principii active (vitamina A, vitamina D₂, vitamina B₆, nanoparticule de argint) cu potențiale aplicații în medicina regenerativă osoasă ca substituenți osoși (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^b; <u>Ilisei</u> și colab., 2012^b; <u>Ilisei</u> și colab., 2012^c).*

S-au avut în vedere următoarele aspecte:

utilizarea metodei biomimetice de depunere a hidroxiapatitei folosind soluții similare cu compoziția plasmei sanguine;

 \checkmark investigarea studiului influenței vitaminelor A și D₂, respectiv a vitaminei B₆ asupra procesului de depunere a hidroxiapatitei pe suportul polimeric;

✓ îmbunătățirea următoarelor aspecte: asigurarea uniformității stratului de hidroxiapatită depus pe matricea poroasă polimerică și micșorarea timpului de depunere;

✓ caracterizarea structural - morfologică a materialelor obținute apelând la metode și tehnici de analiză avansate și performante;

✓ evaluarea proprietăților specifice ale biomaterialelor obținute: teste de biocompatibilitate, biodegradare, antimicrobiene, citotoxicitate etc.; observarea gradului de atașare și proliferare celulară la suprafața biocompozitelor studiate.

V.1.1. Depuneri de hidroxiapatită pe suporturi poroase poliuretanice prin procedee biomimetice

În studiul de față s-a folosit *metoda biomimetică* în scopul depunerii de straturi subțiri de hidroxiapatită cristalină pe suporturi poroase poliuretanice (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2012^a; Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2012^b). Metoda se bazează pe un proces de precipitare - cristalizare a hidroxiapatitei pe suportul solid poliuretanic în mediu biomimetic. Aceasta implică imersarea matricilor poroase de poliuretan într-o soluție biomimetică ce imită fluidul uman corporal, la temperatură și pH fiziologice.

V.1.1.1. Protocol de obținere

În scopul depunerii de straturi subțiri de hidroxiapatită cristalină pe suporturi poroase poliuretanice s-au folosit două tipuri de soluții biomimetice apoase ce conțin concentrații mari de ioni de calciu și fosfat și anume: *fluidul biologic simulat* (Simulated Body Fluid - SBF) și soluția calcică suprasaturată (Supersaturated Calcification Solution - SCS).

a) Soluția biomimetică SBF

Soluția SBF a fost pregătită prin dizolvarea succesivă a următoarelor materii prime: NaCl, NaHCO₃, KCl, Na₂HPO₄, MgCl₂ · $6H_2O$, CaCl₂ · $2H_2O$ și Na₂SO₄ în apă demineralizată. Soluția SBF a fost menținută la pH =7,4 folosind trihidroximetilaminometan [(CH₂OH)₃CNH₂] și soluție 0,1 M HCl. Concentrațiile ionice din soluția SBF, comparativ cu plasma sanguină umană sunt prezentate în tabelul V.1.

Ion	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Cl⁻	$({\rm HPO}_{4})^{2-}$	$(SO_4)^{2-}$	(HCO ₃) ⁻
SBF	142,0	2,5	1,5	5,0	147,8	1,0	0,5	4,2
plasma sanguină	142,0	2,5	1,5	5,0	103,0	1,0	0,5	27,0

Tabelul V.1. Concentrațiile ionice [Mmol/L] din soluția SBF și plasma sanguină

b) Soluția calcică suprasaturată SCS

Soluția SCS a fost pregătită prin dizolvarea succesivă a următoarelor materii prime: $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, Na_2HPO_4 și $NaHCO_3$ în apă deionizată. Concentrațiile ionice din soluția SCS, comparativ cu plasma sanguină umană sunt prezentate în tabelul V.2.

Tabelul V.2	. Concentrațiile ionic	e [Mmol/L] dir	n soluția SCS s	și plasma sanguină
-------------	------------------------	----------------	-----------------	--------------------

Ion	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Cl	$({\rm HPO}_4)^{2-}$	$(SO_4)^{2-}$	(HCO ₃) ⁻
SCS	4,0	5,0	-	-	10,0	2,5	-	1,5
plasma sanguină	142,0	2,5	1,5	5,0	103,0	1,0	0,5	27,0

c) Suportul de depunere - matricea poliuretanică

Matricile poroase din poliuretan utilizate în acest studiu s-au realizat prin metoda inversiei de fază inițiată de precipitare în non-solvent. Ca fază polimerică s-a utilizat poliuretanul, ca solvenți acetona și N,N-dimetilformamida (DMF), iar ca non-solvent apa deionizată. Matricile poroase poliuretanice au fost obținute prin turnarea în cutii Petri a unei soluții de poliuretan (PU) de concentrație bine stabilită, după care solvenții au fost lăsați să se evapore încet la temperatura camerei timp de 1 de oră. Apoi, întregul sistem s-a imersat în apă deionizată, la 45 °C, până când filmul polimeric se separă total de vasul Petri. Filmele obținute au fost preluate din plăcile de turnare și uscate la 80 °C, timp de 24 de ore pentru a îndepărta solvenții reziduali. Grosimea filmelor poroase a fost de aproximativ $100 - 300 \mu$ m.

d) Depunerea de hidroxiapatită pe suporturi poliuretanice în SBF și SCS

Depunerile de hidroxiapatită pe suprafața matricei poroase de poliuretan s-au realizat prin folosirea, în paralel pentru comparație, a două soluții biomimetice ce imită lichidul fiziologic din organismul uman: soluția SBF și soluția SCS. Pentru a simula procesul *in vivo*, probele poroase din poliuretan au fost scufundate în soluțiile SBF sau SCS la 37 °C și pH = 7,4. După 1 - 6 zile de imersie, probele au fost scoase din aceste soluții, clătite cu apă deionizată, urmată de uscare la 40 °C timp de 1 h.

În tabelul V.3. sunt prezentate notațiile probelor care au fost supuse tratamentului biomimetic în soluțiile SBF și respectiv SCS. În scopul selectării probelor pentru analizele structurale și morfologice ulterioare s-a recurs la o investigație preliminară de vizualizare a acestora la un microscop optic (USB Microscope Traveler with 1.3 Megapixel Camera) în scopul observării gradul de acoperire cu cristale apatitice a suprafeței suporturilor poroase poliuretanice.

Proba	Timp depunere	рН	Observații
		De	punerea de hidroxiapatită în soluție SCS
SCS-1	1 zi	7,42	cristale apatitice aciculare dispuse în număr redus la suprafața scaffold-ului;
			acoperire neuniformă de cristale apatitice cu forme lamelare la suprafața
			suportului poros
SCS-3	3 zile	7,60	acoperire neuniformă de cristale apatice atât la suprafață cât și în interiorul
			porilor suportului
SCS-6	6 zile	7,86	acoperire uniformă de cristale apatice atât la suprafață cât și în interiorul
			porilor suportului
		De	punerea de hidroxiapatită în soluție SBF
SBF-1	1 zi	7,40	cristale de formă plată rare
SBF-3	3 zile	7,48	zone neuniform acoperite cu cristale apatitice de formă lamelară
SBF-6	6 zile	7,60	cristale apatitice cu forme variate (lamelare, aciculare, plate) dispuse
			neuniform pe suprafața suportului
SBF-12	12 zile	7,60	acoperire uniformă de cristale apatice atât la suprafață cât și în interiorul
			porilor suportului

Tabelul V.3. De	puneri bio	mimetice d	e hidroxia	patită p	pe suporturi	poroase
-----------------	------------	------------	------------	----------	--------------	---------

Formarea și depunerea stratului de hidroxiapatită pe suprafața matricilor poroase poliuretanice imersate în soluțiile biomimetice SBF sau SCS presupune producerea unor reacții chimice în mediul biomimetic, cea mai importantă fiind:

$$HPO_4^{2-} \longrightarrow PO_4^{3-} + H^+ \tag{V.1}$$

Atunci când în soluția biomimetică se ating concentrații mari de ioni fosfat, are loc un proces rapid de recombinare a ionilor fosfat cu ionii de hidrogen (inversa reacției V.1). Pentru a împiedica această reacție trebuie ca în soluție, concentrația ionilor de calciu să fie mai mare în comparație cu concentrația ionilor de hidrogen. În felul acesta se permite precipitarea hidroxiapatitei în soluție, conform reacției de mai jos:

$$10Ca^{2+} + 6PO_4^{3-} + 2OH^{-} \xrightarrow{la \ 37^{0}C} Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$$
(V.2)

V.1.1.2. Caracterizarea morfologică a biocompozitelor

Pentru a observa morfologia a probelor obținute s-a utilizat microscopia electronică cu baleiaj (SEM). Figura V.1 prezintă imagini SEM ale matricei poliuretanice înainte de tratamentul biomimetic.



Figura V.1. Imagini SEM ale matricei poliuretanice înainte de aplicarea tratamentului biomimetic: a) suprafața superioară; b) în secțiune transversală înainte de aplicarea tratamentului biomimetic (Ciobanu, <u>*Ilisei*</u> și colab., 2012^a; Ciobanu, <u>*Ilisei*</u> și colab., 2012^b)

Matricile poliuretanice utilizate în acest studiu prezintă o structură asimetrică și poroasă, cu o porozitate de aproximativ 60 %. Suportul poliuretanic prezintă macropori cu valori cuprinse între 20 - 85 µm cât și o multitudine de micropori a căror dimensiuni sunt cuprinse între 1 - 5 µm. Majoritatea microporilor și macroporilor par a fi interconectați. Datorită porozității și interconectivității ridicate, matricele poliuretanice obținute pot fi considerate ca fiind candidați ideali

pentru realizarea de compozite pentru ingineria țesutului osos cu rol de "schelete" 3D (scaffold) pentru atașarea și proliferarea celulară.

a) Tratamentul biomimetic în soluția de tip SBF

Prin imersarea probelor poroase poliuretanice în soluția biomimetică SBF are loc formarea și depunerea stratului de hidroxiapatită pe suprafața solidă polimerică.





Așa cum s-a prezentat în tabelul V.3, evoluția procesului de depunere are loc în timp, acoperiri uniforme obținându-se abia după 12 zile de imersie. Astfel, după imersarea în SBF timp de 6 zile la $37 \,^{\circ}$ C și pH = 7,4 proba SBF-6 prezintă cristale lamelare de hidroxiapatită depuse, dar și multe zone neacoperite. Cristalele apatitice se observă în figura V.3.a sub forma unor spoturi albe.

Depuneri complete și uniforme de apatită au loc după mai multe zile, respectiv după 12 zile, cum este cazul probei SBF-12 (Figura V.3.c). După cum se observă în figura V.3 c, stratul de hidroxiapatită depus pe suportul poliuretanic acoperă complet suprafața solidă și este compus din cristale apatitice în formă lamelară și de dimensiuni micronice ($< 10 \mu m$).

b) Tratamentul biomimetic în soluția de tip SCS

Prin imersarea probelor poroase poliuretanice în soluția biomimetică SCS la 37 °C și pH = 7,4 are loc formarea și depunerea stratului de hidroxiapatită pe suprafața solidă polimerică. Procesul de nucleație și de creștere a cristalelor de hidroxiapatită a fost urmărit, după perioade diferite de imersie, cu ajutorul microscopiei electronice cu baleiaj (SEM). Așa cum s-a prezentat în tabelul V.3, evoluția procesului de depunere are loc în timp. În primele 24 ore după imersie în soluția SCS apar pe suprafața poliuretanică puține nuclee de hidroxiapatită. Dar, odată formate aceste nuclee, creșterea stratului apatitic este destul de rapidă. După 3 zile de imersie, proba SCS-3 prezintă cristale lamelare de hidroxiapatită și de dimensiuni micronice (< 10 μ m), dar și multe zone neacoperite (Figura V.5). S-a constatat că, după 6 zile de incubare în soluție SCS, suprafața polimerică a fost acoperită complet cu un strat cristalin, cum este cazul probei SCS-6 (Figura V.6). Acest strat de grosime micronică, este format din cristale de hidroxiapatită de dimensiuni de ordinul 1 – 5 μ m și cu o morfologie specifică tip "petale de trandafir".

Comparând procedeele biomimetice de depunere a hidroxiapatitei pe suprafața poliuretanică ce folosesc cele două tipuri de soluții biomimetice SBF și SCS se poate concluziona că în ambele cazuri se obține un strat apatitic, doar că în cazul tratamentului în soluție SCS durata procesului de depunere scade la jumătate, iar stratul apatitic este mai omogen. Prin urmare tratamentul biomimetic în soluție SCS este mai eficient.



Figura V.5. Imagini SEM a probei: SCS-3 după 3 zile de imersie în soluția SCS suprafața exterioară (a); secțiune transversală (b) și a probei SCS-6 după aplicarea tratamentului biomimetic în soluție SCS timp de 6 zile (c) suprafața matricei poliuretanice (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^a)

V.1.2. Depuneri de hidroxiapatită și vitamine pe suporturi poroase poliuretanice prin procedee biomimetice

Includerea principiilor active, respectiv vitaminele A, D_2 și B_6 , în stratul apatitic depus pe suportul poros poliuretanic are ca scop îmbunătățirea proprietăților osteoconductive și osteoinductive ale biocompozitelor finale. În momentul implantării, aceste biocompozite pot elibera molecule de vitamină care, împreună cu principiile active existente în fluidul corporal și în țesutul viu adiacent, contribuie la integrarea implantului în organism și la dezvoltarea de țesut osos nou.

În scopul obținerii de biocompozite poroase de tip hidroxiapatită - poliuretan și vitamine cu potențiale aplicații în medicina regenerativă osoasă ca substituenți osoși (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^a; Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^b; <u>Ilisei</u> și colab., 2012^c), s-a recurs la o strategie experimentală asemănătoare cu cea descrisă în subcapitolul V.1.1. Diferența a constat în faptul că s-au utilizat soluții biomimetice modificate: soluția SBF modificată (M-SBF), soluția SCS modificată (M-SCS) și soluția modificată B_6 -SCS.

V.1.2.1. Protocol de obținere

a) Soluțiile biomimetice modificate M-SBF, M-SCS și B₆ - SCS

Aceste soluții biomimetice modificate provin din soluțiile SBF sau SCS (prezentate în subcapitolul V.1.1.1) la care sau adăugat anumite cantități de principiu activ, respectiv *vitamina A* ($C_{20}H_{30}O$, retinol - notat cu A), *vitamina D*₂ ($C_{28}H_{44}O$, ergocalciferol - notat cu D) și *vitamina B*₆ ($C_{8}H_{11}NO_{3}$, piridoxină - notată cu B):

- soluția SBF modificată, M-SBF, s-a obținut prin adăugarea la soluția inițială SBF a anumitor cantități de vitamina A și vitamina D_2 astfel încât raportul masic A/D să fie cuprins în intervalul 4 – 5 (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^b).

- soluția SCS modificată, M-SCS, s-a obținut prin adăugarea la soluția inițială de SCS a anumitor cantități de vitamina A și vitamina D₂ astfel încât raportul masic A/D să fie cuprins în intervalul 4 – 5 (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^a). Întrucât vitaminele A și D₂ sunt liposolubile acestea au fost dispersate și stabilizate în soluțiile apoase biomimetice SBF și SCS cu ajutorul unui agent organizator (surfactant/ emulsifiant) bromura de cetiltrimetilamoniu (CTAB). Inițial vitaminele sunt dispersate în etanol cu bromură de cetiltrimetilamoniu (CTAB, ca emulsifiant) pentru a forma o soluție coloidală. Din această soluție coloidală sunt extrase anumite cantități și introduse sub agitare puternică, în soluțiile biomimetice SBF și SCS obținându-se soluțiile biomimetice modificate M-SBF și M-SCS.

