



**UNIVERSITATEA TEHNICĂ
“GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI**



**Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului
Domeniul: Chimie**

**CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA,
CARACTERIZAREA ȘI APLICAȚIILE UNOR
BIOMATERIALE APATITICE SUBSTITUITE**

-Rezumatul Tezei de Doctorat -

Conducător științific:
Prof. Dr. Chim. Constantin LUCA

Doctorand:
Ing. Ana-Maria Bargan (căs. MATEIUC)

**IAȘI
2014**

UNIVERSITATEA TEHNICĂ “GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
R E C T O R A T U L

Către.....

Vă facem cunoscut că, în ziua de 24 septembrie 2014 la ora 11⁰⁰ în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**“CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA, CARACTERIZAREA
ȘI APLICAȚIILE UNOR BIOMATERIALE APATITICE SUBSTITUITE”**

elaborată de doamna **Ana-Maria Bargan (căs. Mateiuc)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|-----------------------|
| 1. Prof. univ. Dr. Ing., Cașcaval Dan ,
Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași | președinte |
| 2. Prof.univ.dr.chim., Luca Constantin ,
Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași | conducător științific |
| 3. Prof.dr.chim., Sandu Ion ,
Universitatea “Alexandru Ioan Cuza” Iași | referent oficial |
| 4. Cercet. Șt. I , dr., prof. asoc., Brumă Maria ,
Institutul de Chimie Macromoleculara „Petru Poni” Iași | referent oficial |
| 5. Conf.dr.chim., Ciobanu Gabriela Margareta ,
Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași | referent oficial |

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.

RECTOR
Prof.univ.dr.ing.**ION GIURMA**



Secretar universitate,
Ing. Cristina Nagiț



Mulțumiri

Finalizarea prezentei teze de doctorat s-a realizat cu ajutorul unei echipe minunate, din care mă bucur că am făcut parte. Această echipă este formată din domnul Prof. univ. dr. chim. Constantin LUCA, conducătorul meu științific, căruia îi prezint tot respectul și stima, cu doamna Conf. dr. chim. Gabriela Margareta CIOBANU, căruia țin să îi mulțumesc în mod deosebit, deoarece a reușit să îmi trezească pasiunea pentru cercetare și m-a sprijinit pe tot parcursul acestei lucrări științifice și de asemenea, cu asist. dr. ing. Ana Simona BARNA, care m-a susținut în această perioadă.

Vreau să mulțumesc, de asemenea, tuturor cadrelor didactice din cadrul Universității Tehnice "Gheorghe Asachi" din Iași cu care am colaborat, și care au ajutat la finalizarea prezentei teze de doctorat, în special doamnei Șef lucrări dr. biol. Mariana Diaconu din cadrul departamentului Ingineria și Managementul Mediului, precum și domnului Prof. dr. ing. Teodor Măluțan.

În mod categoric, această teză de doctorat nu ar fi avut finalitate fără ajutorul și sprijinul familiei, căroră le mulțumesc pentru înțelegere și sprijin moral.

Doresc să adresez mulțumirile cuvenite tuturor celor care, direct sau indirect, prin sprijinul necondiționat, au contribuit la conturarea acestui drum științific.

*Cu deosebită considerație,
Ana Maria Bargan (căs. Mateiuc)*

CUPRINS

Considerații generale	8
Obiectivele tezei	11

Partea A. STUDIU DE LITERATURĂ

Cap. I. BIOMATERIALE	13
I.1. Definiția și clasificare biomaterialelor	14
I.2. Proprietăți ale biomaterialelor	16
I.3. Biomateriale anorganice	19
I.3.1. Fosfați de calciu	19
I.3.1.1. Definiție, clasificări, proprietăți	19
I.3.1.2. Aplicații ale fosfaților de calciu	24
I.4. Biomateriale organice	26
I.4.1. Tipuri de biomateriale organice și utilizări	26
I.4.2. Acetatul de celuloză	30
Cap. II. HIDROXIAPATITA.....	34
II.1. Hidroxiapatita biologică.....	35
II.1.1. Structura țesutului dur din organismul uman.....	35
II.1.2. Hidroxiapatita biologică. Structură și proprietăți.....	38
II.2. Hidroxiapatita sintetică.....	40
II.2.1. Structură și proprietăți.....	40
II.2.2. Metode de sinteză a hidroxiapatitei	42
II.2.3. Aplicații ale hidroxiapatitei în medicină.....	44
Cap. III. HIDROXIAPATITA SUBSTITUITĂ.....	48
III.1. Substituții în structura hidroxiapatitei.....	49
III.1.1. Elemente de substituție în structura hidroxiapatitei.....	49
III.1.2. Hidroxiapatita substituită cu ceriu.....	52
III.1.2.1. Ceriul. Generalități.....	52
III.1.2.2. Toxicologia ceriului	54
III.1.2.3. Aplicații ale ceriului în medicină.....	55
III.1.3. Hidroxiapatita substituită bismut.....	56
III.1.3.1. Bismutul. Generalități.....	56
III.1.3.2. Toxicologia bismutului.....	57
III.1.3.3. Aplicații ale bismutului în medicină	59
Cap. IV. COMPOZITE PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ	62
IV.1. Materiale apatitice compozite. Caracteristici	63
IV.1.1. Sisteme cu eliberare controlată de medicament.	
Generalități.....	66

IV.1.2. Hidroxiapatita ca sistem cu eliberare controlată de medicament.....	72
IV.1.3. Alegerea principiului activ. Nistatina	74

Partea B. STRATEGIA EXPERIMENTALĂ

Cap. V. METODE ȘI TEHNICI DE CARACTERIZARE	77
V.1. Metode de caracterizare structurală a materialelor	78
V.1.1. Microscopia electronică (SEM - EDX).....	78
V.1.2. Difrakția de raze X (DRX)	80
V.1.3. Spectroscopia de absorbție în infraroșu (FTIR)	81
V.1.4. Spectrofotometrie de absorbție moleculară în ultraviolet-vizibil (UV-Vis)	83
V.1.5. Spectroscopia de fotoelectroni cu raze X (XPS)	84
V.1.6. Determinarea suprafeței specifice BET și a distribuției porilor	85
V.1.7. Spectroscopia de fluorescență	87
V.2. Activitatea bacteriologică.....	88
V.2.1. Izolarea și conservarea tulpinilor bacteriene	89
V.3. Materiale și reactivi utilizați	91
Cap. VI. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROXIAPATITEI NANOMETRICE	93
VI.1. Sinteza hidroxiapatitei nanometrice.....	94
VI.1.1. Protocolul de obținere a hidroxiapatitei	94
VI.2. Caracterizarea materialelor apatitice obținute	97
VI.2.1. Difrakția de raze X (DRX)	97
VI.2.2. Microscopia electronică (SEM-EDX)	100
VI.2.3. Determinarea suprafeței specifice BET	102
VI.2.4. Spectroscopia IR	104
VI.3. Concluzii	105
Cap. VII. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROXIAPATITEI SUBSTITUITE CU CERIU	107
VII.1. Introducere	108
VII.2. Sinteza pulberii de hidroxiapatită substituită cu Ce (IV).....	110
VII.2.1. Protocolul de obținere a hidroxiapatitei substituite cu Ce (IV)	110
VII.2.2. Metode de caracterizare a pulberii de hidroxiapatită substituită cu ceriu	112
VII.3. Mecanismul de substituție	113
VII.4. Caracterizarea structurală și morfologică pulberii de	

hidroxiapatită substituită cu ceriu (CeHA)	116
VII.4.1. Compoziția chimică a probelor studiate	116
VII.4.2. Morfologia cristalului.....	118
VII.4.3. Structura cristalului	119
VII.4.4. Valența chimică a ionului de ceriu în produșii finali	122
VII.4.5. Caracterizarea texturală și proprietățile suprafeței specifice	124
VII.4.6. Spectroscopie în IR cu transformată Fourier (FTIR)	126
VII.4.7. Spectroscopia de fluorescență.....	128
VII.4.8. Spectroscopia UV-Vis.....	129
VII.5. Caracterizarea bacteriologică a materialelor	130
VII.6. Concluzii	132
Cap. VIII. OBTINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROXIAPATITEI SUBSTITUITE CU BISMUT	134
VIII.1. Introducere	135
VIII.2. Sinteza pulberii de hidroxiapatită substituită cu Bi(III)	136
VIII.2.1. Protocolul de obținere a hidroxiapatitei substituite cu Bi(III)	136
VIII.2.2. Metode de caracterizare a pulberii de hidroxiapatită substituită cu Bi(III)	138
VIII.3. Mecanismul de substituție	139
VIII.4. Caracterizarea structurală și morfologicăa pulberii de hidroxiapatită substituită cu bismut (BiHA)	140
VIII.4.1. Compoziția chimică a probelor studiate	142
VIII.4.2. Morfologia cristalului	144
VIII.4.3. Structura cristalului	146
VIII.4.4. Valența chimică a ionului de bismut în produșii finali	147
VIII.4.5. Spectroscopie în IR cu transformată Fourier (FTIR).....	149
VIII.4.6. Spectroscopia de fluorescență.....	150
VIII.4.7. Spectroscopia UV-Vis.....	151
VIII.5. Caracterizarea bacteriologică a materialelor.....	152
VIII.6. Concluzii	156

Cap. IX. OBȚINEREA DE MATRICI POROASE PE BAZĂ DE ACETAT DE CELULOZĂ ȘI HIDROXIAPATITĂ	157
IX.1. Protocolul experimental de obținere a biocompozitelor	158
IX.1.1. Obținerea materialului poros din acetat de celuloză.....	158
IX.1.2. Obținerea compozitelor acetat de celuloză/hidroxiapatită	160
IX.1.3. Obținerea compozitelor acetat de celuloză/nistatină	162
IX.1.4. Obținerea compozitelor acetat de celuloză/hidroxiapatită/nistatină	164
IX.2. Caracterizarea biocompozitelor pe bază de acetat de celuloză	165
IX.3. Studii de interacțiune cu fluide de interes biologic „in vitro”	169
IX.3.1. Determinarea gradului de umflare	169
IX.3.2. Determinarea gradului de degradare	170
IX.3.3. Rezultatele obținute	172
IX.4. Studiul eliberării controlate a medicamentului din matricea poroasă	175
IX.4.1. Eliberarea de medicament <i>in vitro</i>	177
IX.4.2. Rezultatele obținute	178
IX.5. Caracterizarea bacteriologică a biocompozitelor	180
IX.5.1. Izolarea și conservarea tulpinei levuriene	180
IX.5.2. Rezultatele obținute	182
IX.6. Concluzii	183
CONCLUZII GENERALE.....	185
DISEMINAREA REZULTATELOR	189
Bibliografie	192

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.

CONSIDERAȚII GENERALE

În cadrul acestui proiect se va prezenta sinteza și caracterizarea unor biomateriale apatitice, simple, substituite și compozite cu scopul de a putea fi utilizate în domeniul biomedical.

Într-un prim capitol din prezenta teză s-a obținut materialul apatitic (hidroxiapatită) prin metoda precipitării chimice, folosindu-se ca sursă de calciu, hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) și sursă de fosfat, acid fosforic (H_3PO_4). Apoi, s-a realizat modificarea structurală a materialului apatitic, prin adăugare, în diferite proporții, de sulfat de ceriu ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) și azotat de bismut ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) cu posibile aplicații în domeniul biomedical, după care s-a obținut un biocompozit pe bază de acetat de celuloză, hidroxiapatită și / sau nistatină, în scopul utilizării acestui material la procesul de eliberare controlată de medicament.

Studiile și cercetările în domeniul științei și ingineriei materialelor s-au extins foarte mult în ultimele decenii, în special în ceea ce privește materialele fosfatice (fosfați de calciu, apatite), cu aplicabilitate în domeniul medicinei și al protecției mediului (Ciobanu și Cârjă, 2010). Din multitudinea materialelor fosfatice existente în prezent, proiectul abordează cercetarea fosfaților de calciu, în particular a apatitelor.

Datorită faptului ca apatita reprezintă aproximativ 70% din masa uscată a țesutului osos, biomaterialele apatitice sunt utilizate cu preponderență în vindecarea și ameliorarea bolilor osoase. Cea mai comună afecțiune a oaselor este osteoporoza, caracterizată prin densitate osoasă scăzută.

Una dintre soluțiile care s-au dezvoltat cu succes până în prezent este substituirea osoasă cu „o clasă de materiale speciale care sunt folosite în contact cu țesuturile biologice: sânge, celule, proteine și alte substanțe vii și care sunt capabile să funcționeze la contactul intim cu organismul viu, cu reacții adverse minime din partea acestuia” (Ciobanu și Cârjă, 2010).

Această „clasă de materiale speciale” face referire la **biomateriale**. Prima generație de biomateriale utilizate în scopul înlocuirii unor țesuturi umane s-a dezvoltat în anii 1960 -1970 și a inclus în principal metale, aliaje și materiale pe bază de poliester (Kebinski și colab., 1997, 1998). La începutul anilor '70, biomaterialele erau folosite doar pentru a înlocui țesutul osos distrus, fiind inerte din punct de vedere biologic (Kebinski și colab., 1998). Descoperirea faptului că celulele și țesuturile din organismul viu îndeplinesc roluri esențiale în metabolism, pe lângă numeroase alte funcții, a evidențiat faptul că folosirea biomaterialelor bioinerte ca materiale înlocuitoare de țesut prezintă anumite limitări, ce restricționează utilizarea acestora la scară largă (Bhushan, 2004).

Anual au loc proceduri de transplantare osoasă în ortopedie, neurochirurgie și stomatologie, ce ating la nivel mondial o cifră de afaceri de miliarde de dolari (în ultimele două decenii în Statele Unite ale Americii s-au cheltuit peste 4 miliarde de dolari, din care o mare parte s-au axat pe biomateriale) (Hollister, 2009). Industria biomaterialelor valorează în prezent circa 28 miliarde de dolari, cu o rată de creștere anuală de 15%, preconizându-se o creștere a pieței în următorii ani până la valoarea de 58,1 miliarde de dolari (sursă web 1; Holzapfel și colab., 2013).

În acest sens, prima parte a strategiei experimentale a prezentei teze de doctorat s-a concentrat în jurul obținerii unui material cu proprietăți superioare, care poate fi folosit cu succes în dezvoltarea de oase artificiale. Astfel, s-a obținut hidroxiapatita substituită cu ceriu și hidroxiapatita substituită cu bismut, substituții realizate cu succes și demonstrate de metodele de analiză precum difracția de raze X (DRX), microscopie electronică cu baleiaj cuplată cu spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (SEM-EDX), spectroscopia în

infraroșu (FTIR), spectroscopie de fotoelectroni cu raze X (XPS), metoda Brunauer - Emmett - Teller (BET), spectroscopie UV-Vis, spectroscopie de fluorescență. De asemenea, s-a dovedit caracterul antimicrobian al pulberilor, putând fi folosite în tratamentul unor infecții microbiene.

Pentru utilizarea în domeniul medical, s-a obținut în a doua parte a strategiei experimentale, un material compozit pe bază de acetat de celuloză și hidroxiapatită, cu scopul de a putea fi folosit în transportul de medicamente în organism. Antibioticul ales pentru a fi utilizat în această aplicație este nistatina. Nistatina este un antibiotic cu acțiune fungistică și fungicidă *in vitro* împotriva unei varietăți de drojdii și ciuperci precum *Candida albicans*. Nistatina este utilizată pentru profilaxia și tratamentul candidozei ce se poate localiza pe piele și mucoase. Eliberarea controlată a nistatinei cu ajutorul materialului compozit obținut a fost realizată cu succes, demonstrându-se capacitatea materialului de a elibera o cantitate semnificativă de medicament în organism ajutând astfel la tratarea organului sau țesutului bolnav.

Există o destul de mare varietate de compuși din familia fosfaților de calciu, mulți dintre ei fiind utilizați în aplicații biomedicale și protecția mediului. Dintre aceștia se disting *materialele apatitice*, dintre care cea mai importantă este hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Cea mai importantă proprietate a hidroxiapatitei ca biomaterial este excelența sa biocompatibilitate, care se manifestă în realizarea de legături directe cu țesutul osos viu. Hidroxiapatita nu este doar bioactivă, ci și osteoconductivă și netoxică.

Ideea principală a tezei de doctorat constă în obținerea prin metoda precipitării a hidroxiapatitei sintetice stoechiometrice, precum și a hidroxiapatitei substituie cu ceriu și bismut, și obținerea unor materiale apatitice compozite pe bază de hidroxiapatită. Materialele obținute pot fi utilizate în diferite aplicații din domeniul medical (implanturi osoase, eliberarea controlată a medicamentelor, etc.).

Scopul principal al lucrării de față este **obținerea de biomateriale pe bază de hidroxiapatită** în calitate de material osteoinductiv cu utilizări în aplicații biomedicale.

Pentru realizarea scopului au fost trasate următoarele obiective:

- 1) **obținerea de hidroxiapatită** stoechiometrică, cristalină, de puritate ridicată, sub formă de pulbere prin metoda precipitării din soluție, ce poate fi utilizată în aplicații din domeniul biomedical;
- 2) **obținerea de hidroxiapatită substituită cu ceriu** - ionul de ceriu (IV) este încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei, îmbunătățind astfel efectul antimicrobian al hidroxiapatitei;
- 3) **obținerea de hidroxiapatită substituită cu bismut** - aceste apatite substituie s-au obținut prin metoda precipitării; ele au aplicabilitate medicală deoarece bismutul se comportă ca agent antimicrobian și agent anticancerigen.
- 4) **obținerea unui biomaterial compozit pe bază de acetat de celuloză, hidroxiapatită și / sau nistatină** - compozitul obținut a fost utilizat ca și sistem de eliberare controlată a medicamentului (nistatina) în organism. Studiul eliberării *in vitro* al nistatinei a fost investigat, iar acest compozit poate fi utilizat pentru transportul de medicament direct în aria de risc a infecției din organism.
- 5) **caracterizarea structural - morfologică a materialelor obținute** apelând la metode și tehnici de analiză avansate și performante, precum analiza de difracție X (XRD), microscopia electronică cu baleiaj (SEM) cuplată cu analiza EDX, spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS), spectroscopia cu infraroșu transformată Fourier (FTIR), Brunauer-Emmett-Teller (BET) analiza suprafeței specifice, spectroscopie UV-Vis, spectroscopie de fluorescență.
- 6) **testarea microbiologică** - probele de hidroxiapatită simplă și substituită cu ioni de ceriu și bismut, au fost testate pe două tulpini patogene: gram pozitivă - *Staphylococcus aureus* și respectiv gram negativă - *Escherichia coli*. De asemenea, compozitele pe bază de acetat de

celuloză, hidroxiapatită și / sau nistatină au fost testate pe *Candida albicans*, tulpină patogenă ce face parte din categoria fungilor.

Proiectul de cercetare cu titlul „Cercetări privind obținerea, caracterizarea și aplicațiile unor biomateriale apatitice substituie”, este structurat în două părți și anume: Partea A. Studiul de literatură (4 capitole) și Partea B. Strategia experimentală (5 capitole). Lucrarea mai conține capitolele: Introducere, Concluzii generale, Activitatea științifică (palmares) a doctorandului și Bibliografie.

În cadrul primei părți, **capitolul I** intitulat „Biomateriale”, prezintă stadiul actual de cunoaștere în domeniul biomaterialelor în care se îmbină elemente de medicină, biologie, chimie, inginerie tisulară și știința materialelor. Astfel, sunt prezentate biomaterialele utilizate în cadrul prezentului proiect de cercetare (fosfați de calciu, acetat de celuloză), împreună cu clasificarea, proprietățile și aplicațiile acestora în domeniul biomedical.

Capitolul II, cu titlul „Hidroxiapatita” prezintă principalele caracteristici ale hidroxiapatitei biologice și ale hidroxiapatitei sintetice. Cea mai interesantă proprietate a hidroxiapatitei este capacitatea de a interacționa cu țesutul osos viu, formând legături puternice cu osul. Pentru a înțelege mai bine acest fenomen s-a studiat structura hidroxiapatitei, precum și metodele de sinteză care se aplică la momentul actual pentru obținerea de hidroxiapatită sub formă de pulbere. De asemenea se prezintă și aplicațiile existente în domeniul biomedical, ce utilizează hidroxiapatita fie ca material de acoperire pentru implanturile metalice, fie ca material de umplere osoasă.

În **capitolul III** „Hidroxiapatita substituită” sunt prezentate elementele de substituție în structura hidroxiapatitei. Structura hidroxiapatitei are o bună flexibilitate, permițând în rețeaua sa diferite substituții cu anioni/cationi. Reacția de substituie a grupării anionice PO_4^{3-} cu HPO_4^{2-} și CO_3^{2-} , precum și substituția grupării OH^- cu ionul F^- , modifică proprietățile suprafeței și stabilitatea termică a materialului (Shimoda și colab., 1990). Substituția ionilor de calciu Ca^{2+} cu ioni metalici divalenți precum: Sr^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} și Ba^{2+} (O'Donnell și colab., 2008, Qi și Zhang, 2008), cationi trivalenți (Cr^{3+} , Al^{3+} și Fe^{3+}) și mai recent substituția cu lantanide (La^{3+} , Pr^{3+} , Ce^{3+} , Nd^{3+} și Sm^{3+}) (Z. Feng et al., 2005) și cationi tetravalenți (Ti^{4+}), afectează caracteristici importante ale HA, printre care cristalinitatea, solubilitatea, stabilitatea termică și procesul de metabolizare (Resende și colab., 2006). De asemenea sunt prezentate caracteristici ale ionului de ceriu și ionului de bismut, care să ateste relevanța utilizării acestora, ca și ioni substituienți în structura hidroxiapatitei.

Ultimul capitol din cadrul studiului de literatură, și anume **capitolul IV**, intitulat „Compozite pe bază de hidroxiapatită” prezintă caracteristici ale materialelor apatitice compozite, în principal ale compozitelor pe bază de hidroxiapatită. De-a lungul anilor au fost propuse foarte multe combinații de fosfați de calciu și polimeri, iar biocompatibilitatea lor a fost testată în diferite stadii. Proprietățile acestor compozite sunt foarte variabile, în funcție de combinația, forma și microstructura (de exemplu, poros sau compact) implantului. În acest capitol se găsesc, de asemenea, date legate de sistemele cu eliberare controlată de medicament și metodele de înglobare a medicamentului în matricea polimerică.

În ceea ce privește cea de-a doua parte a proiectului de cercetare, **Partea B. Strategia experimentală**, aceasta cuprinde este prezentat conceptul experimental al lucrării având drept scop obținerea de noi materiale pe bază de hidroxiapatită și polimeri sintetici, precum și aplicabilitatea lor în domeniul medical.

Astfel, **capitolul V**, prezintă metodele de analiză, care au stat la baza interpretării rezultatelor obținute. Materialele obținute în cercetările efectuate au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic și compozițional prin următoarele tehnici de analiză: microscopie electronică cu baleiaj (SEM) cuplată cu spectroscopie de raze X prin dispersie de energie (EDX), analiză prin difracție de raze X (DRX), spectroscopie în infraroșu (FTIR), spectrofotometrie de absorbție moleculară în ultraviolet-vizibil (UV-Vis), spectroscopie de

fotoelectroni cu raze X (XPS), metoda Brunauer - Emmett - Teller (BET) – fiziosorbția azotului.