- soluția SCS modificată, B_6 -SCS, s-a obținut prin adăugarea la soluția inițială de SCS a anumitor cantități de vitamina B, respectiv 10 – 50 mg vitamină B_6 la 1 L soluție SCS (*Ilisei* și colab., 2012^c).

b) Depunerea de hidroxiapatită în soluții SBF și SCS modificate

Prin adăugarea unor cantități adecvate de vitamina A (A), vitamina D_2 (D), și respectiv vitamina B_6 (B) la versiunea originală a soluțiilor SBF, respectiv SCS s-a intenționat modificarea structurii fizice a produsului final și îmbunătățirea proprietăților osteoinductive și biochimice ale straturilor de acoperire. Pentru a simula procesul *in vivo*, probele poroase poliuretanice au fost imersate în soluțiile SBF sau SCS modificate, la 37 °C și pH = 6,9 - 7,9. După 1 - 6 zile de imersie, probele au fost scoase din aceste soluții, clătite cu apă deionizată, urmată de uscare la 37 - 40 °C, timp de 1 h. În tabelul V.4. sunt prezentate notațiile materialelor care au fost supuse tratamentului biomimetic în soluțiile modificate SBF și respectiv SCS. În scopul selectării probelor pentru analizele structurale și morfologice ulterioare s-a recurs la o investigație preliminară prin vizualizarea acestora la un microscop optic (USB Microscope Traveler with 1.3 Megapixel Camera) în scopul observării gradul de acoperire cu cristale apatitice a suprafeței suporturilor poroase. În urma vizualizării macroscopice, s-au selectat pentru caracterizările ulterioare probele **M-SBF-6, B₆ -SCS-5** și respectiv **M-SCS-3**.

 Tabelul V.4. Biocompozite poroase de tip hidroxiapatită - poliuretan și principii biologic active (vitamine) obținute prin procedee biomimetice

Proba	Timp depunere	pН	Observații			
	Depunerea de hidroxiapatită în M-SCS					
M-SCS-1	1 zi	7,20	zone parțial acoperite cu cristale apatitice de formă lamelară.			
M-SCS-3	3 zile	7,40	atât la suprafață cât și în secțiunea transversală sunt prezente mănunchiuri			
			de cristale apatitice cu forma unor "petale de trandafir"			
M-SCS-6	6 zile	7,60	suportul poros este acoperit în totalitate cu cristale apatitice			
		D	epunerea de hidroxiapatită în B ₆ -SCS			
B ₆ -SCS-1	1 zi	6,90	depuneri neuniforme de cristale apatitice; zone parțial acoperite			
B ₆ -SCS-3	3 zile	6,94	depuneri neuniforme de cristale apatitice; zone parțial acoperite			
B ₆ -SCS-5	5 zile	7,48	strat subțire și uniform de cristale apatitice depuse pe suprafața suportului			
			sub forma unor "petale de trandafir"			
		D	epunerea de hidroxiapatită în M-SBF			
M-SBF-1	1 zi	7,22	zone parțial acoperite de cristale cu formă aciculară			
M-SBF-3	3 zile	7,43	strat parțial uniform de cristale apatitice			
M-SBF-6	6 zile	7,88	strat uniform depus la suprafața suportului poros format din aglomerații de			
			cristale apatitice			

V.1.2.2. Caracterizarea structural - morfologică a biocompozitelor

V.1.2.2.1. Microscopia electronică cu baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (SEM-EDX)

Pentru a observa morfologia și compoziția chimică a probelor a fost utilizată microscopia electronică cu baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (SEM-EDX).

a) <u>Tratamentul biomimetic în soluția modificată de tip M-SBF</u>

În cazul matricelor poroase poliuretanice imersate în soluția M-SBF s-a observat că formarea cristalelor apatitice se produce într-un timp mai scurt, comparativ cu depunerea apatitică în soluție simplă SBF (vezi paragraful V.1.2.1). Astfel, în cazul probei M-SBF-3 imersată timp de 3 zile în soluția M-SBF, pe suprafața solidă poliuretanică se constată existența cristalelor apatitice sub formă de plăcuțe subțiri de dimensiuni variabile (Figura V.8.a). Depunerea nu este completă, existând multe zone neacoperite. În cazul probei M-SBF-6, după 6 zile de imersie în soluția biomimetică M-SBF, pe suprafața suportului polimeric se observă un strat uniform de hidroxiapatită format din cristale sub formă de plăcuțe subțiri de dimensiuni micrometrice (< 5 μ m). Uniformitatea acestei acoperiri este evidențiată de figura V.8.b.

Comparând procedeele biomimetice de depunere a hidroxiapatitei pe suprafața poliuretanică, ce folosesc cele două tipuri de soluții biomimetice SBF și M-SBF se poate concluziona că în ambele cazuri se obține un strat apatitic, doar că în cazul tratamentului în soluție M-SBF durata procesului de depunere scade, iar stratul apatitic este mai omogen. Rezultatele obținute în soluția M-SBF comparativ cu cele din soluția biomimetică simplă SBF se datorează, probabil, prezenței vitaminelor în soluție. Se poate spune că introducerea vitaminelor A și D_2 în soluția biomimetică SBF induce o scădere a timpului de depunere și o micșorare în dimensiune a cristalelor de hidroxiapatită, însă nu influențează negativ formarea și depunerea de cristale apatitice în structura și la suprafața suportului poliuretanic. Vitaminele A și D_2 se regăsesc în stratul apatitic, fapt demonstrat prin analiza FTIR (paragraful V.1.2.2.2.).



Figura V.8. Imagini SEM ale suprafeței matricei poliuretanice după aplicarea tratamentului biomimetic în soluție M-SBF timp de:

a) 3 zile (proba M-SBF-3),
b) 6 zile (proba M-SBF-6)
(Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^b)

b) Tratamentul biomimetic în soluția biomimetică modificată de tip M - SCS

În cazul matricelor poroase poliuretanice imersate în soluția M-SCS s-a observat de asemenea că formarea cristalelor apatitice se produce într-un timp mai scurt, comparativ cu depunerea apatitică în soluție simplă SCS (vezi paragraful V.1.2.2.2.).

În figura V.9. sunt prezentate imagini SEM ale compozitului poliuretanic M-SCS-3, după imersia acestuia timp de 3 zile în soluția M-SCS. Compozitul poliuretanic M-SCS-3 prezintă atât la suprafață cât și în secțiunea transversală acoperiri uniforme de cristale lamelare de hidroxiapatită. Analizând forma cristalelor apatitice se poate spune ca acestea se aseamănă cu "petalele de trandafir" și au dimensiuni micronice (< 5 μ m). Rezultatele obținute în soluția M-SCS, comparativ cu cele din soluția biomimetică SCS, se datorează probabil prezenței vitaminelor A și D₂ din soluție.



Figura V.9. Imagini SEM ale compozitului M-SCS-3 după 3 zile de imersie în soluția M-SCS: a) suprafața exterioară; b) secțiune transversală (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2012^a)

Soluția M-SCS utilizată în acest studiu are un pH aproximativ de 7,4. La acest pH, vitaminele din soluția M-SCS au tendința de a forma agregate și de a precipita la suprafața suportului polimeric. După cum se observă în figura V.10. a vitaminele A și D_2 sunt adsorbite pe suprafața substratului poliuretanic, generând astfel funcționalizarea suprafeței polimerice. De asemenea, are loc nucleația și creșterea cristalelor de hidroxiapatită la suprafața scaffold-ului polimeric. Este posibil ca vitaminele sub formă microcoloidală să acționeze asemenea unor promotori de nucleație ai cristalelor de hidroxiapatită. În general, agenții de nucleație sporesc formarea de cristalite primare, însă în același timp pot genera cristale imperfecte cu modificări ale structurii cristaline.

Figura V.11 prezintă spectrul EDX al probei M-SCS-3 analizată anterior. Pe baza rezultatelor EDX s-a putut stabili că raportul molar Ca/P este de 1,67 ceea ce certifică existența cristalelor de hidroxiapatită pe suportul poliuretanic.



Figura V.11. Analiza SEM-EDX a probei M-SCS-3 supusă tratamentului biomimetic în soluția M-SCS timp de 3 zile (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2012^a)

Comparând procedeele biomimetice de depunere a hidroxiapatitei pe suprafața poliuretanică ce folosesc cele două tipuri de soluții biomimetice SCS și M-SCS se poate concluziona că în ambele cazuri se obține un strat apatitic, doar că în cazul tratamentului în soluție M-SCS durata procesului de depunere scade, iar stratul apatitic este mai omogen. Rezultatele obținute în soluția M-SCS comparativ cu cele din soluția biomimetică simplă SCS se datorează probabil prezenței vitaminelor în soluție. Se poate afirma că introducerea vitaminelor A și D_2 în soluția biomimetică SCS induce o scădere a timpului de depunere și o micșorare în dimensiune a cristalelor de hidroxiapatită, însă nu influențează negativ formarea și depunerea de cristale apatitice în structura și la suprafața suportului poliuretanic. Vitaminele A și D_2 se regăsesc în stratul apatitic, fapt demonstrat prin analiza FTIR (paragraful V.1.2.2.2.). De asemenea, comparând tratamentele biomimetice în M-SBF și M-SCS se poate aprecia că soluția M-SCS induce o depunere mai rapidă a stratului apatitic, comparativ cu soluția M-SBF, asemănător cu rezultatele obținute la depunerile în soluțiile biomimetice simple (fără vitamine) SBF și SCS.

c) <u>Tratamentul biomimetic în soluția biomimetică modificată de tip B₆ - SCS</u>

Prin imersarea probelor poroase poliuretanice în soluția biomimetică B_6 -SCS la 37 °C și pH = 7,48 are loc formarea și depunerea stratului de hidroxiapatită pe suprafața solidă polimerică. Procesul de nucleație și de creștere a cristalelor de hidroxiapatită a fost urmărit după perioade diferite de imersie cu ajutorul microscopiei electronice cu baleiaj (SEM). Așa cum s-a prezentat în tabelul V.3, evoluția procesului de depunere are loc în timp. În primele 24 ore după imersie în soluția B_6 -SCS apar pe suprafața poliuretanică puține nuclee de hidroxiapatită. Dar, odată formate aceste nuclee, creșterea stratului apatitic este destul de rapidă. După 3 zile de imersie, proba SCS-3 prezintă cristale lamelare de hidroxiapatită grupate în agregate de tip "floare" și de dimensiuni micronice (< 50 µm), dar și multe zone neacoperite (Figura V.12a).



Figura V.12 Imagini SEM de magnitudini diferite ale suprafeței exterioare: a) a probei B₆-SCS-5 după 3 zile de imersie în soluția B₆-SCS și b) a probei B₆-SCS-5 după 5 zile de imersie în soluția B₆-SCS (*<u>Ilisei</u>* și colab., 2012^c)

S-a constatat că, după 5 zile de incubare în soluție B_6 -SCS, suprafața polimerică a fost acoperită complet cu un strat cristalin, cum este cazul probei B_6 -SCS-5 (Figura V.12.b). Acest strat de grosime micronică, este format din cristale plate și subțiri de hidroxiapatită de dimensiuni de ordinul 10 – 50 µm, aglomerate sub formă de agregate cu o morfologie specifică de tip "floare". Se poate afirma că introducerea vitaminei B_6 în soluția biomimetică SCS induce creșterea în dimensiune a nanoparticulelor de hidroxiapatită, însă nu influențează negativ formarea și depunerea de cristale apatitice în structura și la suprafața suportului poliuretanic. Vitamina B_6 se regăsește în stratul apatitic, fapt demonstrat prin analiza FTIR.

V.1.2.2.2. Spectroscopie IR a biocompozitelor

Caracterizarea biocompozitelor poroase pe bază de hidroxiapatită și poliuretan s-a realizat și prin spectroscopie IR folosind un spectrofotometru SPECTRUM BX II / PerkinElmer cu transformață Fourier (FTIR). Parametrii de lucru au fost: rezoluția de scanare de 4 cm⁻¹, viteza de scanare de 0,1 - 1,5 cm/s și regiunea de frecvențe cuprinsă între 400 – 4.000 cm⁻¹. Spectroscopia FTIR s-a utilizat pentru a determina atât picurile caracteristice hidroxiapatitei depusă pe suportul poliuretanic, cât și pentru identificarea picurilor specifice vitaminelor care au fost utilizate în prezentul studiu.

Studiul spectrelor FTIR ale probelor analizate oferă informații privind grupările existente în structura hidroxiapatitei, respectiv grupările fosfat (PO_4^{3-}), hidroxil (OH⁻) și eventual carbonat CO_3^{2-} . În figura V.14. sunt prezentate spectrele FTIR ale suportului poliuretanic și ale biocompozitelor SCS-3 și M-SCS-3 după 3 zile de imersie în soluțiile biomimetice SCS și respectiv M-SCS. Analizând spectrele ATR-IR se pot observa picuri caracteristice suportului poliuretanic detectate la lungimile de undă 3316, 1526, 2917 și 1736 cm⁻¹, picuri atribuite grupărilor N–H, C–N, C–H și C=O, rezultate comparabile cu datele din literatură (Garcia-Pacios și colab., 2011). Benzile caracteristice grupărilor fosfat (PO_4^{3-}) aferente structurii hidroxiapatitei pot fi identificate în spectrele ambelor biocompozite SCS-3 și M-SCS-3, ele fiind poziționate la 835, 958, 1037 și 1118 cm⁻¹. Suplimentar în cazul biocompozitului M-SCS-3 apar picuri la lungimile de undă 2050 – 2930 cm⁻¹, picuri atribuite vitaminelor A și D₂, ceea ce denotă că acestea au fost adsorbite pe suprafața suportului polimeric.



Figura V.14. Spectrele ATR-IR a) a suportului poliuretanic b) ale biocompozitelor SCS-3 după imersia în soluția biomimetică SCS c) M-SCS-3 după imersia în soluția biomimetică M-SCS (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^a)

V.1.2.3. Caracterizarea biologică a biocompozitelor

Testele *in vitro* asigură informații preliminare asupra unui biomaterial în ceea ce privește proprietățile biologice a acestuia cum ar fi biocompatibilitatea, bioactivitatea, gradul de toxicitate ce îl poate avea asupra organismului gazdă, în scopul evitării testelor inutile realizate pe animale.

V.1.2.3.1. Metodologia izolării și cultivării celulare

a) Izolarea celulară

Celulele utilizate în prezentul studiu de biocompatibiliate au fost celule mezenchimale umane (hMSC). hMSC au fost izolate din măduva spinării, fără a se înregistra date legate de pacientul de la care provine țesutul, în conformitate cu reglementările etice. Celule mezenchimale umane (hMSC) au fost puse la dispoziție de laboratorul departamentului de Inginerie Tisulară a Facultății de Știință și Tehnologie - MIRA - Institutul de Tehnologie biomedicală și Medicină tehnică, Universitatea Tweente din Olanda.

Pentru proliferarea *in vitro* a hMSC s-a utilizat mediul: α -MEM suplimetat cu 10 % ser bovin (FBS), 0,2 mM Lglutamină, P/S (100 unități/100mg penicilină și 100 mg/mL streptomicină), în condiții standard de cultivare (37 °C, 5 % CO₂ și 95 % umiditate). Mediul de cultură a fost reîmprospătat la fiecare 2 – 3 zile. Pentru experimentele derulate, pentru hMSC s-a folosit pasajul 4. Matricile poliuretanice au fost sterilizate prin imersarea acestora în soluție de etilen oxid 70 %, timp de 24 de ore, după care acestea au fost spălate de trei ori cu soluție tampon fosfat (PBS) și uscate în hota cu flux laminar.

b) Cultivarea celulară

Pentru culturile celulare probele au fost imersate în medii de cultură specifice tipului de celulă. S-a folosit un *mediu de proliferare* constituit din: α -MEM , 1 % L-glutamină, 0,2 mM acid ascorbic, P/S (100 U/ml pencilină, 10 µg / ml streptomicină), 10 % FBS, 1 ng/ml bFGF (factor de creștere fibroblastic - factor de proliferare). Cultivarea s-a realizat prin picurarea soluției ce cuprinde o suspensie de celule (80 000 celule/godeu) în plăci de cultură de 12 godeuri. Mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 2 – 3 zile pe toată perioada desfășurării testelor. Fiecare tip de celulă a fost cultivare, iar ca referință s-a utilizat un control pentru fiecare interval de timp.