Capitolul VI, „Obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei nanometrice”, prezintă protocolul de obținere a hidroxiapatitei nanometrice și caracterizarea acesteia. În urma analizelor s-a ajuns la concluzia că pulberea obținută este hidroxiapatită nanometrică.

În **capitolul VII** „Obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei substituite cu ceriu” se explică mecanismul de substituție a ionului de calciu Ca^{2+} din structura hidroxiapatitei cu ionul de ceriu (Ce^{4+}). Hidroxiapatita substituită cu ceriu a fost obținută prin metoda precipitării, utilizându-se ca materii prime $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sursa de Ca^{2+}), H_3PO_4 (sursa de PO_4^{3-}) și $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (sursa de ceriu). Compusul obținut este caracterizat structural, morfologic și bacteriologic. S-a testat activitatea bacteriologică a probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu pe bacteriile gram-pozitiv *Staphylococcus aureus* și gram-negativ *Escherichia coli*.

În **capitolul VIII** „Obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei substituite cu bismut” se explică mecanismul de substituție a ionului de calciu Ca^{2+} din structura hidroxiapatitei cu ionul de bismut (Bi^{3+}). Hidroxiapatita substituită cu bismut a fost obținută prin metoda precipitării, utilizându-se ca materii prime $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sursa de Ca^{2+}), H_3PO_4 (sursa de PO_4^{3-}) și $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sursa de bismut). Compusul obținut este caracterizat structural, morfologic și bacteriologic. S-a testat activitatea bacteriologică a probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu pe bacteriile gram-pozitiv *Staphylococcus aureus* și gram-negativ *Escherichia coli*.

Ultimul capitol al acestui proiect, **capitolul IX** „Matrici poroase pe bază de hidroxiapatită și acetat de celuloză” prezintă procedeul de obținere a biocompozitelor pe bază de acetat de celuloză / hidroxiapatită / nistatină. Membranele obținute sunt caracterizate structural și morfologic, apoi utilizate în studii de interacțiune cu fluide biologice, precum și în studii de eliberare controlată de medicament (nistatina). În acest capitol a fost studiată activitatea antifungică pe care o manifestă biocompozitele pe bază de acetat de celuloză / hidroxiapatită / nistatină față de tulpina levuriană *Candida albicans*.

Rezultatele obținute în cadrul acestui proiect au fost diseminate în 7 lucrări științifice publicate sau în curs de publicare: 5 lucrări în reviste cotate ISI și 2 în reviste BDI, 3 lucrări publicate în volumele simpozioanelor și 9 lucrări prezentate în cadrul manifestărilor științifice naționale și internaționale.

Partea B. Contribuții originale

Capitolul IV OBTINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROXIAPATITEI NANOMETRICE

VI.1. Sinteza hidroxiapatitei nanometrice

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 (*Bargan și colab.*, 2013).

Principalele obiective urmărite în acest studiu au fost:

1) sinteza hidroxiapatitei nanometrice și optimizarea procedurii de sinteză prin studierea factorilor care influențează obținerea de hidroxiapatită stoechiometrică, sub formă de pulbere nanocristalină;

2) caracterizarea structural - morfologică a materialelor obținute apelând la metode și tehnici de analiză avansate și performante. Probele obținute au fost caracterizate fizico-chimic aplicând metode moderne precum:

- difracție 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 evidențierea principalelor grupări funcționale 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).

VI.1.1. Protocolul de obținere a hidroxiapatitei

Obținerea hidroxiapatitei s-a realizat prin metoda bazată pe reacții de precipitare (*Bargan și colab.*, 2012). Aceasta constă în amestecarea unor soluții apoase care conțin ioni de Ca^{2+} și PO_4^{3-} , la un pH > 10. Ca sursă de ioni de calciu s-a folosit hidroxid de calciu, iar ca sursă de ioni fosfat s-a folosit acid fosforic. În timpul sintezei pH-ul este menținut > 10 cu hidroxid de sodiu.

Tabelul VI.1. Materiile prime utilizate pentru sinteza hidroxiapatitei

Substanța	Formula chimică	Concentrație (mol)	Puritate	Firma
hidroxid de calciu	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,167	98%	Sigma Aldrich
acid fosforic	H_3PO_4	0,1	89%	Loba Chemical
hidroxid de sodiu	NaOH	10	98%	Sigma Aldrich
alcool etilic	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	-	96%	Chimopar S.A

Schematic, procesul de preparare pentru hidroxiapatită poate fi reprezentat ca în figura VI.1

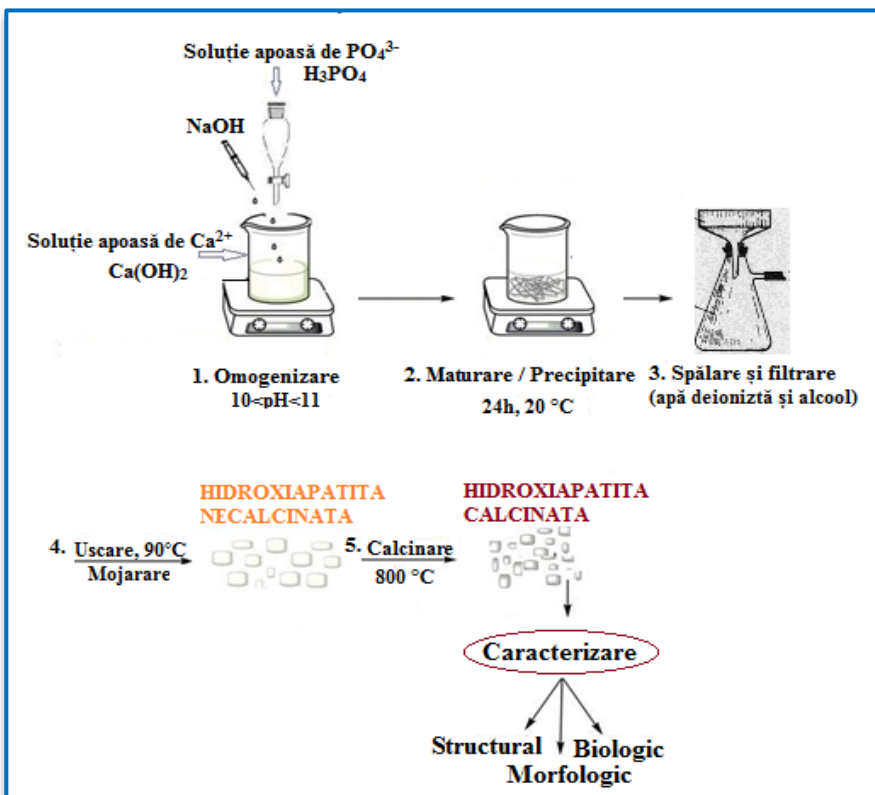
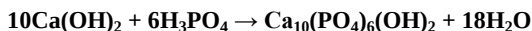


Figura VI.1. Schema de obținere a hidroxiapatitei

Ecuatia chimică care descrie reacția este următoarea:



VI.1.

Un prim pas în cadrul procedurii de obținere a hidroxiapatitei constă în prepararea soluțiilor A și B.

Soluția A reprezintă soluția de Ca(OH)_2 , de concentrație 0,167 M - se cântărește 12,358 g Ca(OH)_2 , se transferă într-un flacon cotelat de 100 ml și se aduce la cotelă cu apă bidistilată. pH-ul soluției este 11,5.

Soluția B reprezintă soluția de H_3PO_4 , de concentrație 0,1 M - se măsoară cu o pipetă un volum de 6,29 ml H_3PO_4 concentrat, se transferă într-un flacon cotelat de 100 ml și se aduce la cotelă cu apă bidistilată. pH-ul soluției este 1,7. Raportul molar Ca/P este 1,67, specific pentru obținerea de hidroxiapatită pură și stoechiometrică.

Astfel, soluția B se adaugă prin picurare peste soluția A, sub agitare continuă. Se reglează pH-ul amestecului prin adăugare treptată de soluție 1 M NaOH. Temperatura de sinteză a fost de 60°C , iar timpul de agitare a fost 3h. Compusul astfel obținut se lasă la maturat la temperatura camerei timp de 24 h.

Soluția cu hidroxiapatită precipitată se filtrează la vid, se spală precipitatul cu apă deionizată pentru a îndepărta NaOH și cu etanol 96 % pentru a îndepărta H_2O , după care se

usucă în etuvă la 90 °C timp de 24 h. Proba astfel obținută se mojarază, rezultând o pulbere fină de culoare albă. Această pulbere de hidroxiapatită este calcinată la 800 °C timp de 1 h. Cuptorul se încălzește de la temperatura camerei la 800 °C cu o rată de 5 °C / min. În urma calcinării se obține o pulbere de culoare albastru deschis. .

În studiile efectuate pe parcursul tezei s-a folosit pulberea de hidroxiapatită calcinată.

VI.2. Caracterizarea materialelor apatitice obținute

Pe baza protocolului experimental (*Bargan și colab., 2013*) s-au obținut pulberi cristaline de hidroxiapatită folosind ca sursă de calciu **hidroxidul de calciu Ca(OH)_2** , iar ca sursă de fosfor **acidul fosforic H_3PO_4** .

Aceste pulberi au fost caracterizate structural și morfologic cu ajutorul unor metode specifice precum: microscopia optică, microscopia electronică cu baleiaj (SEM) cuplată cu spectroscopia EDX și difracția de raze X (DRX) (*Ilisei și Bargan, 2012*), spectroscopie în infraroșu (FT-IR), metoda Brunauer - Emmett - Teller (BET) - fiziosorbția azotului.

V.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 $\text{K}\alpha$ a cuprului ($\text{CuK}\alpha$ radiation, $\lambda = 0,15418$ nm), la o tensiune de 40 kV și intensitate de 30 mA, în domeniul unghiular $2\theta = 20 - 80^\circ$.

Difractograma caracteristică pentru pulberea de hidroxiapatită calcinată este prezentată în figura VI.2.

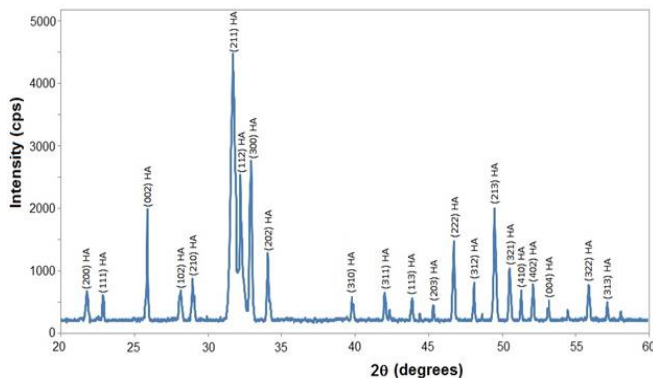


Figura VI.2. Difractograma (DRX) specifică hidroxiapatitei obținute

Difractograma DRX indică picurile caracteristice hidroxiapatitei în domeniul unghiular 2θ 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).

Calculul parametrilor celulei elementare:

Hidroxiapatita cristalizează în sistemul hexagonal pentru care parametrii celulei elementare se pot determina folosind relația:

$$\frac{4}{3} \cdot \frac{(h^2 + hk + k^2)}{a^2} + \frac{\ell^2}{c^2} = \frac{4 \sin^2 \theta}{\lambda^2} \quad \text{VI.2}$$

sau

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \cdot \left(\frac{h^2 + h \cdot k + k^2}{a^2} \right) + \frac{\ell^2}{c^2} \quad \text{VI.3}$$

unde: (hkl) = indici Miller,

θ = unghiul de difracție ($^\circ$),

d = distanța dintre planele cristaline caracterizate prin aceiași indici Miller (hkl) ,

λ = lungimea de undă a razelor X utilizate = 0,15418 nm,

a, c = constante = parametrii celulei elementare (Å).