V.1.2.3.2. Vizualizarea celulară prin colorare cu Albastru de metilen

Pentru a fi posibilă examinarea macro- și microscopică a celulelor, probele au fost colorate folosind tehnica de colorare cu Albastru de metilen. Acesta este un colorant capabil de a penetra cu ușurință membrana celulară astfel că, în final, celulele vor fi colorate în albastru. După parcurgerea protocolului de fixare și colorare a probelor, au fost preluate imagini folosind un microscop tip Bright - field.

Figura V.17 redă imagini ale biocompozitelor poroase pe bază de hidroxiapatită, poliuretan și principii biologic active pe a cărui substrat au fost cultivate celulele hMSC. În imaginile prezentate în această figură se poate observa că celulele hMSC proliferează pe substratul tuturor biocompozitelor pe care au fost cultivate. După cum se observă în imaginile prezentate în figura V.17, spoturile de colorație albastru închis reprezintă zonele acoperite cu celule umane hMSC. Cu referire la gradul de acoperire celulară se poate observa o diferență și anume: biocompozitele imersate în soluții biomimetice cu un adaos de principii biologic active (vitaminele $A+D_2$, B_6), prezintă un grad ridicat de acoperire celulară comparativ cu biomateriale imersate în soluțiile biomimetice de bază (SCS și SBF), ceea ce denotă faptul că adaosul de vitamine A, D_2 și B_6 favorizează pozitiv dezvoltarea celulară și respectiv crește gradul de bioactivitate a biocompozitului.



V.1.2.4. Studiul procesului de degradare in vitro al biocompozitelor

Pe lângă caracteristicile mecanice, fizice și chimice pe care trebuie să le întrunească un biomaterial pentru o anumită aplicație medicală, în conceperea unui biomaterial trebuie avut în vedere și comportamentul pe care poate să-l aibă în momentul în care intră în contract cu mediile biologice existente în organismul uman. Biomaterialul odată introdus în organismul uman este supus unor procese specifice precum difuzia de ioni și fluide, drenajul limfatic, circulația sângelui, iar aceste reacții specifice pot influența dacă materialul este sau nu este tolerat de organismul gazdă. În esență, este necesar să se testeze stabilitatea chimică a unui biomaterial în relație cu mediul biologic care îl înconjoară și cu care poate reacționa, deoarece acesta poate elibera produse de degradare ce pot avea acțiune toxică asupra organismului. Toxicitatea puternică se poate manifesta atât la nivelul țesutului lezat cât la nivelul țesuturilor învecinate biomaterialului, prin decolorare, necroză, creșterea temperaturii și reacții alergice.

Prin urmare este necesar să se stabilească modul cum biomaterialul se comportă în contact cu fluidele organice. Testele care urmăresc acest aspect studiază **procesele de degradare** ale biomaterialului în condiții fiziologice "*in vitro*". *Cinetica de degradare a biomaterialelor compozite* obținute în acest studiu a fost determinată prin studierea variației în greutate a probei de biocompozit (W) din momentul contactului cu soluția biomimetică SBF. Studiul cinetic al procesului de degradare presupune determinarea gradului de degradare a materialului la diverși timpi și reprezentarea grafică W = f (t).

Protocolul experimental:

Prin metoda gravimetrică a fost investigată degradarea hidrolitică *in vitro* a compozitelor în SBF, parcurgând următoarele etape: se cântăresc eșantioane din biomaterialele obținute; masa inițială a eșantionului uscat se notează m_0 ; într-un flacon Erlenmeyer de 100 ml se introduc 30 ml de soluție SBF în care se imersează probele de biomaterial; paharul cu probele se pune într-o baie cu termostatare la temperatura de 37 °C; după anumite perioade de timp se scoate o probă din pahar, se îndepărtează apa superficială prin tamponare cu hârtie de filtru și se câtărește rapid; masa probei ude se notează m_i ; se calculează gradul de umflare al probelor W (%), conform ecuației:

$$(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \cdot 100$$
(V.3)

unde: $m_1 = masa$ probei uscate înainte de imersia în SBF [g];

- m₂ = masa probei ude după imersia în SBF [g];
- W = variația masei probei [%]); se reprezintă grafic <math>W = f(t).

W



Figura V.18. Variația greutății biocompozitelor înainte și după imersia în soluțiile SBF și M-SBF la pH = 7,4 și 37 °C timp de 8 zile (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2012^b)

După cum se observă în figura V.18 suportul poliuretanic imersat în soluția biomimetică **SBF** (fără vitamine) crește treptat în greutate în primele trei zile, după care până în a 5 zi pierde în greutate. Acest lucru se explică prin faptul că, în această perioadă de timp, se produce un proces de adsorbție a moleculelor de apă. Aceste molecule de apă adsorbite în interiorul matricei polimerice pote produce descompunerea hidrolitică a lanţurilor polimerice. Apoi se observă că din a cincea zi există o creștere în greutate a probei, care se explică prin formarea de cristale de apatită pe suprafața poliuretanică, fapt confirmat și de imaginile microscopice SEM (figurile V.3 și V.4). În cazul când suportul poliuretanic este imersat în soluția biomimetică **M-SBF** (cu vitaminele A și D₂) chiar din prima zi de imersare se observă o scădere în greutate relativ mică a acestuia. Această scădere a ponderii de greutate a matricei poliuretanice poate fi explicată printr-o degradare a lanţurilor din structura poliuretanului ca urmare a reținerii moleculelor de apă. După prima zi de imersare, greutatea matricei crește treptat până la 3 zile. Prin urmare, pierderea de greutate rezultă din degradarea matricei polimerice care este compensată prin formarea stratului de hidroxiapatită pe suprafața polimerică, după cum reiese din imaginile SEM realizate după șase zile de imersie în M-SBF (Figura V.8).

În concluzie, prin depunerea unui strat de hidroxiapatită cristalină pe suprafața suportului poros poliuretanic nu numai că se îmbunătățește bioactivitatea matricei polimerice, dar se reduce rata lui de degradare, implicit stabilitatea chimică a biomaterialului în relație cu mediul biologic care îl înconjoară și cu care poate reacționa.

V.1.3. Depuneri de hidroxiapatită și nanoparticule de Ag pe suporturi poroase poliuretanice prin procedee biomimetice

Este binecunoscut faptul că, în chirurgia reparatorie, un risc ridicat îl reprezintă infectarea plăgilor post-operatorii și a implanturilor. Pentru a preveni acest risc, se poate apela la depunerea pe suprafața biomaterialelor a unor substanțe biocide cum sunt antibioticele sau ionii de argint, fiind astfel posibilă inhibarea proliferării microbiene de pe suprafața implanturilor. Întrucât utilizarea în exces a antibioticelor a dus la apariția efectului de rezistență a tulpinilor microbiene, o alternativă în prevenirea infecțiilor ar putea fi utilizarea argintului.

În cadrul acestui capitol s-a avut ca obiectiv principal *obținerea de biomateriale compozite pe bază de poliuretan – hidroxiapatită – argint.*

Pentru îndeplinirea obiectivului s-au avut în vedere următoarele aspecte:

✓ utilizarea metodei biomimetice de depunere a hidroxiapatitei pe suprafața matricei poroase poliuretanice folosind soluția biomimetică SCS; s-a folosit această soluție întrucât în subcapitolul anterior s-a observat că soluția SCS comparativ cu soluția SBF are o eficiență mai ridicată în ceea ce privește timpul de depunere a cristalelor apatitice pe suportul poliuretanic;

✓ caracterizarea structurală și morfologică a materialele obținute apelând la metode și tehnici de analiză avansate și performante;

- ✓ evaluarea stării de oxidare a specilor de argint încorporate pe suprafața poliuretanică;
- ✓ testarea proprietăților antibacteriene a compozitelor studiate;

✓ efectuarea unui studiu preliminar de testare a biocompatibilității compozitelor prin observarea microscopică a gradul de atașare și proliferare celulară la suprafața biocompozitelor studiate.

Materialele polimerice sunt cunoscute a fi adesea folosite pentru obținerea nanoparticulelor de argint datorită faptului că grupele polare ale polimerului interacționează direct cu particulele metalice influențând puternic forma particulelor (Vimala și colab., 2010). Datele din literatură indică, de asemenea, faptul că apariția cristalelor de Ag poate fi produsă de reducerea ionilor de Ag din soluții apoase prin transferul de electroni (Ag⁺ + 1e⁻ \rightarrow Ag⁰) de pe suprafața apatitică (Arumugam și colab., 2010).

V.1.3.1. Protocol de obținere

În scopul obținerii biocompozitelor pe bază de hidroxiapatită – poliuretan – argint s-a procedat conform următoarelor etape:

1. imersarea matricelor polimerice în soluția biomimetică SCS, în condiții fiziologice pe o perioadă cuprinsă între 1 - 7 zile, în scopul depunerii stratului de hidroxiapatită. Soluția de SCS fiind reîmprospătată odată la fiecare două zile;

2. spălarea cu apă deionizată și uscarea biocompozitelor hidroxiapatită - poliuretan obținute;

3. imersarea biocompozitelor uscate în soluții de AgNO₃ cu concentrații cuprinse între 0,1-0,5 M (pH = 6,5; 37 °C), pe o durată de 2 zile, în scopul depunerii ionilor de argint;

- 4. uscarea biocompozitelor pe bază de hidroxiapatită poliuretan argint la temperatura de 60 °C timp de o zi;
- 5. caracterizarea structutal- morfologică, microbiologică și biologică a materialelor.

În tabelul V.5 sunt exemplificate tipurile de probe obținute cu caracteristicile aferente fiecăreia. În urma analizei macroscopice, pentru investigațiile ulterioare s-a selectat proba **HA-PU-Ag5** deoarece aceasta prezintă cea mai uniformă acoperire cu cristale apatitice și Ag.

Probă	Concentrație AgNO ₃	Observații
HA-PU	-	compozit utilizat drept reper etalon, fără depunere de nanoparticule de Ag; strat uniform de cristale lamelare ce formează agregate sferice sub formă de "floare".
HA-PU-Ag1	0,1 M	strat uniform, incolor de cristale apatitice; nu sunt evidențiate modificări ale aspectului stratului depus, comparativ cu proba etalon, HA-PU.
HA-PU-Ag2	0,2 M	apariția culorației de slab gălbui a depunerii
HA-PU-Ag3	0,3 M	intensificarea colorației de galben
HA-PU-Ag4	0,4 M	culoare galben spre maroniu
HA-PU-Ag5	0,5 M	culoare maro – roșcat

Tabelul V.5. Biocompozite pe bază de hidroxiapatită - poliuretan - argint

În momentul în care compozitul poliuretan - hidroxiapatită este imersat într-o soluție apoasă concentrată de azotat de argint, are loc procesul de reducere a ionilor de Ag^+ și respectiv formarea de nanoparticule de argint pe suprafața matricei poliuretanice (Figura V.20).



Figura V.20. Formarea *in-situ* de nanoparticule Ag pe suportul poliuretan – hidroxiapatită (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2013^b)

Formarea in-situ de nanoparticule Ag ar putea fi explicată printr-un mecanism care implică următoarele etape: reducerea ionilor de Ag în atomi de Ag; stabilirea de legături chimice între atomii de Ag și grupările polare ale matricei poliuretan - hidroxiapatită; nucleația și creșterea nanoparticulor de Ag.

Compozitul a cărei structură este constituită din polimerul poliuretanic și cristalele apatitice acționează simultan precum un agent de reducere a ionilor de Ag, jucând rolul de stabilizator pentru nanoparticule de Ag și respectiv de matrice în care are loc distribuirea omogenă și imobilizarea speciilor de Ag.

Moleculele poliuretanice de polimer conțin grupări funcționale polare, cum ar fi gruparea uretan (-NH-CO-O-) și gruparea amidică (-CO-NH-), în timp ce cristalele de hidroxiapatită conțin au drept grupare polară gruparea hidroxil (-OH). După cum este cunoscut, atomii de azot și oxigen din aceste grupări polare au o afinitate puternică pentru ionii de argint în special pentru argintul metalic fiind posibilă astfel formarea unui complex cu ionii metalici (Widoniak și colab., 2005). Azotul și oxigenul din grupările polare (de exemplu, uretan, amidă și hidroxil) ale compozitului poliuretan - hidroxiapatită cu soluția de azotat de argint are loc formarea unui complex coordinativ între grupările polare ale compozitului și ionii de Ag din soluția de AgNO₃. Astfel, compozitul poliuretan - hidroxiapatită donează o pereche de electroni de la azot și oxigen (din grupările uretan,

amidă și hidroxil) la orbitalii *sp* ai ionilor de Ag, apărând atomii de Ag. După un scurt timp de incubare, suprafața compozitului este suprasaturată în atomi de Ag, are loc procesul de nucleație a atomilor de Ag ceea ce are ca rezultat agregarea atomilor de Ag în nanoparticule mici de Ag. Aceste nanoparticule pot fuziona cu altele rezultând agregate de dimensiuni mai mari. Acest fenomen ar putea explica existența nanoparticulelor sferice de Ag de diferite dimensiuni de pe suprafața compozitului poliuretan - hidroxiapatită evidențiate în imaginile SEM (vezi figura V.16). Posibilitatea ca în matricea poliuretanică să mai existe urme reziduale de N,N-dimetilformamidă (DMF) (utilizat ca solvent în prepararea matricei), ar putea determina reducerea rapidă a ionilor de argint și formarea de nanoparticule de argint sferoidale, așa cum se menționează în literatura de specialitate (Pastoriza-Santos și colab., 2000). Matricea poliuretanică datorită porozității sale joacă rolul de matrice pentru nucleația și creșterea nanoparticulelor de Ag. De asemenea, morfologia de tip "petale de trandafir" a cristalelor din stratului de hidroxiapatită depus pe suprafața poliuretanică îmbunătățește difuzia soluției de azotat de argint ceea ce conduce la inițierea și creșterea particulelor de Ag în structura compozitului (vezi figura V.16).

V.1.3.2. Caracterizarea structural - morfologică a biocompozitelor

V.1.3.2.1. Microscopia electronică cu baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (SEM-EDX)

După 5 zile de imersie a matricei poliuretanice în soluția SCS suprafața acesteia este acoperită de cristale lamelare de hidroxiapatită ce au forma unor petale de trandafir "petale de trandafir". După formarea stratului de hidroxiapatită la suprafața materialelor studiate, acestea au fost imersate în soluția de AgNO₃ pe o durată de 2 zile. În timpul acestei etape, ioni de argint sunt transferați din soluție la nivelul suprafaței solide a compozitului unde are loc reducerea acestora. Procesul de depunere a ionilor de argint utilizând soluția de AgNO₃ a fost efectuat în condițiile de lumină naturală. După 2 zile de imersie în soluția de AgNO₃ la suprafața compozitelor sunt formate agregate ce conțin nanoparticule de Ag sferoidale poziționate printre cristalele aciculare de hidroxiapatită, asa cum se poate observa în imaginile SEM prezentate în figura V.22.



Figura V.22. Imagini SEM de diferite rezoluții ale biocompozitului HA-PU-Ag5 (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2013^b)

Agregatele de Ag sunt distribuite uniform pe suprafața matricei poliuretanice, formând un strat intergranular cu micropori. Toate probele obținute prezintă aceeași morfologie poroasă. Din imaginea SEM prezentată în figura V.22.b, efectuată la o rezoluție mărită, mărimea agregatelor de Ag poate fi estimată la aproximativ 70 - 150 nm. Particulele mai mari de Ag s-au format prin coacervarea celor mai mici în timpul procesului de reducere. După cum se poate observa în figura V.22.c pe suprafața cristalelor de hidroxiapatită există un număr mare de nanoparticule Ag. Dimensiunea acestor nanoparticule Ag este estimată a fi mai mică de 50 nm, aspect cofirmat și de rezultatele analizei DRX.