Parametrii a și c pentru structura hexagonală au fost calculați pentru picurile corespunzătoare planelor de difracție (002) și (211). Așa cum se observă în tabelul VI.2, parametrii celulei elementare pentru sistemul hexagonal în cazul materialelor apatitice proprii, sunt comparabili cu cei pentru hidroxiapatita standard (JCPDS 09-0432).

Tabelul VI.2. Parametrii celulei elementare pentru structura hidroxiapatitei obținute

Parametrul (Å)	HA standard	HA (calcinată la 800 $^\circ\text{C}$)
a = b	9,418	9,5271
c	6,883	6,8333

Determinarea dimensiunii cristalitelor și a gradului de cristalinitate:

Mărimea cristalelor de hidroxiapatită (D) a fost calculată din analiza DRX cu ajutorul ecuației Debye - Scherrer care leagă semilățimea maximelor de difracție și dimensiunea cristalitelor:

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{B_{1/2} \cdot \cos \theta} \quad \text{VI.4}$$

unde: D = dimensiunea medie a cristalitelor (nm),

λ = lungimea de undă a radiației X folosite = 0,15418 nm,

$B_{1/2}$ = este semilățimea (datorată exclusiv dimensiunii cristalitelor) maximului de difracție la jumătatea înălțimii sale (radiani),

θ = unghiul Bragg corespunzător maximului de difracție ales ($^\circ$),

k = constantă care ține cont de forma cristalitelor (sistemul de cristalizare); în cazul cristalelor de apatită are valoarea 0,9.

Calculul mărimii medii a cristalelor apatitice s-a realizat prin utilizarea lărgimii $B_{1/2}$ corespunzătoare planului de difracție (002) ce determină picul de la unghiul 2θ cu

valoarea 26,08°. S-a ales acest pic datorită faptului că el este bine conturat și nu interferă cu alte picuri. Din datele prezentate în tabelul VI.3 se observă că proba apatitică este formată din cristale nanometrice, cu dimensiuni sub 60 nm.

Tabelul VI.3. Mărimile cristalelor (D), gradul de cristalinitate (X_C) și volumul celulei elementare (V) obținute din spectrele XRD pentru proba de hidroxiapatită analizată

Proba	D (nm)	X_C (%)	V (Å ³)
HA	58,32	99,78	1605,77

Gradul de cristalinitate (X_C), corespunzând fracției fazei cristaline din pulberile de hidroxiapatită a fost evaluat cu ajutorul ecuației:

$$X_C = \frac{I_{300} - V_{112/300}}{I_{300}} \cdot 100 \quad \text{VI.5}$$

unde: I_{300} = intensitatea picului de difracție corespunzătoare planului (300),

$V_{112/300}$ = intensitatea fondului difractogramei între picurile de difracție corespunzătoare planelor (112) și (300) ale hidroxiapatitei.

Se poate concluziona că difractograma de raze X a probei analizate indică o structură înalt cristalină, tratamentul termic la 800 °C determinând dezvoltarea unei faze cristaline corespunzătoare hidroxiapatitei cristalizate în sistem hexagonal și de dimensiuni nanometrice, cu nanocristale de până la 60 nm.

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

Analiza microscopică (de tip microscopie optică și microscopie electronică cu baleiaj - SEM) a probelor obținute indică formarea de pulberi cristaline cu cristale de dimensiuni nanometrice, așa cum se prezintă în figurile VI.3 și VI.4.

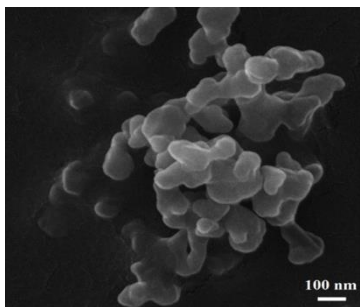


Figura VI.3. Imagine microscopică (microscopie electronică cu baleiaj – SEM) a pulberii de hidroxiapatită obținută

Cristalele de hidroxiapatită, au dimensiuni nanometrice (sub 60 nm), valori care concordă cu cele obținute în urma analizei DRX. După cum se observă din figura VI.4 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 cristallitelor 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.

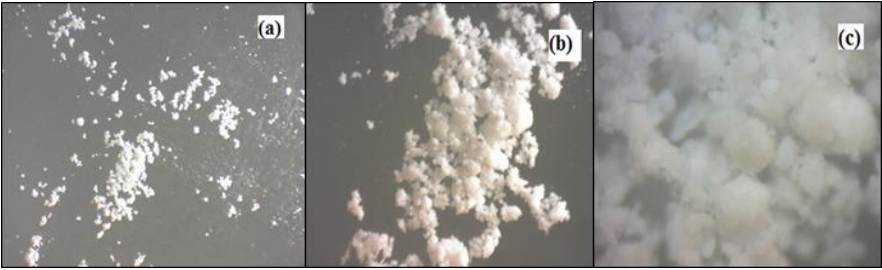


Figura VI.4. Imagini microscopice (microscopie optică) ale pulberii de hidroxiapatită obținută (a, b și c, diverse magnitudini: x10, x60, x200)

Apelând la **analiza elementală SEM-EDX** (Figura VI.5) s-a putut stabili că raportul Ca/P pentru fiecare probă sintetizată este în domeniul 1,65 – 1,68, ceea ce concordă cu datele din literatură unde se menționează că acest raport trebuie să fie în jurul valorii de 1,67.

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 VI.4.

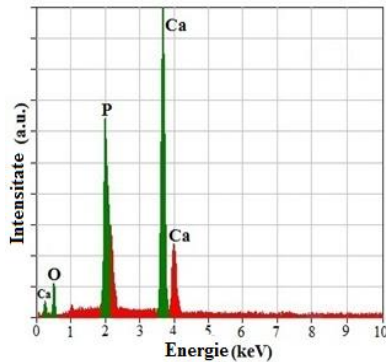


Figura VI.5. Spectrul EDX al hidroxiapatitei obținute

Tabelul VI.4. Compoziția elementală (% masice) a probelor de hidroxiapatită obținute

Proba	Ca (%)	P (%)	O (%)	Ca/P
HA	39,12	18,21	42,67	1,673

Raportul molar Ca/P al hidroxiapatitei calcinate are valoarea 1,673 valoare apropiată de valoarea raportului molar Ca/P = 1,67 caracteristic hidroxiapatitei, conform literaturii de specialitate (Raynaud și colab., 2001).

V.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, proba sub formă de pulbere a fost supusă 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 VI.7.

Forma izotermelor ne oferă o primă informație privind tipul de porozitate a materialului. Astfel, izoterma de adsorbție pentru proba HA se prezintă sub forma unei curbe histerezis de tipul IV (în clasificarea IUPAC) prezentă la presiune p/p_0 înaltă, caracteristică materialelor mezostructurate. Izotermele indică faptul că proba este un material poros, ce conține 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.

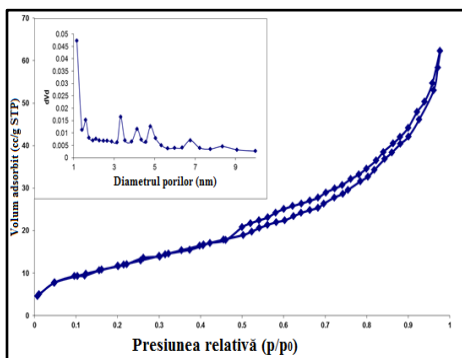


Figura VI.7.

Izoterma de
adsorbție/desorbție a azotului
la 77 K și distribuția porilor
pentru proba de hidroxiapatită

Tabelul VI.5 rezumă rezultatele adsorbției N_2 și distribuția porilor caracteristică pentru proba HA. Diametrul mediu al porilor obținut pentru proba HA este de 1,181 nm.

Tabelul VI.5. Date obținute din măsurători de adsorbție - desorbție a N_2 pentru proba de hidroxiapatită

Proba	Suprafața specifică (m^2/g)	Suprafața externă (m^2/g)	Volumul total al porilor (cm^3/g)	Dimensiunea porilor (nm)
HA	139,365	45,454	0,098	1,181

VI.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 (FT-IR). Parametrii de lucru au fost: rezoluția de scanare de $0,8\text{ cm}^{-1}$, viteza de scanare de $0,1 - 1,5\text{ cm/s}$ și regiunea de frecvențe cuprinsă între $400 - 4,000\text{ cm}^{-1}$. Spectroscopia FT-IR s-a utilizat pentru a determina picurile caracteristice hidroxiapatitei și interacțiunile ce au loc în structura acesteia.

Studiul spectrelor FT-IR ale probelor analizate oferă informații privind grupările existente în structura hidroxiapatitei, respectiv grupările fosfat (PO_4^{3-}) și grupările hidroxil (OH^-). În figura VI.8 este prezentat spectrul FT-IR al probei de hidroxiapatită calcinată la 800°C .

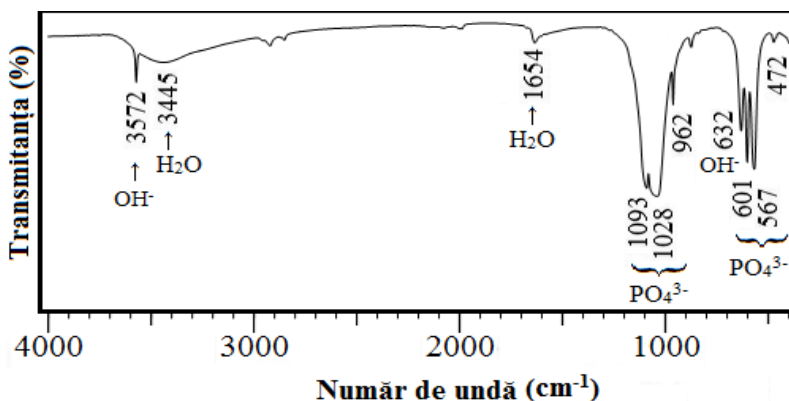


Figura VI.8. Spectrul FT-IR pentru proba de hidroxiapatită

În figura VI.8 benzile caracteristice grupării fosfat se observă la numerele de undă: $472, 564, 602, 962, 1044$ și 1092 cm^{-1} . Aceste benzi indică aranjamentele poliedrelor (PO_4^{3-}) în structura hidroxiapatitei. Între 3200 și 3500 cm^{-1} există o bandă largă produsă de moleculele de apă adsorbite pe suprafața hidroxiapatitei, iar vibrația de întindere a legăturii O-H pe suprafața hidroxiapatitei este localizată la $3590\text{-}3560\text{ cm}^{-1}$.

Grupările hidroxil (OH^-) din structura hidroxiapatitei au fost identificate prin picurile situate la 3575 cm^{-1} și 638 cm^{-1} , iar intensitatea lor demonstrează un grad de cristalinitate ridicat.

Grupările OH libere de pe suprafața particulelor apar în zona $3400 - 3500\text{ cm}^{-1}$, iar benzile specifice punților de hidrogen din gruparea $\text{OH}\cdots\text{O}$ sunt vizibile la 3495 cm^{-1} . Banda de adsorbție cu maximum 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} .

VI.2.6. Concluzii

În cadrul acestui capitol s-a urmărit obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei sub formă de pulbere cristalină și de puritate ridicată, aplicând metoda precipitării chimice din soluție. Ținând cont de rezultatele obținute se pot trage următoarele concluzii:

- 1) Metoda bazată pe reacții de precipitare a fost folosită cu succes pentru a obține pulberi cristaline, nanometrice de hidroxiapatită ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), utilizând ca materiale: sursă de calciu - hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), acid ortofosforic (H_3PO_4) ca sursă de fosfor.

- 2) Analiza probelor obținute prin difracție de raze X ne arată gradul de cristalinitate a structurii apatitice. Cu ajutorul ecuației Debye - Scherrer s-a calculat mărimea medie a cristalelor apatitice, observându-se astfel că proba apatitică prezintă cristale nanometrice cu dimensiuni sub 60 nm. De asemenea, în urma calculelor efectuate s-a determinat gradul de cristalinitate, care s-a dovedit a fi în proporție de 99,78 %, valoare ce ne indică obținerea unei structuri apatitice înalt cristalină.

- 3) Apelând la analiza elementală SEM-EDX s-a putut stabili că raportul Ca/P pentru fiecare probă sintetizată este în domeniul 1,65 – 1,68, ceea ce concordă cu datele din literatură unde se menționează că acest raport trebuie să fie în jurul valorii de 1,67.

- 4) Forma izotermelor ne oferă o primă informație privind tipul de porozitate a materialului. Astfel, izoterma de adsorbție pentru proba HA se prezintă sub forma unei curbe histerezis de tipul IV (în clasificarea IUPAC) prezentă la presiune p/po înaltă, caracteristică materialelor mezostructurate, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 1,5-1,8 nm și o suprafață specifică cuprinsă în intervalul 140-170 m²/g, așa cum reiese din analiza Brunauer-Emmett-Teller (BET) a probelor.

- 5) Studiul spectrelor FT-IR ale probelor analizate oferă informații privind grupările existente în structura hidroxiapatitei, respectiv grupările fosfat (PO_4^{3-}) și grupările hidroxil (OH^-). Grupările hidroxil (OH^-) din structura hidroxiapatitei au fost identificate prin picurile situate la 3575 cm⁻¹ și 638 cm⁻¹, iar intensitatea lor demonstrează un grad de cristalinitate ridicat.

Capitolul VII

OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROXIAPATITEI SUBSTITUITE CU CERIU

VII.1. Introducere

Structura hidroxiapatitei permite încorporarea unei game largi de substituții ionice. Numeroși cationi monovalenți (Na^+ , K^+), bivalenți (Sr^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , etc), trivalenți (Cr^{3+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , pământurile rare ioni REE^{3+} , etc), tetravalenți (Ti^{4+} , Th^{4+} , U^{4+}) și chiar cationi hexavalenți (U^{6+}) au fost raportați ca și substituienți în siturile de Ca din structura hidroxiapatitei (Elliot, 1994; Yasukawa și colab., 2012; Cox și colab, 2014; Guo și colab., 2009).

Prin aceste substituții pot fi obținute diferite nivele de morfologie, stoichiometrie și cristalinitate, în funcție de metodele utilizate pentru procesul de sinteză. Proprietățile materialelor de hidroxiapatită precum morfologia, parametrii de rețea, suprafața specifică, solubilitatea, proprietățile mecanice și biologice pot fi afectate de încorporarea cationilor străini. Beneficiul acestui dopaj în hidroxiapatită a fost raportat în ultimii ani în ceea ce privește aplicațiile medicale. Astfel, substituția hidroxiapatitei cu diverși cationi metalici (Zn^{2+} , Bi^{3+} , Al^{3+} , etc.) duce la creșterea adeziunii osteoblastelor, dezvoltând astfel proprietățile hidroxiapatitei ca și material pertinent pentru aplicații ortopedice și dentare (Sato și colab., 2006; Webster și colab., 2004).

În cadrul acestui capitol se prezintă rezultatele privind obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei nanometrice substituită cu ceriu (Ce^{4+}) prin metoda precipitării chimice din soluție.

În literatură există puține investigații legate de hidroxiapatită dopată cu ceriu (Leonelli și colab., 2003; Yasukawa și colab., 2012; Feng și colab., 2005; Lin și colab., 2007). În studiile anterioare, în rețeaua cristalină a hidroxiapatitei au fost introduși în timpul sintezei ionii de ceriu în stare Ce^{3+} . Totuși, înlocuirea ionului de calciu cu Ce^{4+} nu a fost studiat înainte.

Schimbul de ioni de calciu din rețeaua hidroxiapatitei cu ionii de ceriu (Ce^{3+} și / sau Ce^{4+}) este un subiect interesant în domeniul medical, de mediu și în cataliză. În general, compușii care conțin ioni de ceriu au fost folosiți în medicină ca agenți antibacterieni (Greenhalgh, 2009).

Principalele obiective urmărite în acest capitol au fost:

1) sinteza hidroxiapatitei nanometrice substituite cu ceriu - au fost realizate probe de hidroxiapatită substituită cu 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% și 75% ceriu prin metoda co-precipitării;

2) caracterizarea structural - morfologică a materialelor obținute apelând la metode și tehnici de analiză avansate și performante. Probele obținute au fost caracterizate fizico-chimic aplicând metode moderne precum:

- difracție 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 evidențierea principalelor grupări funcționale 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 substituită cu ceriu;

- 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);

- spectroscopia de fotoelectroni cu raze X (XPS) a fost realizată pentru a identifica starea de oxidare a nanoparticulelor de ceriu;

- spectroscopia de fluorescență ne oferă date legate de capacitatea de emisie sau de adsorbție a luminii, proprietățile optice ale probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu.

3) caracterizarea bacteriologică a probelor obținute - s-a testat activitatea bacteriologică a probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu pe bacteriile gram-pozitiv *Staphylococcus aureus* și gram-negativ *Escherichia coli*.

În ultimii ani a existat un interes deosebit în creșterea capacității terapeutice ale oxidului de ceriu la scară nanometrică pentru boli precum cancerul, boala Alzheimer, moartea celulelor induse de radiații și de îmbătrânire. Astfel, ca urmare a stării de valență, a proprietăților induse de defectele de oxigen (oxygen defect properties) și a capacității lor unice de a comuta între stări de oxidare III (Ce^{3+}) și IV (Ce^{4+}), nanoceria – activă redox prezintă o activitate antioxidantă foarte bună (Karakoti și colab., 2008; Alili și colab., 2011; Zhou și colab., 2014).

În special, s-a raportat că hidroxiapatita ceriu(III) - calciu prezintă proprietăți bacteriostatice similare cu cele ale argintului (Leonelli și colab., 2003; Yasukawa și colab., 2012; Feng și colab., 2005; Lin și colab., 2007).

Prin urmare, încorporarea ionilor de ceriu în rețeaua cristalină a hidroxiapatitei este importantă pentru dezvoltarea oaselor artificiale.

VII.2.Sinteza pulberii de hidroxiapatită substituită cu Ce(IV)

VII.2.1. Protocolul de obținere a hidroxiapatitei substituite cu Ce(IV)

Hidroxiapatita substituită cu ceriu a fost obținută prin metoda precipitării, în mod asemănător ca și sinteza hidroxiapatitei. S-a menținut raportul $\text{Ca}+\text{Ce} / \text{P} = 1,67$, precum și parametrii de sinteză.

Astfel, ca materii prime s-au folosit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sursa de Ca^{2+}), H_3PO_4 (sursa de PO_4^{3-}) și $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (sursa de ceriu). Au fost realizate probe de hidroxiapatită substituită cu 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% și 75% ceriu.

Tabelul VII.1. Rapoartele molare ale probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu

Denumire probă	Ca (mol)	Ce (mol)	P (mol)	Ce/Ce+Ca (mol)	Ca+Ce/P (mol)
HA II - Ce 1%	0,16533	0,00167	0,1	0,01	1,67
HA II - Ce 5%	0,15865	0,00835	0,1	0,05	1,67
HA II - Ce 10%	0,1503	0,0167	0,1	0,1	1,67
HA II - Ce 15%	0,142	0,025	0,1	0,15	1,67
HA II - Ce 20%	0,1336	0,0334	0,1	0,2	1,67
HA II - Ce 25%	0,12525	0,04175	0,1	0,25	1,67
HA II - Ce 50%	0,0835	0,0835	0,1	0,5	1,67
HA II - Ce 75%	0,04175	0,12525	0,1	0,75	1,67

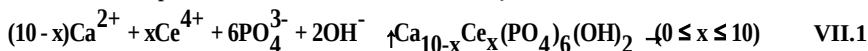
Procedeu de lucru:

Se prepară **soluția A** - se cântărește $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ la balanța analitică și se pune într-un pahar Berzelius cu 100 ml apă bidistilată. Soluția se lasă la agitat până când se dispersează complet. Peste soluția de ceriu se adaugă $\text{Ca}(\text{OH})_2$, cântărit de asemenea la balanța analitică.

Soluția B reprezintă soluția de H_3PO_4 , de concentrație 0,1 M - se măsoară cu o pipetă un volum de 6,29 ml H_3PO_4 concentrat, se transferă într-un flacon cotate de 100 ml și se aduce la cotă cu apă bidistilată.

În momentul în care soluția A ajunge la temperatura de 60 °C, se adaugă prin picurare soluția B, iar pH-ul soluției este menținut >10 cu NaOH de concentrație 1 M. După adăugarea soluției B, proba se lasă la această temperatură timp de 3h, sub agitare continuă.

În timpul sintezei are loc următoarea reacție:



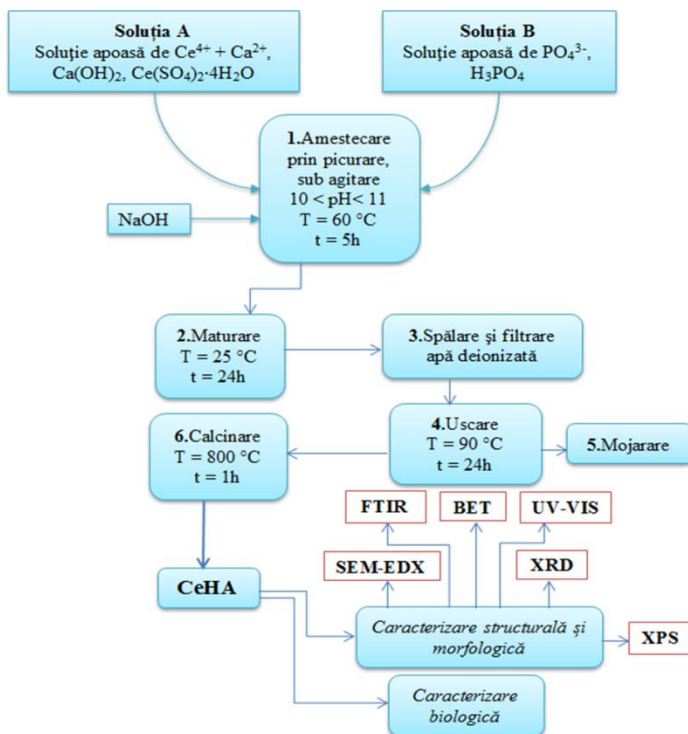


Figura VII.1. Schema de obținere a hidroxiapatitei substituită cu ceriu

După agitare probele se lasă la maturat timp de 24 h, după care, proba astfel obținută, se filtrează la vid și se spală cu apă bidistilată, apoi este supusă procesului de uscare la etuvă, la temperatura de 90 °C timp de 24 de ore.

După 24 h probele sunt mojarate cu un mojar cu pistil, după care sunt supuse procesului de calcinare la temperatura de 800 °C timp de 1 oră. În urma acestui proces se observă variații de culoare în funcție de cantitatea de ceriu adăugată.

Metoda coprecipitării prezintă o serie de avantaje și anume: se utilizează reactivi ușor 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 probă.

VII.3. Mecanismul de substituție

În general, înlocuirea ionului Ca^{2+} din rețeaua cristalină a hidroxiapatitei cu alți cationi induce schimbări în proprietățile acestora care pot fi legate de raza ionică, electronegativitatea și sarcina cationului care substituie, comparativ cu cele ale ionului Ca^{2+} . Goldschmidt (1937) a prezentat faptul că substituția preferențială de ioni poate să apară atunci când există o mică diferență între raze ionice care minimizează diferența de rezistență

a legăturii, atunci când un ion este substituit cu un altul. Substituția într-un cristal se consideră că este posibilă atunci când diferența razelor ionice este mai mică de 15%.

Atunci când sunt implicați ionii cu rază ionică similară, dar diferiți ca valență, substituirea unui element cu altul are loc, de preferință, în cazul în care valențele sunt egale, sau variază cu ± 1 unitate. În plus față de raza ionică și sarcina electrică, ionul cu electronegativitatea mai mare dintre cei doi ioni ar favoriza înlocuirea.