În figura V.23 este prezentat spectrul EDX cu imaginea SEM aferentă a stratului de nanoparticule de hidroxiapatită cu argint depuse pe suportul poros poliuretanic, care confirmă faptul că acoperirea de nanoparticule conține atomi de Ag (existenți atât sub formă de nanoparticule și cât și sub formă de aglomerațiuni sferice), și respectiv atomi de Ca, P și O (constituienți ai cristalelor apatitice).



Figura V.23. Spectrul EDX și imaginea SEM a stratului de hidroxiapatită - argint depus pe suprafața matricei poliuretanice după 48 h imerisie în soluția de AgNO₃ (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2013^b)

Analizând figura V.23 se pot observa picurile de la 2,9, 3,1 și 3,3 keV ce corespund energiilor speciilor atomice de argint, respectiv Ag L α , Ag L β și Ag L β_2 , aspect confirmat și în literatura de specialitate (Majeed Khana și colab., 2011). Aceste picuri de absorbție optică sunt tipice pentru absorbția nanocristalelor de argint metalic datorită rezonanței plasmonilor de suprafață. Pe baza rezultatelor prezentate mai sus este confirmată prezența argintului elementar sub formă nanocristalină pe suportul membranar. Analiza EDX a indicat faptul că conținutul de Ag în stratul hidroxiapatită - argint depus pe membrana poroasă de poliuretan este de aproximativ 8 wt%. În spectrul EDX apar și alte picuri ce corespund atomilor de Ca, P și O care intră în componența cristalelor de hidroxiapatită găsite în imediata apropiere a particulelor de argint. Conform rezultatelor SEM - EDX, cristalele de apatită depuse pe suprafața poliuretanică sunt compuse în principal din hidroxiapatită, care prezintă un raport molar Ca / P de ~ 1,67, raport molar ce se află într-o bună concordanță cu datele existente în literatură (Fayaz și colab., 2009). De asemenea, prezența în spectrul EDX a picului aferent carbonului poate fi atribuită prezenței poliuretanului din structura compozitului.

V.1.3.2.2. Difracția de raze X

Analizele DRX efectuate permit verificarea modului în care conținutul de argint influențează structura compozitelor studiate. În figura V.24 sunt ilustrate difractogramele compozitului HA-PU și respectiv a compozitului HA-PU-Ag5. Pentru identificarea fazelor anorganice din compozitele obținute s-au utilizat standardele elaborate de Comitetul Reunit privind Standardele de Difracție al Pulberilor (Joint Committee on Powder Diffraction Standards - JCPDS). Difractograma DRX a compozitului HA-PU este ilustrată în figura V.24.a, unde se pot observa picurile cu valorile cele mai intense de la unghiurile 20 de 25,9°, 31,67°, 32,8°, 34,1°, 39,7° și 46,6° reprezentând planele de reflexie (002), (211), (300), (202), (310) și (222) caracteristice hidroxiapatitei. Valorile obținute sunt în bună concordanță cu difractograma standard pentru hidroxiapatita pură conform cartotecii difractometrice JCPDS 09-0432.



Figura V.24. Difractogramele a) compozitului HA-PU și b) HA-PU-Ag5 (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2013^b)

În cazul compozitului HA-PU-Ag5, după depunerea ionilor de argint pe suprafața solidă a compozitului, în difractograma DRX apar noi picuri așa cum se poate observa în figura V.24.b. Sunt evidențiate picuri de difracție în jurul valorilor 38,4°, 44,5°, 64,6° și 77,5° reprezentând planele de reflexie Bragg (111), (200), (220) și (311) ale structurii cristaline de tip cub centrat pe fețe (ccf) corespunzătoare nanoparticulelor de argint (conform standardului JCPDS nr. 04.0784). Aceste date sunt în concordanță cu cele prezentate în literatura de specialitate. Picurile de difracție ale atomilor de Ag sunt evidențiate distinct, aspect ce indică faptul că Ag a fost bine cristalizat fără existența unor faze amorfe. Dimensiunea nanoparticulelor de Ag a fost determinată utilizând formula de calcul Scherrer. Astfel, nanoparticulele de Ag prezintă dimensiunea medie a cristalelor în jurul valorii de 34,71 nm, în concordanță cu dimensiunile obținute din analiza SEM. În cazul ambelor compozite testate este indentificată existența unui pic de difracție în jurul valorii de 21° ceea ce corespunde polimerului poliuretanic. Datorită structurii amorfe a poliuretanului, în difractogramele DRX, picul caracteristic polimerului apare sub forma unei benzi largi. Analiza DRX a confirmat faptul că stratul de nanoparticule depus la suprafața matricei poroase poliuretanice este constituit din nanoparticule cristaline de hidroxiapatită și argint.

V.1.3.2.3. Spectroscopie UV-Vis

Pentru a obține mai multe informații referitoare la structura probelor investigate s-a apelat și la metoda de analiză prin spectroscopie UV-Vis. Spectroscopia de rezonanță a plasmonilor de suprafață joacă un rol important în determinarea spectrelor de absorbție optică a nanoparticulelor de Ag. Banda plasmonică de rezonanță a nanoparticulelor este cunoscută a fi sensibilă la dimensiunea, forma și distribuția spațială a particulelor, care trece la o lungime de undă mai mare odată cu creșterea dimensiunii particulelor (Manna și colab., 2006). În figura V.25 sunt ilustrate spectrele UV-Vis ale probelor în intervalul de undă cuprins între 300 - 800 nm. Se poate observa că matricea poliuretanic și compozitul HA-PU nu prezintă maximele de absorbție în regiunea 400 - 500 nm. În schimb, în cazul compozitului HA-PU-Ag5 apare un pic larg de absorbție cu un maxim la lungimea de undă de 415 nm. Forma simetrică a benzii plasmonice de rezonanță sugerează faptul că particulele de argint reduse sunt uniform dispersate și au o formă sferică. În datele de specialitate este confirmat faptul că picul cu un maxim de

absorbție în domeniul de lungime de undă cuprins între 410 - 520 nm este strict legat de forma nanoparticulelor de argint metalic, iar înălțimea acestuia dă informații referitoare la concentrația nanoparticulelor de argint (Manna și colab., 2006).



Figura V.25. Spectrele UV-Vis ale: a) matricei poliuretanice, b) compozitului HA-PU și c) compozitului HA-PU-Ag5 (Ciobanu, *Ilisei* și colab., 2013^b)

S-a observat că formarea nanoparticulelor de Ag pe suprafața compozitului hidroxiapatită - poliuretan este însoțită de modificarea în timp culorii. În momentul imersării probei incolore de hidroxiapatită - poliuretan (proba HA-PU) în soluția de AgNO₃, s-a produs o schimbare graduală de culoare de la incolor la galben (proba HA-PU-Ag3), iar ulterior la maron - roșcat (proba HA-PU-Ag5) (Figura V.26).



Figura V.26. Imagini optice ale stratului depus pe matricea poliuretanică: a) proba HA-PU, b) proba HA-PU-Ag3 și c) proba HA-PU-Ag5

Modificarea culorii stratului depus a avut loc odată cu creșterea timpului de imersie în soluția de AgNO₃ (de la 24 h la 48 h), cât și odată cu creșterea concentrației soluției de AgNO₃ (de la 0,1 M la 0,5). Acest lucru confirmă reducerea ionilor Ag^+ și formarea nanoparticulor de Ag pe suprafața matricei.

V.1.3.2.4. Spectroscopie de fotoelectroni cu raze X

Pentru a identifica starea de oxidare a nanoparticulelor de argint depuse pe suprafața compozitului HA-PU-Ag 5 s-a apelat la metoda de analiză prin spectroscopie de fotoelectroni cu raze X (XPS). Figura V.27 prezintă spectrul XPS a compozitului HA-PU-Ag5 după 2 zile de imersie în soluția AgNO₃ indicând prezența elementelor Ag, Ca, P, O și C, ceea ce corespunde cu analizele SEM-EDX efectuate anterior.



Figura V.27. Spectrul XPS a compozitului HA-PU-Ag5 după 2 zile de imersie în soluția AgNO₃ (Ciobanu, <u>Ilisei</u> și colab., 2013^b)

Spectru XPS indică picuri caracteristice pentru elementele Ag, Ca, P, O şi C, respectiv Ag $3d_{5/2}$ (368 eV), Ag $3d_{3/2}$ (374 eV), Ca 2P (345 eV), P 2P (133 eV), O 1s (532 eV) şi C 1s (286 eV). Medalionul din figura V.27 pune în evidență energiile caracteristice pentru Ag corespunzătoare configurației electronice $3d_{5/2}$ şi $3d_{3/2}$ la energiile 368 eV şi respectiv 374 eV, cu o diferență Δ de 6,0 eV. Aceste rezultate sunt comparabile cu datele existente în literatură cu referire la energiile de legătură standard ale Ag de pe orbitalul 3d ($3d_{5/2} = 368,3$ eV, $3d_{3/2} = 374,3$ eV, cu diferența $\Delta = 6,0$ eV) corespunzătoare argintului metalic respectiv, oxidului de argint (Wagner şi colab., 1979).

Deplasarea picurilor caracteristice argintului metalic față de valorile standard, cu o valoare de 0,3 eV pentru ambele nivele electronice $3d_{5/2}$ și $3d_{3/2}$, poate fi atribuită mediului chimic și a dimensiunilor reduse ale particulelor de argint. Prin urmare, se poate afirma că această schimbare indică faptul că ionii de Ag^+ au fost transformați în nanoparticule de Ag, confirmând reducerea ionilor de Ag^+ în ioni de argint metalic, Ag^0 .

Tot cu ajutorul analizei XPS s-a indentificat faptul că speciile de Ag din stratul de hidroxiapatită - argint depus pe matricea poroasă poliuretanică sunt în cantitate de aproximativ 7,1 wt% restul fiind hidroxiapatită, ceea ce este în concordanță cu rezultatele evidențiate în analiza SEM - EDX.

În figura V.27, picul C 1s la nivelul valorii energetice de 286 eV poate fi atribuit prezenței poliuretanului în structura compozitului. De asemenea, prezența picurilor la valorile de 345 eV și respectiv la 133 eV sunt caracteristice elementelor Ca și P ceea ce explică existența hidroxiapatitei depusă pe suprafața poliuretanică.

V.1.3.3. Caracterizarea biologică a biocompozitelor

Pentru testarea biologică a compozitelor poliuretan - hidroxiapatită - argint au fost utilizare celule mezenchimale umane (hMSC) recoltate din măduva spinării păstrând aceleași condiții de izolare și cultivare ca la subcapitolul prezentat anterior (paragraful V.1.2.3). În scopul **vizualizării macro- și microscopică a celulelor** proliferate la nivelul suprafaței compozitelor s-a apelat la tehnica prin colorare cu Albastru de metil. Acest colorant penetreză cu ușurință membrana celulară astfel că, în final, celulele vor fi colorate în albastru, fiind posibilă vizualizarea la scară microscopică. În figura V.28 sunt ilustrate imaginile biocompozitului hidroxiapatită - poliuretan (Figura V.28.a), respectiv a biocompozitului hidroxiapatită poliuretan - argint (Figura V.28.b) la suprafața cărora au fost cultivate celulele mezenchimale umane.



Figura V.28. Vizualizarea macroscopică a biocompozitelor a) HA-PU și b) HA-PU-Ag 5 după 7 zile de proliferare celulară

În imaginile prezentate anterior se poate observa că celulele hMSC proliferează la suprafața substratului biocompozitelor pe care au fost cultivate. Putem afirma că, concentrația în nanoparticule de argint nu afectează dezvoltarea celulară, neexistând liza celulară. Putem concluziona că introducerea argintului la scară nano (< 50 nm) în structura compozitului poliuretan - hidroxiapatită conferă acestuia proprietăți de adeziune și proliferare net superioare față de compozitului puliuretan - hidroxiapatită fără adaos de nanoparticule antimicrobiene. În cazul biocompozitului hidroxiapatită - poliuretan - argint (proba HA-PU-Ag5), se poate observa o adeziune și proliferare celulară dispusă în strat uniform de celule hMSC.

V.1.3.4. Caracterizarea bacteriologică a biocompozitelor

Pentru a evalua activitatea antimicrobiană *in vitro* a biocompozitelor obținute anterior, s-a testat sensibilitatea a două tulpini patogene: una gram pozitivă - *Streptococus aureus* și respectiv una gram negativă - *Escherichia coli*. Ambele specii bacteriene au fost puse la dispoziție de laboratorul de microbiologie al departamentului de Ingineria și Managementul Mediului, din Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași. Ca metodă de testare s-a utilizat **metoda de determinare a biomasei prin măsurarea densității optice.**

Izolarea si conservarea tulpinilor bateriene

Streptococus aureus a fost izolată de pe țesut tegumentar utilizând ca mediu de cultură "m- Staphilococcus Broth" cu următoarea compoziție: NaCl – 75 g, manitol – 10 g, caseină pangreatică – 10 g, K₂HPO₄ - 5 g, extract de drojdie - 2,5 g, lactoză - 2 g, agar - 18 g, substanțe dizolvate în 1000 ml apă distilată cu un pH al mediului de cultură de $7 \pm 0,2$ la temperatura de 25 °C. Mediul de cultură a fost sterilizat la 121 °C timp de 15 min.

Escherichia coli a fost izolată din probe de apă uzată utilizând ca mediu de cultură, TBX Agar (Triptone bile x - glucuronide agar) cu următoarea compoziție: peptonă – 20 g, agar - 15 g, săruri biliare - 1,5 g, x- β -D-glucuronode - 0,075 g,

substanțe dizolvate în 1000 ml apă distilată cu un pH al mediului de cultură de 7 ± 0.2 la temperatura de 25 °C. Mediul de cultură a fost sterilizat la 121 °C timp de 15 min. Ambelele tulpini bacteriene au fost păstrate în condiții de refrigerare (4 °C) și pasate periodic pe mediu de întreținere Sabouraud cu următoarea formulă: glucoză – 20 g, peptonă – 10 g, agar – 15 g, substanțe dizolvate în 1000 ml apă distilată cu un pH al mediului de cultură de 7 ± 0.2 la temperatura de 25 °C. Mediul de întreținere a fost sterilizat la 121 °C timp de 15 minute. Microorganismele test (*Streptococus aureus* și *Escherichia coli*) au fost însămânțate (10⁴ CFU/mL) pe mediul lichid Sabouraud la temperatura de 37 °C.

Biocompozitele pe bază de hidroxiapatită – poliuretan – argint au fost porționate sub formă de eșantioane de circa 0,5 g și au fost puse în contact cu 10 ml mediu bacteriologic. În paralel, s-a pregătit câte un martor pentru fiecare tulpină test fără substanță activă. Probele astfel montate au fost incubate la 37 °C în condiții de aerare și agitare la 20 rpm, timp de 24 h.

Concentrația bacteriană din mediul de bacteriologic a fost citită spectofotometric (utilizând un spectrofotometru tip Shimadzu UV-2450 UV-Vis) prin măsurarea adsorbanței la lungimea de undă de 600 nm. Eficiența inhibiției microbiene s-a determinat utilizând formula de calcul:

$$IR\% = 100 - \frac{A_t - A_o}{A_{con} - A_o} \cdot 100$$
(V.4)

unde: A_0 = adsorbanța mediului microbian înainte de incubare, la lungimea de undă de λ = 600 nm;

 A_{con} = adsorbanța mediului microbian după 24 h de incubare, la lungimea de undă de λ = 600 nm;

 A_t = adsorbanța mediului microbian (cu nanoparticole de Ag eliberate în mediu) după 24 h de incubare, λ = 600 nm;

Rezultatele obținute au indicat că după 24 h de incubare a probelor **pe bază de hidroxiapatită – poliuretan – argint**, circa 92,5 % *Staphylococcus aureus* și respectiv 94,3 % *Escherichia coli* din microorganismele aflate în suspensie au fost inhibate. După cum este precizat și în literatura de specialitate, se poate observa că activitatea inhibitorie a Ag de pe suprafața probelor **pe bază de hidroxiapatită – poliuretan** este mai mare în cazul bacteriilor gram negative, comparativ cu cele gram pozitive (Feng și colab., 2000).

V.2. Biocompozite pulverulente pe bază de hidroxiapatită și principii biologic active

Scopul acestui studiu experimental îl constituie realizarea de biocompozite pe bază de hidroxiapatită ce includ substanțe biologic active (L-lisină clorhidrat și/sau sulfat de gentamicină), cu posibile aplicații în ingineria tisulară a osului (ca substituenți osoși sau implanturi osoase) și în terapia "medicamentoasă țintită" (ca sisteme cu eliberare controlată de medicament).

L – lisina clorhidrat este inclusă în compozit în scopul inducerii unor proprietăți specifice acestuia, ea având un rol important în integrarea implantului în organismul gazdă. Se știe faptul că L-lisina este unul dintre aminoacizii esențiali care compun proteinele organismului uman. La copii, L-lisina este esențială pentru dezvoltarea armonioasă a corpului amplificând în mod natural eliberarea hormonului de creștere în organism, fiind astfel stimulată creșterea masei musculare; la adulți, L-lisina se implică în vindecarea și regenerarea rănilor și a cicatricilor postoperatorii. În lipsa ei, calciul alimentar nu se poate asimila în oase și în dinți. De asemenea, L-lisina are un rol important în producerea colagenului care reprezintă faza organică a oaselor și a pielii; în plus, ea întărește sistemul imunitar și este antivirală.

Sulfatul de gentamicină din compozit are rolul de medicament, respectiv este indicat în tratamentul local al infecțiilor bacteriene care pot apărea la interfața implant - țesut viu. Biocompozitele obținute se preconizează a avea capacitatea de eliberare controlată a medicamentului înglobat (sulfatul de gentamicină) și se pot administra ca sisteme topice cu eliberare controlată de medicament la nivelul țesutului osos, pentru îmbunătățirea tratamentelor unor afecțiuni specifice în medicina ortopedică și ortodontică.

V.2.1. Protocol de obținere

Biocompozitele pe bază de hidroxiapatită cu substanțe biologic active (L - lisină clorhidrat, sulfat de gentamicină) s-au obținut prin metoda co-precipitării chimice folosindu-se următoarele materii prime: surse de calciu și fosfor: azotatul de calciu tetrahidratat $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ și fosfatul acid de amoniu $(NH_4)_2HPO_4$, hidroxid de amoniu NaOH cu rol de reglare a pH-ului, substanțe biologic active: L-lisină clorhidrat, sulfat de gentamicină.

Biocompozitele s-au obținut respectând protocolul de sinteză a hidroxiapatitei (vezi paragraful IV.1.1) doar că în timpul sintezei acesteia se adaugă cantități bine definite de substanțe biologic active. Protocolul procesului de obținere a biocompozitelor apatitice, cu parametrii de proces optimi, presupune parcurgerea următoarelor etape:

1) Amestecarea soluțiilor apoase de Ca(NO₃)₂·4H₂O (0,167M/ ℓ) și (NH₄)₂HPO₄ (0,100M/ ℓ)

- soluția de Ca(NO₃)₂·4H₂O se adaugă lent peste soluția acidă de (NH₄)₂ HPO₄ cu un debit de 0,5 ml/min; viteza de agitare a suspensiei este de 1200 rot/min; pH-ul mediului de reacție se menține în jurul valorii 10 prin adăugare de soluție de NaOH; încălzirea suspensiei la temperatura de 90 °C cu scopul de a accelera viteza de reacție;

2) Maturarea suspensiei timp de 24 de ore, la temperatură ambientală (20 ± 1 °C), fără agitare;

3) Adăugarea substanțelor biologic active, sub agitare, la 37 °C:

- a) pentru obținerea **biocompozitelor apatitice cu sulfat de gentamicină** (probele notate **HA-GS** și **HA-GS conc**) se adaugă în suspensia inițială o soluție de sulfat de gentamicină de concentrație 0,4 mg/ml (pentru proba **HA-GS**), respectiv 0,2 mg/ml (pentru proba **HA-GS conc**);

- b) pentru obținerea **biocompozitului apatitic cu L-lisină clorhidrat** (proba notată **HA-L-lyHCl**) se adaugă în suspensia inițială o soluție de L-lisină clorhidrat de concentrație 2,5 mg/ml;

- c) pentru obținerea **biocompozitelor apatitice cu sulfat de gentamicină și L-lisină clorhidrat** se adaugă în suspensia inițială: soluția de sulfat de gentamicină de concentrație 0,2 mg/ml și soluția L-lisină clorhidrat de concentrație 2,5 mg/ml (pentru proba notată **HA-L-lyHCl-GS**); soluția de sulfat de gentamicină de concentrație 0,4 mg/ml și soluția L-lisină clorhidrat de concentrație 2,5 mg/ml (pentru proba notată **HA-L-lyHCl-GS**);

4) Maturarea suspensiei obținute timp de 24 de ore, la 37 °C, sub agitare;

5) Separarea din suspensie a precipitatului obținut prin filtrare la vid, spălarea acestuia în mod repetat pentru eliminarea compușilor nereacționați și uscarea lui. Spălarea se face cu apă ultra pură pentru a îndepărta NH_4OH rezidual (până când conductivitatea supernatantului are valori apropiate cu cea corespunzătoare apei ultra pure) și cu etanol 96 % pentru a îndepărta H_2O .Uscarea precipitatului obținut se realizează la temperatura de 37 °C, sub vid, timp de 24 h.

În tabelul V.6 se regăsesc exemplificate probele obținute cu concentrațiile aferente în principiile biologic active iar figura V.28 este prezentă schema protocolului de obținere a biocompozitelor.



Probă	Concentrație L-lyHCl (mg/g)	Concentrație GS (mg/ml)
НА	-	-
HA-L-lyHCl	0,83	-
HA-GS	-	0,066
HA-GS conc	-	0,132
HA-L-lyHCl-GS	0,83	0,066
HALL HILCH CE some	0.92	0.122



V.2.2. Caracterizarea structural – morfologică a biocompozitelor

V.2.2.1. Microscopie electronică cu baleiaj, SEM

Imaginile SEM ale biocompozitelor obținute (Figurile V.30 - 32) relevă o structură granulară a probelor. Granulele sunt rezultatul aglomerării de microparticule de dimensiuni nanometrice variabile. Aspectul suprafeței particulelor variază de la foarte neted la rugos. În figura V.30 sunt prezentate imaginile SEM ale pulberii de hidroxiapatită simplă (proba HA) în comparație cu biocompozitul pe bază de hidroxiapatită și L-lisină clorhidrat.



Figura V.30 Imagini SEM ale probelor: a) HA – pulberea de hidroxiapatită simplă; b) HA-L-lyHCl – compozitul hidroxiapatită / L-lisină clorhidrat În figura V.31 sunt prezentate imaginile SEM ale biocompozitelor pe bază de hidroxiapatită și sulfat de gentamicină, probele HA-GS și HA-GS conc.



Figura V.31 Imagini SEM ale compozitelor hidroxiapatită și sulfat de gentamicină: a) proba HA-GS și b) proba HA-GS conc

Ambele compozite expuse în figura V.31 se prezintă sub forma unor agregate globulare neregulate cu aspect poros ce sunt formate din cristale cu dimensiuni nanometrice.

În figura V.32 sunt prezentate imaginile SEM ale compozitelor pe bază de hidroxiapatită cu L-lisină clorhidrat și sulfat de gentamicină, probele HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS conc.



Figura V.32. Imagini SEM ale compozitelor pe bază de hidroxiapatită cu L-lisină clorhidrat și sulfat de gentamicină: a) proba HA-L-lyHCl-GS și b) HA-L-lyHCl-GS conc

În cazul tuturor probelor se poate distinge existența unui sistem de pori inter- și intragranulari, respectiv microporozități (< 10 μ m) care permit difuzia ionilor și a fluidelor corporale și macroporozități (> 10 μ m) ce pot favoriza colonizarea celulară și care dau proprietăți osteoconductive biocompozitelor obținute.

V.2.3. Caracterizarea biologică a biocompozitelor

Experimentele cu culturile celulare C2C12 s-au realizat cu scopul de a se studia procesul de proliferare și atașare celulară pe suprafața biocompozitelor studiate. Pentru testarea biocompatibilității s-a utilizat o linie celulară de celule provenite de la șoarece - C2C12 (ATCC, CRL1772). Aceste celule, în funcție de mediul de cultivare, pot fi diferențiate în osteoblaste sau în mioblaste. Pentru experimentele derulate s-a folosit pasajul 7 a celulelor C2C12. Culturile celulare de C2C12 au fost imersate în mediul DMEM (4500 mg/l glucoză), suplimentat cu 10 % FBS, 0,2 mM acid ascorbic, 1% P/S (100 U/ml pencilină, 10 μ g / ml streptomicină) în condiții standard de cultivare (37 °C, 5 % CO₂ și 95 % umiditate). Biocompozitele sub formă de discuri au fost sterilizate prin imersarea acestora în soluție de etanol 70 %, timp de 24 de ore, după care acestea au fost spălate de trei ori cu soluție tampon fosfat (PBS) și uscate în hotă cu flux laminar. Pentru testele efectuate s-au folosit plăci de cultură de 24 godeuri, iar densitatea celulară pe godeu a fost de 18000 celule. Mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 2 – 3 zile pe toată perioada desfășurării testelor. Fiecare tip de celulă a fost cultivare, iar ca referință s-a utilizat un control pentru fiecare interval de timp. Pentru control, celulele au fost cultivate în prezența fosfaților de calciu în condiții identice ca și probele studiate.

V.2.3.2. Vizualizarea celulelor prin microscopie electronică cu baleiaj

În scopul vizualizării morfologice și structurale a celulelor cultivate pe biocompozite a fost utilizată analiza prin microscopie electronică cu baleiaj. Pregătirea probelor înainte de vizualizarea microscopică necesită parcurgerea următoarelor etape: splălarea probelor cu o soluție de 0,1 M PBS; fixarea chimică a celulelor pe materiale utilizând o soluție de 10 % p-formaldehidă; deshidratarea probelor prin imersarea succesivă a acestora în soluții de etanol de concentrații cuprinse între 70 – 100 %, timp de 30 de minute. Etanolul va înlocui apa din celule și membrana extracelulară; uscarea materialelor utilizând *metoda critical point drying*. Prin această metodă, etanolul din celule este înlocuit cu CO₂ lichid. Această procedură elimină lichidul din probe în totalitate, fără a le expune nici unei forțe de tensiune de suprafață. Pentru deshidratarea probelor prin această metodă s-a utilizat aparatul PELCO CPD2 Critical Point Dryer (Ted Pella Inc.); metalizarea probelor cu aur – probele se pulverizează cu un strat subțire de aur pentru a se putea studia la microscopul SEM. Altfel, apar efecte de polarizare și distrugere locală a suprafeței analizate.

În figura V sunt prezentate imaginile SEM ale compozitelor pe bază de hidroxiapatită și substanțe biologic active pe a cărui substrat au fost cultivate celulele C2C12.



Figura V. Imagini SEM a biocompozitelor pulverulente pe a cărui substrat sunt cultivate celulele C2C12 timp de 7 zile: a) HA-GS; b) HA-L-lyHCl; c) HA-L-lyHCl-GS; d) HA-L-lyHCl-GSconc

Imaginele SEM ale biocompozitelor pe a căror suprafață au fost cultivate celulele C2C12 relevă o bună adeziune și răspândire a celulelor, cu toate că în general, acestea sunt predispuse să adere și să se atașeze mult mai bine pe suprafețele rugoase comparativ cu cele netezi. Apar totuși mici diferențe în ceea ce privește gradul de atașare celulară în funcție de tipul de biocompozit studiat. Majoritatea celulelor cultivate la suprafața biomaterialelor prezintă o morfologie fenotipică acestora: osteoblastele s-au aplatizat sub forma unor configurații poligonale, pe partea dorsală prezentând volane. Celulele sunt bine atașate de substrat prin extensii celulare (filipode).

Așa cum se observă în figura V.a celule cultivate la suprafața substratului biocompozitului HA-GS, sunt mult mai bine repartizate pe suprafața acestuia comparativ cu cele cultivate pe materialul etalon (hidroxiapatita), osteoblastele fiind mai aplatizate și prezentând mai multe extensii citoplasmatice (filipode).

În figura V.b sunt prezentate imaginile SEM ale biocompozitului pe bază de hidroxiapatită și L-lisină clorhidrat (proba HA-L-lyHCl) pe a cărui substrat sunt cultivate celulele C2C12 timp de 7 zile. Din imaginile SEM prezentate în figura V.b, se pot observa modificări în morfologia celulelor și anume apariția unor formațiuni globulare - nodulare care sunt dispuse aleatoriu pe suprafața biocompozitului. Este posibil ca aceste formațiuni nodulare să conțină depuneri de minerale de calciu (carbonat de calciu), ca rezultat al activității celulelor osteoblaste. Acest aspect a fost evidențiat și de Lu și colab. (2003) și respectiv Li și colab. (2005). Acest proces poate fi accelerat și de introducerea în structura hidroxiapatitei a aminoacidului L-lisină clorhidrat.

În figurile V.c și V.d sunt prezentate imaginile SEM ale biocompozitelor pe bază de hidroxiapatită, sulfat de gentamicină și L-lisină clorhidrat pe a cărui substrat sunt cultivate celulele C2C12 timp de 7 zile (probele HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GSconc). Imaginile SEM a biocompozitului HA-L-lyHCl-GS indică cea bună atașare și proliferare celulară. De asemenea, se poate observa cu usurință apariția unui strat uniform și dens de celule, ceea ce poate reprezenta apariția matricei extracelulare generată de activitatea osteoblastelor. În cazul biocompozitului HA-L-lyHCl-GSconc s-a folosit o concentrație mai ridicată de antibiotic comparativ cu compozitul anterior, intenționându-se a se observa dacă o concentrație mai mare de antibiotic poate afecta atașarea, proliferare celulară într-un grad mai redus, fapt ce poate fi datorat fie concentrației prea ridicate de antibiotic, așa cum au mai menționat și alți cercetători (Moskowitz și colab., 2010), fie în urma pregătirii (uscării) probei pentru investigația SEM, datorită vacuum-ului creat de aparatul PELCO CPD2 Critical Point Dryer a avut loc o dezatașare/desprindere a stratului celular de pe suprafața biocompozitului.

V.2.5. Teste de eliberare in vitro a sulfatului de gentamicină din biocompozite

V.2.5.1. Protocol experimental

Procesul de eliberare *in vitro* a sulfatului de gentamicină din biocompozitele obținute s-a studiat în mediu lichid, respectiv în soluție tampon fosfat.

Soluția tampon fosfat (PBS) este o soluție tampon izotonică și netoxică pentru celulele vii, fiind utilizată în cercetarea biologică pentru menținerea pH-ului constant al mediilor biologice. Ea este o soluție salină care conține clorură de sodiu, fosfat de sodiu și, în unele formulări, clorură de potasiu și fosfat de potasiu. Pentru obținerea soluției tampon fosfat cu pH de 7,4 și cu o concentrație de 0,01 M s-au folosit următorii reactivii: NaCl 8,01 g/L; KCl 0,20 g/L; Na₂HPO₄·2 H₂O 1,78 g/L; KH₂PO₄ 0,27

g/L. Sărurile au fost cântărite pe rând și amestecate cu apă bidistilată, sub agitare energică; pH-ul soluției de PBS s-a corectat până la valoarea de 7,4 cu ajutorul unei soluții de HCl. Pentru a putea studia eliberarea controlată a medicamentului din biocompozitele analizate a fost realizată curba de etalonare pentru sulfatul de gentamicină. În vederea realizării curbei de etalonare s-au preparat următoarele soluții:

1) Soluția stoc de sulfat de gentamicină: s-a preparat o soluție de concentrație 4 mg/ml sulfat de gentamicină;

2) Soluții etalon de sulfat de gentamicină: s-au obținut luând anumite volume din soluția stoc care s-au dispersat în câte 25 ml soluție PBS:

Pentru fiecare soluție etalon s-a măsurat absorbanța la lungimea de undă $\lambda = 257$ nm, caracteristică sulfatului de gentamicină. În urma datelor obținute s-a trasat curba de etalonare pentru sulfatul de gentamicină. Prin liniarizarea curbei de etalonare s-a obținut o ecuație de ordinul I care permite calcularea unei concentrații necunoscute de antibiotic dintr-o soluție oarecare: y = 0, 0142 x cu coeficientul de corelare R² = 0, 9489.