În studiul lor, Suzuki și colab. (1982) au ajuns la concluzia că substituția de cationi din structura hidroxiapatitei poate fi realizată de cationi cu electronegativitate mai mare și cu raze ionice cuprinse în intervalul 0,9 Å - 1,3 Å.

Structura cristalografică a hidroxiapatitei joacă un rol major în înlocuirea ionilor străini din rețeaua apatitică. Structura cristalină a hidroxiapatitei este hexagonală cu grupul spațial P63 / m și parametrii de rețea $a = b = 9,424$ Å și $c = 6,879$ Å (Gaines și colab., 1997; Klein și Dutrow, 2008).

Rețeaua hidroxiapatitei cuprinde doi atomi de calciu, cu diferite configurații cristaline notate cu Ca(1) și Ca(2). Atomii aflați în poziția Ca(1) ocupă poziții columnare (în pori) cu numărul de coordinare 9. Atomii din poziția Ca(2) sunt amplasați în canalele care trec prin rețeaua tridimensională a tetraedrului PO_4^{3-} și au numărul de coordinare 7.

Structura hidroxiapatitei cuprinde aproximativ 40% din atomii de calciu în poziția Ca(1) și aproximativ 60% din atomii de calciu aflați în poziția Ca(2) (Elliot, 1994). Cele două poziții de Ca din apatită pot oferi alte medii stereochemice și sunt capabile să primească o varietate de cationi ca substituenți (Fleet și colab., 2000). Teoretic, s-ar putea crede că ionii străini mai mari decât ionii Ca^{2+} ar înlocui în primul rând siturile Ca(1) în timp ce cele mai mici s-ar substitui preferențial pentru atomii din poziția Ca(2).

Unele cercetări referitoare la substituția calciului din structura hidroxiapatitei au arătat de asemenea că există o preferință în ceea ce privește locul de substituție a cationului în funcție de sarcina electrică. S-a constatat că ionul cu o sarcină electrică mai mică decât calciul ocupă în principal poziția atomilor Ca(1), în timp ce ionul cu o sarcină electrică mai mare ocupă mai compact poziția atomilor Ca(2) (Getman și colab., 2011).

Asimilarea de pământuri rare (REE sau seria lantanidelor) în hidroxiapatită este complexă, încorporarea elementelor are loc în funcție de situl/locație preferat determinată de factori intrinseci (mecanisme de substituție, găzduirea spațială, echilibrarea legăturii de valență) și externi (presiune, temperatura). Încorporarea ionilor pământurilor rare în structura hidroxiapatitei este favorabilă atunci când diferența dintre razele ionice este mică, apropiată de raza ionică a ionului Ca^{2+} (1,06 Å) (Shannon, 1976).

Astfel, datorită diferenței mici ($< 5\%$) dintre razele ionice ale ionului de Ca^{2+} (1,00 Å) și ale ionului ceric Ce^{4+} (0,97 Å) și ionului ceros (1,07 Å), aceștia din urmă pot substitui cu succes ionii de Ca^{2+} în timpul procesului de sinteză.

Potrivit lui Shannon (1976), razele ionice efective ale ionului Ca^{2+} pentru numărul de coordinare șapte și nouă sunt de 1,06 Å, respectiv 1,18 Å. Pentru ionul Ce^{3+} razele ionice sunt de 1,07 Å și 1,19 Å pentru numerele de coordinare șapte și respectiv nouă. Pentru Ce^{4+} razele ionice sunt de 0,87 Å, 0,97 Å și 1,07 Å pentru numerele de coordinare șase, opt și respectiv zece. Așa cum s-a discutat anterior, mărimea sitului ionului Ca(1) cu numărul de coordinare 9 este mai mare decât situl ionului Ca(2) cu numărul de coordinare 7.

În conformitate cu Elliott (1994), această diferență de mărime sugerează faptul că ionul Ce^{3+} fiind mai mare decât ionii de Ca^{2+} ar trebui să ocupe situl ionilor Ca(1), în timp ce locul ionilor Ca(2) ar trebui să fie ocupat preferențial de ionii Ce^{4+} , care sunt mai mici decât ionii de Ca^{2+} .

De asemenea, pentru că atât ionii Ce^{4+} cât și ionii Ce^{3+} au sarcini pozitive mai mari decât Ca^{2+} este necesară o substituție cuplată pentru a menține echilibrul de sarcină. Mai multe studii au arătat că cationii trivalenți și tetravalenți pot substitui ionii de Ca printr-un mecanism deficitar de Ca precum locurile vacante (Baumer și colab., 1983).

Astfel, compensarea locală a sarcinii în hidroxiapatită dopată cu ceriu poate fi menținută prin următoarele substituții cuplate ($\square$ reprezintă post vacant de oxigen):



Luând în considerare observațiile de mai sus, studiul de față are drept scop obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei substituită cu ceriu folosind sulfat ceric ($Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$), ca o sursă de ceriu cu ceriu în stare tetravalentă (Ce^{4+}).

Prin efectuarea analizelor DRX, SEM-EDX și analiza XPS am dorit să demonstrez că atât ionii Ce^{4+} , cât și ionii Ce^{3+} sunt prezenți în apatita substituită.

Existența speciei Ce^{3+} în probele de hidroxiapatită substituită cu ceriu poate fi explicată după cum urmează: în urma dopajului ionii Ce^{4+} nu sunt complet coordinați în rețeaua apatitică ducând astfel la formarea unor locuri vacante de oxigen în structura hidroxiapatitei, așa cum se observă în relația VII.6.

Ionii Ce^{4+} coordinați nesaturat existenți în cristalul dopat duc la posibilități interesante pentru reacțiile de încărcare-transfer în cazul în care ionii Ce^{4+} pot accepta un electron de la un anion de oxigen vecin sau un alt donator de electroni pentru a deveni Ce^{3+} (Carolus și colab., 1999). Acest lucru duce la schimbarea de valență de la $Ce^{4+} \rightarrow Ce^{3+}$ a doi cationi pentru fiecare post vacant și la o eficiență extraordinară în eliberarea reversibilă de oxigen. În aceste condiții, este posibil să se producă o reducere parțială a ionilor Ce^{4+} la Ce^{3+} în rețeaua apatitică.

VII.4. Caracterizarea structurală și morfologică a pulberilor obținute

VII.4.1. Compoziția chimică a probelor studiate

Analiza SEM-EDX a fost folosită pentru a determina compoziția suprafeței elementelor existente în probele de hidroxiapatită simplă și hidroxiapatită substituită cu ceriu. Toate probele conțin calciu sau/și ceriu, fosfor, oxigen și hidrogen în anumite proporții, fără a fi detectate alte elemente în probe.

Prin analizele SEM-EDX s-a obținut masa fracțiilor a diferitelor elemente din hidroxiapatită simplă și ceriu-hidroxiapatită, pe baza cărora s-a calculat raportul atomic prezentat în tabelul VII.2.

Tabelul VII.2 prezintă rapoartele atomice $Ce/(Ce+Ca)$ (X_{Ce}) în soluția sintetizată și în produsul final. Valorile X_{Ce} în particulele finale sunt foarte apropiate de valorile X_{Ce} din soluție pentru toate probele cu ceriu. Acest rezultat indică faptul că ionii de ceriu adăugați în timpul sintezei s-au încorporat cu succes în particulele de hidroxiapatită. Conținutul în ceriu din probele CeHA crește odată cu concentrația ceriului din soluțiile precursorare, în concordanță cu încorporarea cantitativă a ceriului în faza solidă. Acest lucru sugerează că are loc un proces favorabil de schimb ionic între ionii de ceriu și hidroxiapatită.

Tabelul VII.2. Rapoartele atomice din soluțiile sintetizate și din produsul final calcinat la 800 °C

Proba	În soluțiile sintetizate			În soluțiile finale		
	$\frac{\text{Ce}}{\text{Ce}+\text{Ca}}$	$\frac{\text{Ce}+\text{Ca}}{\text{P}}$	Concentrația ceriului (%)	$\frac{\text{Ce}}{\text{Ce}+\text{Ca}}$	$\frac{\text{Ce}+\text{Ca}}{\text{P}}$	Concentrația ceriului (%)
HA-Ce-0	0	1,677	0	0	1,673	0
HA-Ce-1	0,01	1,677	1	0,009	1,671	0,9
HA-Ce-5	0,05	1,677	5	0,048	1,669	4,8
HA-Ce-10	0,10	1,677	10	0,095	1,682	9,5
HA-Ce-15	0,15	1,677	15	0,146	1,685	14,6
HA-Ce-20	0,20	1,677	20	0,194	1,673	19,4
HA-Ce-25	0,25	1,677	25	0,247	1,671	24,7

Figura VII.2 prezintă spectrele EDX a probelor HA-Ce-0 și HA-Ce-25, iar pentru ultima probă sunt evidențiate picurile caracteristice ionului de ceriu.

Substituția izomorfă $\text{Ca} \leftrightarrow \text{Ce}$ nu afectează semnificativ structura probelor CeHA așa cum poate fi dedus din rapoartele atomice $(\text{Ce}+\text{Ca})/\text{P}$ și care presupune o valoare medie de $1,677 \pm 0,008$, foarte apropiată de valoarea stoichiometrică 1,67, independentă de conținutul de Ca și Ce. Pentru toate probele de hidroxiapatită substituită cu ceriu studiate analizele elementare arată că cantitatea reală de ceriu în rețeaua cristalină se află foarte aproape de concentrațiile ionice introduse inițial în soluție, așa cum se vede în tabelul VII.2.

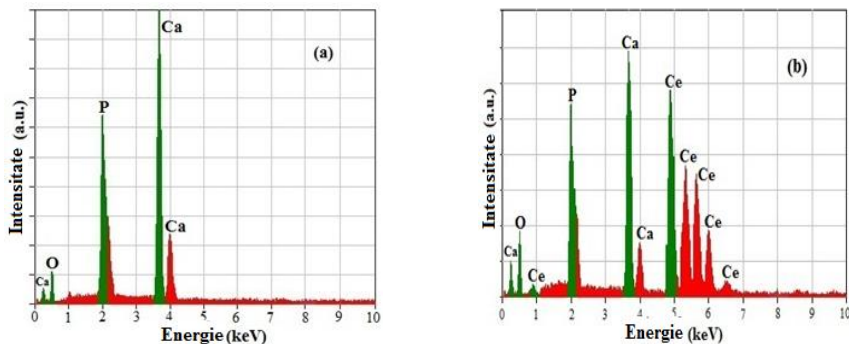


Figura VII.2. Spectrele EDX a probelor HA-Ce-0 și HA-Ce-25

VII.4.2. Morfologia cristalului

Înalta rezoluție microscopică SEM dezvăluie morfologia și dimensiunea eșantioanelor. Toate probele de apatită prezintă forme sferice și aglomerare cu micropori intergranulari, așa cum se arată în figura VII.3. Conținutul de Ce din apatită nu conduce la modificări dramatice în morfologie, însă prezintă o aglomerare mai bună. O posibilă explicație a acestei aglomerări este dată de proprietățile de suprafață dominante asociate cu

existența de cristale nano, care provoacă adunarea lor într-un mănunchi, după cum se observă în figura VII.3.

Atunci când probele sunt calcinate la temperaturi ridicate (800 °C), pentru a crește stabilitatea termică și chimică, particulele au tendința de a sinteriza în aglomerate formate din policristale (Bernache-Assollant și colab., 2003). Toate probele prezintă aceeași morfologie. Se poate observa că dimensiunea particulelor variază de la aproximativ 10 nm la 60 nm. Imaginile SEM relevă o scădere a dimensiunii cristalelor o dată cu creșterea conținutului de Ce, în acord cu datele EDX.