Eliberarea de medicament in vitro:

Experimentele au fost efectuate în soluție 0,01 M tampon fosfat PBS (pH = 7,4), utilizat ca mediu de eliberare. Astfel, fiecare probă cu o greutate de aproximativ 2 g a fost introdusă într-un flacon care conține 25 ml de tampon fosfat PBS. Flaconul a fost menținut la 37 °C într-o baie de apă termostată. La intervale de timp predeterminate, 3 ml de mediu de eliberare (soluție PBS) a fost evaluat pentru conținutul său de medicament cu ajutorul unui spectrofotometru de tip Thermo Scientific Helios Epsilon UV-Vis spectrophotometer (Thermo Electron Co, SUA) la $\lambda_{max} = 257$ nm. Fiecare probă a fost înlocuită cu același volum de tampon fosfat PBS la pH = 7,4 pentru a menține volumul constant și starea inițială a soluției. Concentrația medicamentului în soluție a fost calculată folosind curba etalon a sulfatului de gentamicină în apă distilată. Cantitatea cumulativă de medicament sau *cedarea cumulativă* (R%), eliberată la un moment dat din eșantioanele compozite a fost calculată conform următoarei ecuații:

$$R\% = \frac{M_o - M_t}{M_o} \cdot 100 \tag{V.11}$$

unde: M_t = cantitatea cumulativă de medicament eliberat la momentul t (mg/g);

 M_o = cantitatea inițială de medicament din eșantionul de biocompozit (mg/g).

V.2.5.2. Profilul eliberării sulfatului de gentamicină din biocompozite

Profilul eliberării cumulative a sulfatului de gentamicină din biocompozitele studiate (probele HA-GS, HA-GS-conc, HA-L-lyHCl-GS şi HA-L-lyHCl-GS-conc) se prezintă în figura V.48. Studiind alura graficelor se observă faptul că probele de HA-GS-conc şi HA-L-lyHCl-GS-conc eliberează medicamentul mai rapid decât probele HA-GS şi HA-L-lyHCl-GS în primele 10 de ore de imersie în soluție PBS.

De asemenea, se constată că probele compozite în care s-a introdus L-lisina clorhidrat (probele HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS-conc) asigură o cedare a sulfatului de gentamicină în procent mai mare comparativ cu probele în care medicamentul este înglobat doar în hidroxiapatită (probele HA-GS și HA-GS-conc). Astfel, după 120 ore de imersie în soluție PBS se constată o rată de eliberare a medicamentului de 71,49 % și 76,13 % pentru probele HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS și 68,18 % pentru probele probele HA-GS și HA-GS-conc. Aceste rezultate s-ar putea datora următoarelor motive: mărimea cristalelor de medicament descrește, matricea are efect de solubilizare, cristalele de medicament nu sunt agregate, deci umectarea și dispersabilitatea medicamentului a fost îmbunătățită.

Cel mai probabil, mecanismul pentru eliberarea sulfatului de gentamicină în studiul de față ar putea fi datorat unei reduceri a mărimii particulelor de medicament deoarece cristalele de hidroxiapatită au o suprafață mare (fapt demonstrat în urma analizelor BET) și adsorb molecule de medicament, favorizând astfel dispersia medicamentului.



Figura V.48. Profilul eliberării cumulative a sulfatului de gentamicină din probele: HA-GS, HA-GS-conc, HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS-conc

În probele în care s-a introdus și L-lisina clorhidrat dispersia cristalelor apatitice este mult mai mare, favorizând o și mai bună dispersie a medicamentului în sistem. Prin urmare, când compozitul este introdus în mediul de dizolvare (soluția PBS), mult mai multe molecule de medicament sunt expuse mediului de dizolvare, provocând astfel o dizolvare rapidă și o rată

de eliberare mai mare. Se poate presupune că influența asupra profilului de dizolvare a sulfatului de gentamicină are la bază hidratarea optimă a hidroxiapatitei și L-lisinei în mediul de dizolvare PBS, proprietate care a facilitat difuzia și în consecință cedarea medicamentului din compozit.

Cinetica procesului de eliberare a medicamentului

Eliberarea sulfatului de gentamicină din compozitele apatitice studiate s-a studiat pe baza modelelor cinetice de ordin zero, de ordin 1, Higuchi și Korsmeyer-Peppas. Pentru a stabili cinetica și mecanismul cedării principiului activ este necesar să se calculeze coeficienții de corelare R^2 pentru ecuațiile modelelor matematice amintite anterior. Modelul cu coeficientul de corelare cel mai mare va fi considerat ca fiind cel mai potrivit pentru sistemul analizat.

În tabelul V.11 se prezintă valorile coeficienților de corelare R^2 obținuți pentru modelele cinetice de ordin zero, de ordin 1, Higuchi și Korsmeyer-Peppas, privind eliberarea sulfatului de gentamicină din compozitele studiate (probele HA-GS, HA-GS-conc, HA-L-lyHCl-GS și HA-L-lyHCl-GS-conc).

Conform datelor prezentate în tabelul V.11, comparând valorile coeficientului de corelație se poate concluziona faptul că eliberarea sulfatului de gentamicină din compozitele analizate se pare că urmează o cinetică de eliberare după modelul cinetic de ordin 1, pentru toate cele patru compozite studiate. În plus, se observă că s-au obținut valori foarte mari ale coeficientului de corelație corespunzând modelului Higuchi, pentru toate cele patru compozite. Prin urmare, se poate afirma că în procesul de eliberare a medicamentului din compozite sunt implicate mecanisme complexe, influențate de diverși factori, ce combină modelele de ordin 1 și Higuchi.

 Tabelul V.11. Valorile parametrilor ecuațiilor matematice corespunzătoare modelelor cinetice aplicate eliberării sulfatului de gentamicină din compozitele apatitice studiate

Modelul	Parametrii	Proba						
cinetic	modelului	HA-GS	HA-GS-conc	HA-L-lyHCl-GS	HA-L-lyHCl-GS-conc			
ordin zero	\mathbf{k}_0	0,578	0,748	0,806	0,867			
	R^2	0,9668	0,9731	0,9842	0,9649			
ordin 1	k ₁	0,0062181	0,0094423	0,0101332	0,0119756			
	R^2	0,9831	0,9952	0,9990	0,9974			
Higuchi	k _H	6,269	8,134	8,703	9,491			
	R^2	0,9790	0,9894	0,9871	0,9940			
Korsmeyer-	k_{KP}	1,085	1,340	1,064	1,097			
Peppas	R^2	0,7201	0,8660	0,6756	0,7026			

Rezultatele obținute demonstrează că matricea de tip hidroxiapatită poate fi folosită ca un vehicul - transportor sau sistem rezervor pentru eliberarea controlată a sulfatului de gentamicină în aplicațiile medicale topice (locale).

Experimentele au arătat că nu s-au înregistrat modificări majore ale profilului de cedare a medicamentului din compozitele analizate pe o perioadă de 1 săptămână, ceea ce sugerează faptul că aceste compozite pot conferi efecte terapeutice optime datorită cedării locale controlate. Aceasta conduce la o creștere a eficienței și complianței, pe lângă stabilitatea crescută a formulărilor topice experimentate.

Capitolul VI. MATERIALE APATITICE CU APLICAȚII ÎN PROTECȚIA MEDIULUI

Prezentul capitol are ca obiectiv principal studiul experimental al procesului de adsorbție a colorantului reactiv Reactive Blue 204 (RB 204) pe hidroxiapatită drept material adsorbant, cu scopul aplicării în procesul de epurare a apelor reziduale ce conțin acest colorant.

Studiile au vizat:

 \triangleright *Optimizarea condițiilor experimentale privind procesul de adsorbție*. S-a urmărit influența parametrilor de adsorbție (timpul de contact, pH, concentrația soluțiilor de colorant, temperatura și cantitatea de adsorbant) asupra procesului de adsorbție. Curbele de variație ale eficienței procesului de adsorbție obținute au stat la baza selectării parametrilor optimi. Eficiența adsorbției (R%) s-a calculat pe baza concentrațiilor inițiale (C_i) și de la un anumit timp (C_t) ale colorantului Reactive Blue 204 din soluție, conform relației:

$$R\% = \frac{c_i \ c_i}{c_i} .100$$
(VI.1)

Studiul cineticii proceselor de adsorbție. Pentru studiul cinetic s-au utilizat parametrii procesului de adsorbție optimizați anterior; s-au efectuat experimente de adsorbție pe soluții de concentrații de 20 mg/L pentru RB 204, în intervalul de timp de adsorbție de 0,5 - 24 ore. Modelele cinetice utilizate au fost: modelul cinetic de ordin pseudo I, modelul cinetic de ordin pseudo II și modelul difuziei interparticule.

Studii de desorbție. Pentru elucidarea naturii procesului de adsorbție și respectiv pentru evaluarea posibilității de reutilizare a adsorbantului și recuperare a colorantului

VI.2. Studiul proprietăților de adsorbție ale hidroxiapatitei

Pentru studiile abordate în cadrul acestui capitol s-au ales probele: hidroxiapatita *necalcinată* (proba notată HA-N) și hidroxiapatita *calcinată* (proba notată HA-C), probe obținute în cadrul subcapitolului IV.1 (*Sinteza hidroxiapatitei*).

În urma analizelor structurale și morfologice a materialelor adsorbante (studii ce au fost realizate în capitolul IV), s-a concluzionat că materialele HA-N și HA-C posedă următoarele caracteristici: proba necalcinată HA-N are o structură cristalin – amorfă, iar proba calcinată HA-C prezintă o structură înalt cristalină; diametrul mediu al porilor obținut pentru probele HA-N și HA-C este de 1,159 și respectiv 1,060 nm; proba necalcinată HA-N posedă o suprafață specifică mai mare comparativ cu proba calcinată HA-C, cu valori de 325 m²/g, și respectiv 69 m²/g; ambele materiale adsorbante prezintă o textură microporoasă (diametrul porilor < 2 nm) și mezoporoasă (diametrul porilor de 2 - 10 nm); punctul de sarcină electrică zero (pH_{pzc}) pentru probele HA-N și HA-C s-a identificat a fi 7,5 și respectiv 7,9.

Studiile de adsorbție s-au realizat în regim static, în vase deschise și sub agitare folosind un agitator orbital la turația 200 rpm, la temperatură ambientală (20 °C). Au fost utilizate ape uzate sintetice monocomponent cu un conținut inițial de colorant RB 204 în domeniul de concentrație de 2,5 - 30 mg/L. Concentrația de colorant RB 204 din soluție s-a analizat prin spectroscopie UV -Vis folosind un Spectrofotometru UV-Vis Jasco V-550 la lungimea de undă λ = 636 nm, caracteristică colorantului (Ciobanu & <u>Ilisei</u>, 2013; <u>Ilisei</u> și colab., 2012^a). Analiza cantitativă se bazează pe folosirea curbei de etalonare a colorantului, curbă care se trasează cu ajutorul standardelor preparate din soluția stoc de colorant. În vederea realizării curbei de etalonare s-au preparat următoarele soluții:

1) Soluția stoc de colorant RB 204: s-a preparat o soluție de concentrație 30 mg/L colorant;

2) Soluții etalon de colorant RB 204: s-au obținut luând anumite volume din soluția stoc care s-au dispersat în câte 25 ml apă demineralizată.

Pentru fiecare soluție etalon s-a măsurat absorbanța la lungimea de undă $\lambda = 636$ nm, caracteristică colorantului RB 204. În urma datelor obținute s-a trasat curba de etalonare pentru colorantul RB 204. Prin liniarizarea curbei de etalonare s-a obținut o ecuație de ordinul I care permite calcularea unei concentrații necunoscute de colorant dintr-o soluție oarecare: y = 0, 0246 x cu coeficientul de corelare R² = 0, 9999.

VI.2.1. Influența parametrilor de adsorbție asupra procesului de adsorbție

VI.2.1.1. Studiul influenței pH-ului soluției de colorant

Pentru a analiza efectul pH-lui asupra capacității de reținere a colorantului Reactive Blue 204 pe hidroxiapatită, experimentele au fost realizate pentru diferite valori inițiale de pH cuprinse între 2 și 13. Ajustarea pH-ului s-a realizat cu soluții de NaOH (0,1 M) și HCl (0,1 M). Soluția de colorant RB 204 cu o anumită concentrație ($C_i = 10 \text{ mg/L}$) și cu un anumit volum (50 ml) s-a pus în contact cu o cantitate bine definită de hidroxiapatită (0,5 g), timp de 24 h, la temperatura ambientală. Rezultatele procesului de adsorbție pe hidroxiapatita *necalcinată* (HA-N) și *calcinată* (HA-C) se prezintă în figura VI.2.





Din figura VI.2 se poate observa că pH-ul influențează cantitatea de colorant reținută pe adsorbant și totodată, eficiența procesului de adsorbție. Randamentul procesului de adsorbție are valori ridicate în mediul acid, scăzând apoi cu cu creșterea bazicitatea soluției.

Acest comportament se explică prin faptul că în cazul de față colorantul RB 204 în apă ionizează grupările sulfonice prezente în structura colorantului joacă rolul principal în creșterea eficienței procesului de adsorbție. De asemenea, în condiții de pH acid suprafața adsorbantului (hidroxiapatita) se încarcă pozitiv datorită creșterii concentrației ionilor de H⁺, forțele de atracției electrostatice devenind mai puternice (Jaikumar et al., 2009). Conform literaturii de specialitate, în mediu acid suprafața hidroxiapatitei este încarcată cu un număr mare de ioni de H⁺, astfel că ea capătă caracter pozitiv (Bengtsson & Sjöberg, 2009). Prin urmare, în medii acide, adsorbția ajunge la randamente maxime deoarece sunt exercitate forțe de atracție electrostatice între molecula de colorant și suprafața apatitică. Cu cât crește bazicitatea mediului cu atât suprafața apatitică este încărcată cu un număr mare de ioni OH⁻, forțele de respingere între colorantul anionic și hidroxiapatită devenind puternice și astfel scade randamentul procesului de adsorbție. Așa cum s-a demonstrat în paragraful IV.2.5 (Determinarea punctul de sarcină electrică zero), punctul de sarcină electrică zero (pH_{pzc}) pentru probele HA-N și HA-C are valoarea 7,5 și respectiv 7,9. Datele obținute indică faptul că suprafețele materialelor apatitice obținute (probele HA-N și HA-C) se încarcă pozitiv la $pH < pH_{pzc}=7,5$ sau 7,9 și negativ $pH > pH_{pzc}=7,5$ sau 7,9. Acest lucru ar putea fi o proprietate favorabilă pentru adsorbția colorantului Reactive blue 204 la pH < 6. În urma studiului s-a observat că: cantitatea minimă de colorant adsorbit a fost determinată la pH = 13, valoare ce a crescut la 347,3107 mg/g pentru HA-C și respectiv 454,0914 mg/g pentru HA-N, cu scăderea pH-ului până la valoarea de 3. Datele experimentale au indicat faptul că pH-ul soluției exercită o influență puternică asupra îndepărtării colorantului din soluție datorită influenței proprietăților suprafeței hidroxiapatitei și totodată datorită ionizării și disocierii moleculei de colorant.

VI.2.1.2. Studiul influenței cantității de adsorbant

În scopul cercetării influenței cantității de adsorbant asupra eficienței procesului de adsorbție a colorantului, experimentele au fost realizate în următoarele condiții: soluția de colorant de concentrație inițială de 10 mg/L, la pH = 3, iar cantitatea de adsorbant variind între 2 și 20 g/L. Figura VI.3 prezintă rezultatele obținute la echilibru pentru adsorbția colorantului RB 204 pe hidroxiapatita *necalcinată* (HA-N) și *calcinată* (HA-C), în prezență de diferite cantități de adsorbant.



Figura VI.3. Influența cantității de adsorbant asupra procesului de adsorbție (C_i = 10 mg/L; C_{adsorbant} = 10 g/L) (Ciobanu & <u>Ilisei</u>, 2013)

Pentru cantități de adsorbant mai mari de 6 g/L se realizează un echilibru între concentrația soluției de colorant de la suprafața adsorbantului și concentrația de colorant din soluție (Jaikumar și colab., 2009). Acest rezultat poate fi explicat prin modificări ale gradientului de concentrație între colorantul ce se găsește în soluție și suprafața adsorbantului (Wawrzkiewicz & Hubicki, 2010). Procentul de colorant îndepărtat variază foarte puțin începând cu valoare de 10 g/L pentru **HA-**C și **HA-**N. Creșterea randamentului procesului de adsorbție odată cu creșterea cantității de adsorbant poate fi atribuită creșterii suprafeței specifice și totodată a numărului de centri de adsorbție disponibili (Malakootian și colab., 2011).

VI.2.1.3. Studiul influenței concentrației colorantului

Studiile privind adsorbția colorantului RB 204 utilizând drept adsorbant hidroxiapatita *necalcinată* (HA-N) și *calcinată* (HA-C) s-au realizat folosind soluții de colorant cu concentrații cuprinse între 2,5 - 25 mg/L (la pH = 3). Cantitatea de adsorbant (HA-C și HA-N) folosită a fost de 10 g/L, iar temperatura menținută la 20°C. Efectul concentrației ințiale a soluției de colorant este ilustrată în figura VI.4.



După cum se poate observă în figura VI.4, capacitatea de reținere a adsorbantului este dependentă de concentrația colorantului. Concentrația de echilibru a colorantului **RB 204**, s-a identificat a fi de **20 mg/L**, cu o capacitate de adsorbție a **HA-**C de **906,3876 mg/g** iar pentru **HA-**N de **1050,0589 mg/g**.

VI.2.1.4. Studiul influenței temperaturii

Stabilirea temperaturii optime pentru procesul de adsorbție a colorantului RB 204 pe hidroxiapatita *necalcinată* (HA-N) și *calcinată* (HA-C) s-a realizat pe palierul de temperatură cuprins între 10 - 60 °C, în decursul a 24 de ore de adsorbție. Concentrația inițială de colorant **RB 204** este de 20 mg/L la un pH = 3. Efectul temperaturii asupra procesului de adsorbție este ilustrat în figura VI.5. Din figura VI.5 se poate observa că odată cu creșterea temperaturii scade capacitatea de adsorbție a materialelor. Temperatura optimă de adsorbție este cea de 20 °C.



Figura VI.5. Influența temperaturii asupra procesului de adsorbție $(C_i = 20 \text{ mg/L}; C_{adsorbant} = 10 \text{ g/L}, \text{pH} = 3)$ (Ciobanu & <u>Ilisei</u>, 2013)

Putem spune că procesul de adsorbție a colorantului RB 204 pe adsorbantul HA (sub formă calcinată și necalcinată) este un proces economic, deoarece nu necesită un consum mare de energie electrică / termică, procesul deșfăsurându-se cu randamente maxime în condiții ambientale, la o temperatură de 20 °C.

VI.3. Studiul cinetic al procesului de adsorbție

Prin studiul cinetic al proceselor de pe interfața solid / lichid s-a urmărit elucidarea mecanismului de reacție pentru identificarea etapei determinante de viteză. Adsorbția colorantului a fost studiată pentru ambii adsorbanți, hidroxiapatita *necalcinată* (**HA-N**) și *calcinată* (**HA-C**), în funcție de timpul de contact pentru a determina timpul necesar pentru a se atinge echilibru de adsorbție.

În figura VI.6 este reprezentată variația cantității de colorant adsorbită (q) funcție de timp (t), pentru o concentrație inițială a colorantului RB 204 de 20 mg/L pe hidroxiapatita *necalcinată* (HA-N) și *calcinată* (HA-C). Din figura VI.6 se observă că, inițial, procesul de adsorbție este rapid, devenind progresiv mai lent odată cu creșterea timpului de contact, echilibrul de adsorbție fiind atins, după 3 ore de contact.



Procesele de adsorbție la interfața lichid-solid sunt mai frecvent afectate de difuzia prin stratul limită, de transfer de masă extern, și de difuzia interparticulă. Pentru a stabili etapa care controlează procesul de adsorbție au fost folosite pentru analiza datelor trei modele cinetice.

Modelele cinetice de ordin pseudo I (modelul Lagergren) și de ordin pseudo II (modelul Ho) au fost folosite pe scară largă pentru a prezice cinetica procesului de adsorbție. Ecuația cinetică de ordin pseudo I se aplică în general pentru faza inițială a proceselor de adsorbție, în timp ce ecuația cinetică de ordin pseudo II prezice comportamentul pe întregul domeniu de adsorbție. Aceste două modele au fost folosite în acest studiu pentru a se evalua datele experimentale (Hammed și colab., 2008; Vijayaraghavan &Yun, 2008; Mathialagan & Viraraghavan, 2009; Navadala și colab., 2009). Valorile rezultatelor obținute pentru q_e în cazul modelului cinetic de ordin pseudo II sunt mai apropiate de rezultatele experimentale decât valorile lui q_e obținute în urma aplicării modelului Lagergeren (Tabelul VI.1). Valorile mai ridicate pentru R^2 , obținute pentru modelul cinetic de ordin pseudo II (Lagergren) și modelul cinetic de ordin pseudo II (Ho) nu pot identifica mecanismul de difuzie. Prin urmare, rezultatele cinetice au fost analizate și prin utilizarea modelului de difuzie interparticule.

Tabelul VI.1. Valorile parametrilor cinetici obținuți pentru modele cinetice studiate în cazul adsorbției colorantului RB 204pe hidroxiapatita necalcinată (HA-N) și calcinată (HA-C)

Colorant	Adsorbant	Modelul cinetic de ordin pseudo II			Modelul cinetic de ordin pseudo I	Modelul difuziei interparticule
		R ²	q _e (mg/g)	k ₂	\mathbb{R}^2	\mathbb{R}^2
Reactive	HAN	0,9991	1111,11	2,8027*10 ⁻⁵	0,9883	0,9008
Blue 204	HA C	0,9969	1000,00	1,773*10 ⁻⁸	0,9813	0,9628

Datele cinetice obținute *se pliază cel mai bine pe modelul cinetic de ordin pseudo II*, model pentru care s-au obținut cei mai buni coeficienți de corelare. În urma analizei procesului de adsorbție s-a constatat că hidroxiapatita sub formă necalcinată dă randamente superioare hidroxiapatitei calcinate. Acest aspect poate fi explicat prin faptul că hidroxiapatita necalcinată posedă o suprafața specifică mai mare comparativ cu cea calcinată, prin calcinare suprafața specifică a materialului scăzând. Datorită acestor considerente s-a ales drept material optim pentru adsorbția colorantului RB 204 din apele industriale hidroxiapatita necalcinată. Din acest motiv, studiul desorbției colorantului RB 204 s-a realizat utilizând hidroxiapatita necalcinată.

Capitolul VII. CONCLUZII GENERALE

Cercetările efectuate în cadrul acestei teze s-au axat pe 3 direcții principale:

I. Obținerea de biocompozite poroase pe bază de hidroxiapatită / poliuretan / substanțe biologic active (vitamina A, vitamina D, vitamina B, nanoparticule de argint);

II. Obținerea de biocompozite pulverulente pe bază de hidroxiapatită / substanțe biologic active (L-lisină clorhidrat, sulfat de gentamicină);

III. Utilizarea hidroxiapatitei drept material adsorbant, cu scopul aplicării în procesul de epurare a apelor reziduale ce conțin coloranți textili.

Concluziile care se desprind în urma cercetărilor realizate sunt următoarele:

1. S-a obținut hidroxiapatită cu dimensiuni nanometrice, sub formă de pulbere cristalină și de puritate ridicată, aplicând metoda precipitării chimice din soluție. Condițiile optime de sinteză s-au identificat a fi: $pH \ge 10$ pentru mediul de sinteză, temperatura de maturare $T_m = 60$ °C, timpul de maturare $t_m = 24$ h și temperatura de calcinare $T_c = 850$ °C (în cazul obținerii de hidoxiapatită în formă calcinată).

2. S-a studiat influența anumitor parametrii de sinteză (prepararea gelului de sinteză, maturarea gelului de sinteză, influența pH-ului, influența temperaturii de maturare, influența timpului de maturare, influența temperaturii de calcinare) asupra caracteristicilor nanoparticulelor, cu scopul de a optimiza procedeul de sinteză. Morfologia cristalelor apatitice, apreciată prin intermediul microscopiei electronice cu baleiaj (SEM), depinde de compoziția gelului de sinteză și de parametrii operaționali.

3. Metoda de obținere abordată are ca rezultat sinteza de hidroxiapatită cu dimensiunea particulelor de ordin nanometric, sub 70 nm. Forma predominantă a nanoparticulelor este cea de prismă hexagonală, cu tendință de grupare în mănunchiuri sau sferulite.

4. Conform datelor rezultate din spectrele de raze X de dispersie SEM-EDX ale probelor de hidroxiapatită s-a putut identifica valorile rapoartelor molare Ca/P pentru hidroxiapatita necalcinată (proba HA-N) ca fiind 1,682 și respectiv pentru hidroxiapatita calcinată (proba HA-C) ca fiind 1,665, rapoartele obținute fiind conforme cu cele existente în literatura de specialitate.

5. Suprafață specifică a probei necalcinate, HA-N și a celei calcinate, HA-C, identificată prin analiza BET, are valori de 325 m^2/g , și respectiv 69 m^2/g , caracteristici care s-au dovedit a fi favorabile în scopul utilizării materialelor apatitice sintetizate în procesul de adsorbție a colorantului Reactive Blue 204 din soluții apoase.

6. Datele obținute în urma determinării punctul de sarcină electrică zero (pHpzc) pentru probele HA-N și HA-C indică faptul că suprafețele materialelor apatitice obținute se încarcă pozitiv la pH < pHpzc=7,5 sau 7,9 și negativ pH > pHpzc=7,5 sau 7,9. Acest lucru a constituit o proprietate favorabilă în utilizarea materialelor apatitice sintetizate în scopul adsorbției de coloranți anionici din soluții apoase.

7. **Biocompozite poroase pe bază de hidroxiapatită și poliuretan** au fost obținute prin tehnica biomimetică, tehnica care implică utilizarea a 2 soluții biomimetice, SBF și SCS. S-a testat eficiența acestora în ceea ce privește timpul de depunere a cristalelor apatitice pe suportul poliuretanic cât și uniformitatea stratului depus. Soluția calcică suprasaturată (SCS) s-a dovedit a fi mai eficientă, întrucât cristalele de hidroxiapatită s-au depus într-un strat uniform pe suprafață cât și în porii interconectați ai matricei poliuretanice pe o perioadă de timp mult mai redusă.

8. Biocompozitele poroase pe bază de hidroxiapatită, poliuretan și vitamine. Prezența vitaminelor A, D_2 și B_6 în compoziția soluțiilor biomimetice duce la înjumătățirea timpului de depunere a stratului apatitic. Înglobarea principiilor active, precum vitamina A, vitamina D_2 , vitamina B_6 în stratul apatitic a avut ca scop îmbunătățirea bioactivității (aspect dovedit de testele *in vitro* pe culturi celulare) cât și inducerea unor proprietăți specifice biomaterialelor compozite.

9. **Biocompozitele poroase pe bază de hidroxiapatită, poliuretan și nanoparticule de Ag** s-au obținut printr-o metodă ce implică depunerea biomimetică a hidroxiapatitei, metodă care ulterior este combinată cu un proces de reducere și respectiv un proces de cristalizare a ionilor de argint *in - situ* pe suprafața polimerică. Această metoda de obținere propusă poate reprezenta o potențială metodă "verde" pentru producerea de nanoparticule Ag depuse pe matricile poroase poliuretanice acoperite cu strat de hidroxiapatită, fără implicarea de substanțe chimice toxice și radiații. Comparativ cu alte metode, această metodă propusă, în premieră, este mai simplă și nu necesită condiții experimentale severe.

10. Studiile structurale au relevat formarea de aglomerări sferice cristaline cu diferite dimensiuni între 70 nm și 150 nm, care conțin nanoparticule de Ag cu dimensiunea medie de 34,71 nm.

11. S-a identificat că efectul antibacterian al biocompozitelor pe bază de hidroxiapatită, poliuretan și nanoparticule de argint asupra bacteriilor *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* au atins valori ridicate de până la 94,3 % și respectiv 92,5 %.

12. Biocompozite pulverulente pe bază de hidroxiapatită și principii active (sulfat de gentamicină, L-lisină clorhidrat), obținute prin procese de coprecipitare chimică pe cale umedă

conțin un sistem de pori inter- și intragranulari, respectiv microporozități (< 10 μ m) care permit difuzia ionilor și a fluidelor corporale și macroporozități (> 10 μ m) care s-au dovedit în urma testărilor *biologice in vitro* a favoriza proliferarea celulară și a induce proprietăți osteoconductive biocompozitelor obținute.

13. Testele de eliberare *in vitro* a sulfatului de gentamicină demonstrează că matricea de tip hidroxiapatită poate fi folosită ca un vehicul - transportor pentru eliberarea controlată a sulfatului de gentamicină în aplicațiile medicale topice (locale). Experimentele au arătat că nu

s-au înregistrat modificări majore ale profilului de cedare a medicamentului din compozitele analizate pe o perioadă de 1 săptămână, ceea ce sugerează faptul că aceste compozite pot conferi efecte terapeutice optime datorită cedării locale controlate.

14. Datele de biocompatibilitate ale biocompozitelor pulverulente pe bază de hidroxiapatită și principii active au pus în evidență faptul că nanoparticulele sintetizate nu determină efecte citotoxice în mediu de cultură, si mai mult decât atât determină creșterea și proliferarea celulară. Probele HA-L-lyHCl-GS prezentând o viabilitate mult mai ridicată (***p < 0,001 conform analizei statistice ANOVA uni-factorial). Viabilitatea probelor este cu precădere ridicată pentru probele care conțin HA-L-lyHCl-GS datorită existenței aminoacidului și respectiv a cantității reduse (adecvate) de antibiotic sau datorită proprietăților fizico-chimice.

15. Testarea activității antimicrobiane a biocompozitelor în a căror structură este încorporat sulfatul de gentamicină, pe microorganismele patogene, *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* le-a identificat a fi catalogate drept "Sensibile" în cazul tuturor biocompozitelor ce conțin sulfat de gentamicină înglobat, ceea ce denotă că biocompozitele se pot utiliza în scopul prefevenirii și tratării infecțiilor ce pot sa apară la nivelul țesutului osos.

16. S-a testat eficiența hidroxiapatitei sub formă de pulbere nanometrică, cristalină obținută prin coprecipitare chimică pe cale umedă în procesul de adsorbție a unui colorant textil, Reactive Blue 204 din soluție apoasă. S-a identificat condițiile optime de lucru pentru ca procesul de adsorbție a colorantului textil să se deșfășoare cu randamente maxime, ca fiind următoarele: Ccolorant = 20 mg/L; Cadsorbant = 10 g/L, pH = 3, T = $20 \degree$ C.

17. În urma studiilor de adsorbție realizate în regim static s-a dovedit că hidroxiapatita necalcinată are o capacitate de adsorbție superioară comparativ cu hidroxiapatita calcinată. Acest aspect poate fi explicat prin faptul că hidroxiapatita necalcinată posedă o suprafața specifică mai mare comparativ cu cea calcinată, prin calcinare suprafața specifică a materialului scăzând.