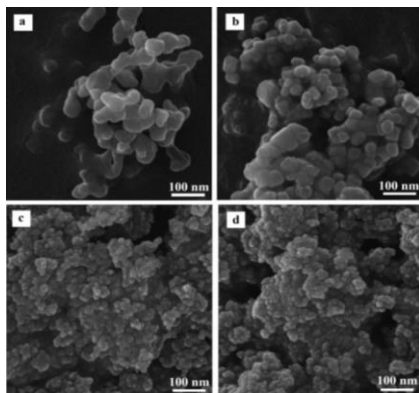


Figura VII.3.
Imagini SEM ale probelor
probelor calcinate
HA-Ce-0 (a),
HA-Ce-1 (b), HA-Ce-10 (c)
și HA-Ce-25 (d)

În ceea ce privește proprietățile optice, se pot observa diferențe de culoare, atât la probele calcinate cât și la cele necalcinate. Pentru probele necalcinate, se pornește de la culoarea albă a hidroxiapatitei, la culoarea ușor-galbenă / crem a probelor CeHA, în funcție de procentul de ceriu adăugat în sinteză (figura VII.4). Culoarea probelor este puternic afectată după calcinare la 800 °C. Pentru probele calcinate diferența de culoare începe de la albastru (HA simplă) la culoarea galben-verde, ceea ce sugerează prezența în probe a unei cantități mari de cationi Ce^{4+} (galben). Acest lucru poate fi corelat cu rezultatele analizei XPS care ne arată că Ce^{4+} este starea dominantă de la suprafața probelor.

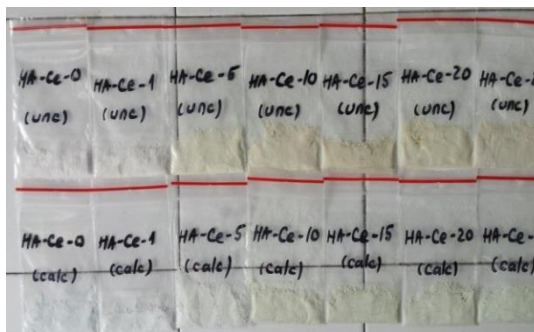


Figura VII.4. Imagini
optice ale probelor
necalcinate (a) și ale
probelor calcinate (b)

VII.4.3. Structura cristalinului

Prin analiza de difracție X (DRX) se poate determina compoziția fazei, parametrii de rețea, gradul de cristalinitate și mărimea cristalelor din pulberea de hidroxiapatită cu diferite rapoarte atomice Ce/(Ce+Ca). Rezultatele sunt prezentate în figura VII.5 și tabelul VII.3. Figura VII.5 arată picurile caracteristice hidroxiapatitei în regiunea unghiulară $2\theta = 21^\circ\text{--}29^\circ$, $32^\circ\text{--}34^\circ$, $39^\circ\text{--}41^\circ$, $46^\circ\text{--}54^\circ$ fiind în concordanță cu datele obținute prin JCPDS Data Card 09-0432. Poziția picurilor caracteristice nu se schimbă după doparea cu ceriu, ceea ce înseamnă că, fie înlocuirea cu Ce nu afectează puternic rețeaua de hidroxiapatită, fie sensibilitatea instrumentului DRX nu este atât de mare pentru a distinge diferențele.

Este important de observat că în studiile noastre am încercat să obținem probe substituie cu diferite concentrații de ceriu, dar am descoperit că la adăugarea ceriului în proporție mai mare de 25% intervin alte faze în compusul final. Cantități excesive de ceriu în soluția de sinteză duce la formarea de noi faze amorfe și de altă natură, cum ar fi oxidul de ceriu sau fosfați de ceriu.

Spectrele corespunzătoare probei HA-Ce-0 (Ce 0%) afișează picuri bine definite și ascuțite, în acord cu un grad ridicat de cristalinitate. Pe de altă parte, spectrele probelor care conțin atât calciu cât și ceriu prezintă în general picuri de difracție mai largi, caracteristice unui grad redus de cristalinitate a probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu (tabelul VII.3), ceea ce ar putea fi atribuit unui mecanism de compensare a sarcinii pentru substituția izomorfă a ionilor de Ca cu ionii de Ce.

Cristalinitatea scăzută a probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu ar putea duce în continuare la creșterea solubilității, contribuind astfel la eliberarea locală a ionilor de ceriu care poate îmbunătăți la rândul său biodegradabilitatea și proprietățile antibacteriene ale probelor (Feng și colab., 2005). De asemenea, vârfurile largi indică faptul că particulele de hidroxiapatită sunt de dimensiuni nanometrice. Dimensiunea medie a cristalelor de hidroxiapatita pură (proba HA-Ce-0) estimată folosind ecuația Scherrer a fost de 58,32 nm și pentru pulberile de hidroxiapatita substituită cu ceriu a fost mai mică de 50 nm (tabelul VII.3). Pentru toate probele dopate cu ceriu s-a observat o scădere în dimensiune cristalelor o dată cu creșterea conținutului de Ce, în acord cu datele EDX.

Tabelul VII.3. Gradul de cristalinitate (X_c), mărimea cristalelor (D), volumul celulei elementare (V), parametrii de rețea (a și c) a probelor calcinate de HA și CeHA obținute din spectrele XRD

Proba	D (nm)	X_c (%)	V (Å ³)	a (Å)	c (Å)
HA-Ce-0	58,32	99,78	1605,77	9,5271	6,8333
HA-Ce-1	46,83	98,89	1601,23	9,5155	6,8306
HA-Ce-5	40,82	98,71	1588,67	9,4834	6,8230
HA-Ce-10	27,22	98,77	1609,81	9,5374	6,8357
HA-Ce-15	24,74	98,58	1613,26	9,5472	6,8363
HA-Ce-20	22,07	97,41	1618,44	9,5593	6,8409
HA-Ce-25	19,81	92,35	1675,98	9,7038	6,8747

Parametrii de rețea a și c au fost obținuți de la picurile XRD corespunzătoare planelor (002) și (211), care se prezintă foarte bine și nu prezintă interferențe. După cum se poate vedea în tabelul VII.3, parametrii de rețea ale probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu crește lent cu un conținut mai mare de cationi de ceriu concomitent cu creșterea în volum a celulei elementare.

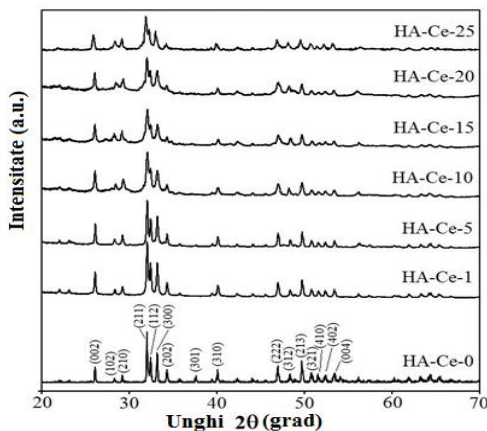


Figura VII.5.
Spectrele DRX pentru
probele de
hidroxiapatită simplă
și hidroxiapatită
substituită cu ceriu

Micile modificări ale parametrilor de rețea sunt datorate substituției ionilor de ceriu în ambele stări de oxidare Ce^{4+} și Ce^{3+} (așa cum s-a demonstrat prin studii XPS) pentru ionii de Ca^{2+} . Atunci când ionii de Ca^{2+} se înlocuiesc cu ioni mai mari are loc o schimbare importantă a parametrilor de rețea, și anume o creștere a valorii parametrilor a și c (Elliot, 1994). Raza atomică a ionului Ce^{3+} (1,19 Å) este mai mare decât cea a ionului Ce^{4+} (0,97 Å) și, prin urmare, extinderea lentă a rețelei este o consecință a reducerii unor ioni Ce^{4+} la Ce^{3+} . Prin urmare, rezultatele indică faptul că ionii de ceriu (Ce^{4+} și Ce^{3+}) s-au dopat cu succes în rețeaua hidroxiapatitei în condițiile de sinteză.

VII.4.4. Valența chimică a ionului de ceriu în produșii finali

De asemenea, rezultatele XPS demonstrează doparea cu succes a ionilor de ceriu în structura hidroxiapatitei. Figura VII.6 arată că studiul spectrului XPS al probei HA-Ce-25 s-a realizat în intervalul energetic 0-1200 eV, calibrat cu C 1s (285 eV) ca referință. Se poate observa că sunt detectate energiile de legătură ale ionilor de ceriu (3d, 860-930 eV), calciu (2p, 347 eV), oxigen (1s, 531 eV) și fosfor (2p, 133 eV) (semnalul C se datorează faptului că s-a folosit ca referință ionul de carbon), care pot fi atribuite probei HA-Ce-25.

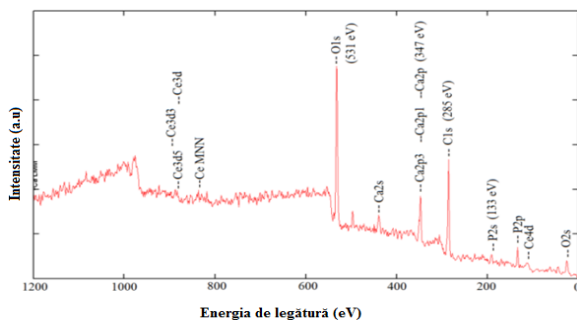


Figura VII.6. Spectrul XPS al probei calcinate HA-Ce-25

Spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS) a fost utilizată pentru a determina starea de oxidare a ionilor de ceriu în probele de hidroxiapatită substituită cu ceriu prin analiza spectrului Ce 3d la un grad de acuratețe foarte înalt. Acest lucru ne informează direct asupra compoziției cuplului redox $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ în produsele finale. Literatura indică faptul că spectrul Ce 3d poate fi descris în totalitate de cinci dubluri de orbitali spin ($3d_{5/2}$ și $3d_{3/2}$) și multitudinea acestori stări decurge din diferite nivele de ocupare a păturii Ce 4f în starea finală (Burroughs și colab., 1976).

Figura VII.7 și tabelul VII.4 ne arată regiunea Ce 3d pentru proba HA-Ce-25 în intervalul energetic 860-930 eV. Etichetele sunt conforme cu convenția stabilită de Burroughs și colab. (1976).

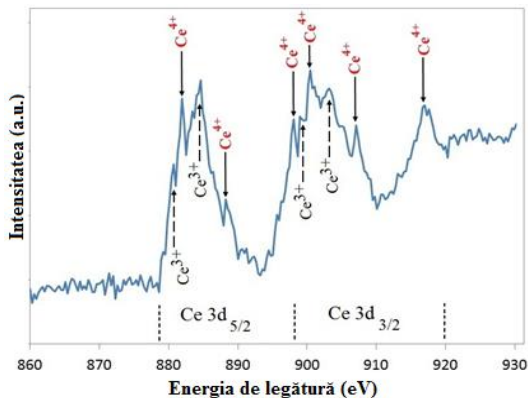


Figura VII.7.
XPS Ce 3d a probei
calcate HA-Ce-25

Tabelul VII.4. Spectrul Ce 3d a probei calcate HA-Ce-25

Stare Ce	Etichetele picurilor	Poziția picurilor (eV)	Caracteristicile picurilor	Starea finală (Burroughs și colab., 1976)
Ce(IV)	U	900,5	$3d_{3/2}$	$\text{Ce}(3d^9 4f^2)\text{O}_2\text{p}^4$
	V	881,9	$3d_{5/2}$	
	U''	907,1	$3d_{3/2}$	
	V''	888,2	$3d_{5/2}$	$\text{Ce}(3d^9 4f^1)\text{O}_2\text{p}^5$
	U'''	917,0	$3d_{3/2}$	
	V'''	898,1	$3d_{5/2}$	
Ce(III)	U ⁰	880,7	$3d_{3/2}$	$\text{Ce}(3d^9 4f^1)\text{O}_2\text{p}^6$
	V ⁰	899,0	$3d_{5/2}$	
	U'	903,2	$3d_{3/2}$	
	V'	884,6	$3d_{5/2}$	$\text{Ce}(3d^9 4f^1)\text{O}_2\text{p}^5$

Conform cu literatura (Beche și colab., 2008; Burroughs și colab., 1976) valorile energiei de legătură din tabelul VII.4 sunt specifice cu cele ale speciilor ce conțin ionul Ce^{4+} ($3d_{5/2} = 881,9\text{eV}$, $888,2\text{eV}$, $898,1\text{eV}$ și $3d_{3/2} = 900,5\text{eV}$, $907,1\text{eV}$, $917,0\text{eV}$), dar și cu cele ale speciilor ce conțin ionul Ce^{3+} ($3d_{5/2} = 884,6\text{eV}$, $899,0\text{eV}$ și $3d_{3/2} = 880,7\text{eV}$, $903,2\text{eV}$). Pentru toate probele de hidroxiapatită substituită cu ceriu s-au obținut spectre XPS

asemănătoare. Aceste rezultate sugerează existența ambelor stări de oxidare ale ionului de ceriu, Ce^{4+} și Ce^{3+} (ca și cuplu redox Ce^{4+}/Ce^{3+}), pe suprafața probelor de CeHA.