18. Studiul cinetic al procesului de adsorbție cât și studiul procesului de desorbție sugerează faptul că colorantul RB 204 este adsorbit de materialul adsorbant, hidroxiapatită, printr-un proces de atracție electrostatică.

Bazându-ne pe experimentele proprii și pe rezultatele expuse în studiile experimentale se poate afirma că materiale pe bază de hidroxiapatită pot fi utilizate atât în medicina regenerativă osoasă în scopul tratării afecțiunilor specifice țesutului osos cât și în protecția mediului în tratarea apelor reziduale, ce conțin poluanți anorganici și organici.

Contribuțiile originale ale activității de cercetare din cadrul doctoraturii au fost valorificate prin diseminarea rezultatelor în 10 lucrări științice (dintre care 6 lucrări publicate în reviste cotate ISI, 2 în reviste BDI și 2 lucrări publicate în volumele simpozioanelor) și respectiv prin participarea la 10 manifestări științifice (naționale și internaționale).



REFERINȚE BIBLIOGRAFICE (selecție)

- Alkan M., Doğan M., Cakir U., *Electrokinetic properties of perlite* Journal of Colloid and Interface Science, 1997, 192 (1): 114-118.
- Alkan M., Doğan M, Surface titrations of perlite suspensions, Journal of Colloid and Interface Science, 1998, 207 (1): 90-96.
- Arumugam S.K., Sastry T.P., Sreedhar S.B., Mandal A.S., Journal of Biomedical Material Research, 2010, 80A: 391.
- Basak S.C., Kumar K.S., Ramalingam M., *Design and release characteristics of sustained release tablet containing metformin,* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 44 (3): 477-483.
- Bengtsson Å., Sjöberg S., Surface complexation and proton-promoted dissolution in aqueous apatite systems, Pure and Applied Chemistry, 2009, 81: 1569–1584.
- Ciobanu G., <u>Ilisei S.</u>, Luca C., Carja G., Ciobanu O., *The effect of vitamins to hydroxyapatite growth on porous polyurethane substrate*, Progress in organic coatings, 2012^a, 74 (4): 648-65374.
- Ciobanu G., Luca C., <u>Ilisei S.</u>, Luca A.C., *New polyurethane hydroxyapatite composites membranes*, Environmental Engineering and Management Journal, 2012^b, 11(2): 291- 29511.
- Ciobanu G., <u>Ilisei S</u>, Harja M., Luca C., *Removal of Reactive Blue 204 Dye from Aqueous Solutions by Adsorption Onto Nanohydroxyapatite*, Science of Advanced Materials, 2013^a, 5 (8): 1090-1096.
- Ciobanu G., <u>Ilisei S.</u>, Luca C., *Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold*, Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications, trimisă la publicare, 2013^b.
- Costa P., Lobo J.M.S., *Modelling and comparison of dissolution profiles*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 13: 123 133.
- Dash S., Murthy P.N., Nath L., Chowdhury P., *Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems*, Acta Poloniae Pharmaceutica N Drug Research, 2010, 67 (3): 217-223.
- Dong ZH., Li Y., Zou Q., Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering, Journal of Applied Surface Science, 2009, 255: 6087–6091.
- Elliott J.C., Holcom D.W., Young R.A., *Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel*, Calcified Tissue International, 1985, 37: 372–375.
- Fayaz A.M., Balaji K., Kalaichelvan P.T., Venkatesan R., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 74: 123.

Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2000, 52: 662.

- Garcia-Pacios V., Costa V, Colera M., Martin-Martinez J.M., *Waterborne polyurethane dispersions obtained with polycarbonate of hexanediol intended for use as coatings*, Journal of Progress in Organic Coatings, 2011, 71: 136–146.
- Hammed B.H., *Removal of cationic dyes from aqueous solutions using jack fruit peel as non-conventional low-cost adsorbent*, Journal of Hazardous Materials, 2009, 162: 344-350.
- Ilisei S., Bargan A., Ciobanu G., Luca C., *Synthesis and characterization of nanohydroxyapatite powders*, Buletinul Institutului Politehnic din Iași, Secția Chimie și Inginerie chimică, Tomul LVIII (LXII), Fasc. 1, 2012^a, 229-234.
- Ilisei S., Ciobanu G., Luca C., Comparative study about biomimetic mehods used in hydroxyapatite crystals growth on the polymeric surface, Buletinul Institutului Politehnic din Iași, Secția Chimie și Inginerie chimică, Tomul LVII, Fasc. 1, 2012^b, 117-125.
- Ilisei S., Ciobanu G., Luca C., Pyridoxine Incorporated in Hydroxyapatite / Polyurethane Composites, Materiale Plastice, 2012^c, 49 (4): 285-287.
- Jaikumar V., Sathish Kumar K., Gnana Prakash D., Sorption of acid dyes using spent brewery grains: Characterization and modeling, International Journal of Applied Science and Engineering, 2009, 7: 115-125.
- Jia Y.F., Xiao B., Thomas K.M., Adsorption of Metal Ions on Nitrogen Surface Functional Groups in Activated Carbons, Langmuir, 2001, 18: 470 478.
- Komath M., Varma H.K., *Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications*, Bulletin of Materials Science, 2003, 4: 415-422.
- Li Z., Ramay H.R., Hauch K.D., XiaD., ZhangM., Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials, 2005, (26): 3919-3928.
- Lu H.H., El-Amin S.F., Scott K.D., Laurencin C.T., *Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro, Journal Biomedical Materials, 2003, (64A): 465 474.*
- Majeed Khana M.A., Kumar S., Ahamed M., Alrokayan S.A., Alsalhi M.S., Alhoshan M., Aldwayyan A.S., Applied Surface Science, 2011, 257: 10607.
- Malakootian M., Moosazadeh M., Zousefi N., Fatehizadeh A., *Flouride removal from aqueous solutions by pumice: case study* on Kuhbonan water, African of Environmental Science and Technology, 2011, 5: 299-306.
- Manna S., Batabyal S.K., Nandi A.K., The Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110: 12318.
- Mathialagan T., Viraraghavan T., Sorption of Pentachlorophenol from Aqueous Solutions by a Fungal Biomas, Bioresource Technology, 2012, 100: 549-558.

- Moskowitz J.S., Blaisse M.R., Samuel R.E., Hsu H.P., Harris M.B., Martin S.D., Lee J.C., Spector M.C., Hammonda P.T., *The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of Staphylococcusaureus infection in a rabbit bone model*, Biomaterials, 2010, (31): 6019 6030.
- Nathanael A.J., Mangalaraj D., YI J., Morphological Variations of Hydroxyapatite Nanostructures by Different Synthesis Methods, Advanced Materials Research, 2010, 123 (125): 335 338.
- Nadavala S.K., Swayampakula K., Boddu V.M., Abburi K., Sorption of phenol and o-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan –calcium alginate blended beads, Journal of Hazardous Materials, 2009, 162: 482-489.
- Pastoriza-Santos I., Serra-Rodríguez C., Liz-Marzán L.M., Self-Assembly of Silver Particle Monolayers on Glass from Ag^+ Solutions in DMF, Journal of Colloid and Interface Science, 2000, 221 (2): 236-241.
- Pop, Gh.T., Chiriță M., Rostami M.; Materiale bioceramice, Ed. Tehnopres, Iași, 2003.
- Vijayaraghavan K., Yun I.S., Bacterial biosorbents and biosorption, Biotechnology Advances, 2008, 26: 266-291.
- Vimala K., Murali Mohan Y., Samba Sivudu K., Varaprasad K., Ravindra S., Narayana Reddy N., Padma Y., Sreedhar B. MohanaRaju K., Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application, Journal of Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 76 (1): 248-258.
- Wagner C.D., Riggs W.M., Davis L.E., Moulder J.F., Muilenberg G.E., Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Data for Use in X-ray Photoelectron Spectroscopy, 1st ed., Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corp., Eden Prairie, Minnesota, USA, 1979.
- Wang M.L., Zhang Y.Y., Xie Q.J., Yao S.Z., In situ FT-IR spectroelectrochemical study of electrooxidation of pyridoxol on a gold electrode, Journal of Electrochima Acta, 2005, 51(6): 1059-1068.
- Wawrzkiewicz, M., Hubicki Z., *Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of acidic dye by the gel anion exchanger*, Journal of Hazardous Materials, 2009, 172: 868-874.
- Widoniak J., Eiden-Assmann S., Maret G., *Silver particles tailoring of shapes and sizes*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2005, 270-271: 340-344.

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ DIN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

Valorificarea rezultatelor cercetărilor s-a concretizat în următoarele publicații:

- Lucrări științifice publicate sau în curs de publicare: 10 (dintre care 6 lucrări publicate în reviste cotate ISI, 2 în reviste BDI, 2 în volumele simpozioanelor).
- Lucrări comunicate la simpozioane și manifestări științifice: 10 (dintre care 5 la manifestări științifice naționale și 5 la manifestări științifice internaționale).
- Stagiu de mobilitate în cadrul programului doctoral "Studii doctorale pentru performanțe europene în cercetare şi inovare" (CUANTUMDOC) - POSDRU/107/1.5/S/79407 la Universitatea din Twente, Facultatea de Știinte şi Tehnologii, Departamentul de Inginerie Tisulară (MIRA), Olanda pe parcursul a 4 luni (martie - iulie 2012).

I. Lucrări științifice publicate /acceptate spre publicare în reviste cotate ISI:6

1. G. Ciobanu, S. Ilisei, C. Luca, G. Carja, O. Ciobanu, *The effect of vitamins to hydroxyapatite growth on porous polyurethane substrate*, Progress in Organic Coatings, 74 (4), 2012, 648-653 (IF: 1,848).

2. G. Ciobanu, C. Luca, **S. Ilisei**, A.C. Luca, *New polyurethane – hydroxyapatite composites membranes*, Environmental Engineering and Management Journal, 11 (2), 2012, 291-295, (IF: 1,117).

3. S. Ilisei, G. Ciobanu, C. Luca, *Pyridoxine incorporated in hydroxyapatite / polyurethane composites*, Revista de Materiale Plastice, 49 (4), 2012, 285-287, (IF: 0,379).

4. G. Ciobanu, **S. Ilisei**, M. Harja, C. Luca, *Removal of Reactive Blue 204 dye from aqueous solutions by adsorption onto nanohydroxyapatite;* Science of Advanced Materials, 5(8), 2013, 1090-1096, (IF: 3,308).

5. G. Ciobanu, **S. Ilisei**, C. Luca, *Ag-loaded hydroxyapatite coatings on polyurethane surfaces by biomimetic deposition*, Revue Roumaine de Chimie, in print, (IF: 0,331).

6. G. Ciobanu, **S. Ilisei**, C. Luca, *Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold*, Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications, in print (IF: 2,404).

II. Lucrări publicate în reviste de specialitate indexate în baze de date internaționale (BDI): 2

1. S. Ilisei, G. Ciobanu, C. Luca, *Comparative study about biomimetic methods used in hydroxyapatite crystals growth on the polymeric surface*, Buletinul Institutului Politehnic Iași, Secția Chimie și Inginerie Chimică, Tomul LVIII (LXII), Fasc. 1, 2012, 117-125.

2. S. Ilisei, A. M. Bargan, G. Ciobanu, C. Luca, *Synthesis and characterization of nanohydroxyapatite powders*, Buletinul Institutului Politehnic Iași, Secția Chimie și Inginerie Chimică, Tomul LVIII (LXII), Fasc. 1, 2012, 229-234.

III. Lucrări științifice publicate în volumele simpozioanelor: 2

1. S. Ilisei, A.M. Bargan, G. Ciobanu, C. Luca, *Obținerea de biocompozite pe bază de hidroxiapatită / L-lizină monohidroclorid;* Conferința națională de bioinginerie pentru studenți și tineri cercetători, Ediția a XV-a, Facultatea de Bioinginerie – UMF, 17 – 20 mai 2012, Iasi, Romania, 32-37.

2. S. Ilisei, A.M. Bargan, G. Ciobanu, C. Luca, *Fosfați de calciu cu aplicații în reconstrucția osoasă;* Conferința națională de bioinginerie pentru studenți și tineri cercetători, Ediția a XV-a, Facultatea de Bioinginerie – UMF, 17 – 20 mai 2012, Iasi, Romania; 23-27.

IV. Lucrări comunicate la simpozioane și manifestări științifice internaționale: 5

1. G. Ciobanu, **S. Ilisei**, C. Luca, G. Carja, O. Ciobanu, *The effect of vitamins to hydroxyapatite growth on porous polyurethane substrate*, 7th Coating Science International Conference - COSI 2011, 27 iunie - 1 iulie, 2011, Noordwijk, Olanda, (comunicare orală).

2. G. Ciobanu, C. Luca, **S. Ilisei**, A.C. Luca *New polyurethane – hydroxyapatite composites membranes*, 6th International Conference on Environmental Engineering and Management "Green Future"– ICEEM06, 1 – 4 septembrie, 2011, Balatonalmadi, Ungaria, (comunicare orală).

3. G. Ciobanu, **S. Ilisei**, Luca C., *Pyridoxine incorporation into hydroxyapatite / polyurethane composites*, International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering - CISA, Sixth Edition, 24–27 aprilie 2012, Bacau, Romania, (poster).

4. S. Ilisei S., A.M. Bargan, G. Ciobanu G, C. Luca, *Bicompozite pe bază de apatită - sulfat gentamicină – L - lizină monohidroclorid cu aplicații în ortopedie;* Simpozionul internațional de produse cosmetice și aromatizante, Ediția a-XI-a, Cunoaștere și creativitate în cosmetologie, 4 - 7 iunie 2013, Iasi, Romania, (poster).

5. A.M. Bargan, **Ilisei S.**, G. Ciobanu, C. Luca, *Bismutul – ingredient sintetic pentru produse cosmetice;* Simpozionul internațional de produse cosmetice și aromatizante, Ediția a-XI-a, Cunoaștere și creativitate în cosmetologie, 4 – 7 iunie 2013, Iasi, Romania, (poster).

V. Lucrări comunicate la simpozioane și manifestări științifice naționale: 5

1. S.Ilisei, A.M. Bargan, G. Ciobanu, C. Luca, *Obținerea de biocompozite pe bază de hidroxiapatită / L-lizină monohidroclorid;* Conferința națională de bioinginerie pentru studenți și tineri cercetători, Ediția a XV-a, Facultatea de Bioinginerie – UMF, 17 – 20 mai 2012, Iasi, Romania (poster).

2. S.Ilisei, A.M. Bargan, G. Ciobanu, C. Luca, *Fosfați de calciu cu aplicații în reconstrucția osoasă;* Conferința națională de bioinginerie pentru studenți și tineri cercetători, Ediția a XV-a, Facultatea de Bioinginerie – UMF, 17 – 20 mai 2012, Iasi, Romania (poster).

3. **S.Ilisei**, G. Ciobanu, C. Luca, *Studiul comparativ privind tehnicile biomimetice utilizate în depunerea de cristale apatitice,* Zilele Facultații de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, editia a VIII- a, "Materiale si procese inovative", 17 - 18 noiembrie 2011, Iași, România (comunicare orală).

4. S.Ilisei, A.M. Bargan, G. Ciobanu, C. Luca, *Silver doped hydroxyapatite-coated polyurethane surfaces;* Conference - Centenary of Education in Chemical Engineering, 100th Anniversary of Faculty of Chemical Engineering and Environmental Protection, 28-30 November 2012, Iasi, Romania (poster).

5. A.M. Bargan, **S.Ilisei**, G. Ciobanu, C. Luca, *Synthesis and characterization of calcium phosphates biomaterials;* Conference - Centenary of Education in Chemical Engineering, 100th Anniversary of Faculty of Chemical Engineering and Environmental Protection, 28-30 November 2012, Iasi, Romania (poster).