De asemenea, analiza XPS a fost efectuată cu scopul de a estima conținutul de Ce^{3+} și Ce^{4+} existent în probele CeHA. Concentrația ionului Ce^{3+} poate fi determinată cu ecuația (Beche și colab., 2008):

$$Ce^{3+} \% = \frac{A_{Ce(III)}}{A_{Ce(III)} + A_{Ce(IV)}} \cdot 100 \quad \text{VII.8}$$

unde, $A_{Ce(III)}$ și $A_{Ce(IV)}$ reprezintă suma corespunzătoare picurilor integrate ale ionilor Ce^{3+} și Ce^{4+} , respectiv semnalele XPS.

Rezultatele ne indică faptul că în probele CeHA (calcinate) se găsește un procent mai mare de Ce^{3+} , respectiv: 40,191% în proba HA-Ce-1 și 40,330% în proba HA-Ce-25. Procentul mare de ioni de Ce^{3+} indică faptul că rețeaua este bogată în locuri vacante de oxigen. Astfel, în ciuda unui număr apreciabil de ioni Ce^{3+} din cristale, nanoparticulele își mențin structura apatitică, așa cum reiese din rezultatele DRX.

VII.4.5. Caracterizarea texturală și proprietățile suprafeței specifice

Proprietățile suprafeței specifice a probelor CeHA au fost determinate prin metoda Brunauer-Emmett-Teller (BET), ecuația izotermei de adsorbție N₂, și rezultatele sunt prezentate în tabelul VII.5.

Distribuția Barrett-Joyner-Halenda (BJH) indică o textură micro (diametrul porilor < 2 nm) și mezoporoasă (2 - 10 nm) pentru ambele probe. Rezultatele arată că doparea cu ioni de ceriu nu a modificat structura hidroxiapatitei, în ceea ce privește textura de bază a porilor, și anume textura mezoporoasă.

Analiza BET corelează foarte bine rezultatele cu rapoartele atomice X_{Ce} ale probelor dopate. S-a observat o ușoară creștere a suprafeței probelor CeHA odată cu creșterea cantității de ceriu adăugată în probă. Valoarea BET mai mare pentru proba HA-Ce-25 poate fi din cauza dimensiunii mai mici a particulelor primare, precum și datorită unei porozități interne.

Tabelul VII.5. Proprietățile suprafeței specifice a probelor calcinate CeHA

Proba	Suprafața specifică (m ² /g)	Suprafața externă (m ² /g)	Volumul total al porilor (cm ³ /g)	Dimensiunea porilor (nm)
HA-Ce-0	139,365	45,454	0,098	1,181
HA-Ce-1	126,249	39,601	0,104	1,182
HA-Ce-5	121,093	33,784	0,131	1,176
HA-Ce-10	119,538	29,451	0,147	1,173
HA-Ce-15	128,602	37,873	0,169	1,167
HA-Ce-20	154,558	45,092	0,198	1,160
HA-Ce-25	169,901	54,649	0,235	1,157

Figura VII.8 rezumă rezultatele adsorbției N₂ și distribuția porilor caracteristice pentru probele HA-Ce-0 și HA-Ce-25 calcinate la 800 °C. Conform clasificării IUPAC toate

probele arată o izoterma de adsorbție de tip IV cu o curbă histerezis H1, demonstrând astfel proprietăți tipice pentru materiale mezoporoase.

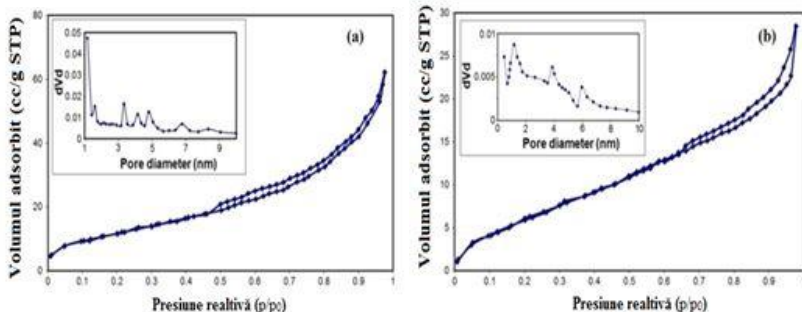


Figura VII.8. Izoterma de adsorbție și distribuția porilor a probelor calcinate la 800 °C HA-Ce-0 (a) și HA-Ce-25 (b)

VII.4.6. Spectroscopie în IR cu transformată Fourier (FT-IR)

Spectrele FT-IR obținute pentru hidroxiapatită pură și pulberile de hidroxiapatită substituită cu ceriu sunt date în figura VII.9. Aceste spectre oferă o serie de detalii spectrale ce demonstrează formarea hidroxiapatitei. Spectrul hidroxiapatitei pure (HA-Ce-0) arată benzile de la 1093 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} și 962 cm^{-1} ca urmare a modului de întindere P-O, în timp ce benzile cu numărul de undă la 601 cm^{-1} , 567 cm^{-1} și 472 cm^{-1} sunt datorate legăturii O-P-O. Benzile de la 2146 cm^{-1} -1996 cm^{-1} sunt atribuite ionilor PO_4^{3-} .

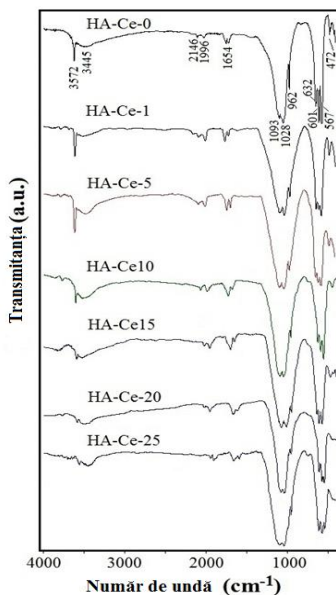


Figura VII.9. Spectrele FT-IR ale probelor de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu ceriu calcinate la 800 °C

O concentrație semnificativă a grupării OH^- există în structura apatitei așa cum s-a observat din intensitatea benzilor la 3572 cm^{-1} și 632 cm^{-1} . Benzile apei moleculare și apei adsorbite sunt, de asemenea, observate la 1654 cm^{-1} și 3446 cm^{-1} (ca o bandă largă). Toate benzile menționate anterior sunt principalele benzi tipice de hidroxiapatită, așa cum apare în literatură (Elliot și colab., 1994; Santos și colab., 2004). Spectrul FT-IR arată vârfurile carbonat în intervalul $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ ceea ce indică faptul că nu a existat nici o formare de carbonat de calciu sau oxid de calciu în probe.

Probele de hidroxiapatită substituită cu ceriu arată structuri similare cu hidroxiapatita pură (Yasukawa și colab., 2012; Feng și colab., 2005). Cu toate acestea, se poate observa că picurile caracteristice legăturilor O-H și P-O descresc treptat cu creșterea cantității de ceriu în rețeaua apatitică. Astfel, se poate observa că intensitatea atribuită benzii la 3572 cm^{-1} atribuită grupării OH^- scade fără schimbări în numărul de undă. Prin urmare, aciditatea suprafeței grupării P-OH a fost redusă prin înlocuirea ionilor Ca^{2+} cu Ce^{4+} / Ce^{3+} . Slăbirea benzii grupării OH^- ar putea fi cauzată de existența unui dezechilibru al sarcinii electrice în rețeaua apatitică datorită substituirii ionilor de Ca^{2+} cu Ce^{4+} / Ce^{3+} . Pentru a compensa aceste sarcini pozitive, gruparea OH^- ar putea fi transformată în O^{2-} , așa cum este sugerat de către Serret și colab., (2000). Slăbirea benzii PO_4^{3-} ar putea rezulta din introducerea cuplului Ce^{4+} / Ce^{3+} și modificarea ulterioară a forței de legătură dintre ionii care duc la slăbirea vibrațiilor legăturilor O-P și O-P-O (Feng și colab., 2005).

Din analizele FT-IR, SEM-EDX, XPS și DRX poate fi trasă concluzia că ionii de ceriu (Ce^{4+} și Ce^{3+}) sunt de fapt dopați în rețeaua hidroxiapatitei. Rezultatele experimentale arată că substituția cu ceriu afectează cristalinitatea, dimensiune cristalelor, proprietățile texturale și de suprafață ale hidroxiapatitei. Hidroxiapatita pură prezintă cristale bine formate. Având în vedere creșterea conținutului de ceriu cristalele au devenit din ce în ce mai mici formând aglomerate datorate modificării dimensiunii cristalelor. Pe lângă acest lucru, cristalinitatea lor scade.

VII.4.7. Spectroscopia de fluorescență

Ionii Ce^{3+} și Ce^{4+} pot fi deosebiți pe baza proprietăților de luminescență. În cele mai multe cazuri ionii Ce^{3+} oferă luminescență foarte puternică corespunzătoare tranzițiilor de la stările din configurația $5d_1$ la starea de bază $2f_7$ a configurației $4f_1$. Pe de altă parte, ionii Ce^{4+} , arată un puternic transfer de excitație în domeniul ultraviolet (UV) / violet, prezentând rareori semne de luminescență. Compușii ce conțin ionii de Ce^{4+} pot fi utilizați ca filtre eficiente pentru regiunile UVA și UVB (Goubin și colab., 2004).

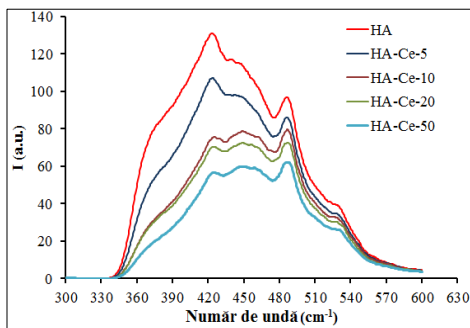


Figura VII.10.
Spectrele de luminescență
ale probelor de hidroxiapatită
simplă și hidroxiapatită
substituită cu ceriu

Figura VII.10 ne prezintă spectrele de luminescență ale probelor și ne demonstrează faptul că odată cu creșterea cantității de ceriu din structura hidroxiapatitei are loc o scădere a intensității semnalelor optice, acest lucru putând fi explicat prin existența ionului Ce^{4+} în structură, la suprafață, iar ionul Ce^{3+} substituie ioni de Ca (1) poziționați în interiorul celei elementare.

VII.4.9. Caracterizarea bacteriologică a materialelor

În cazul probelor de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu ceriu s-a utilizat ca metodă de testare, metoda difuzimetrică (testul Kirby Bauer Disk Diffusion) (Bauer și colab., 1966).

Mediul Sabouraud agarizat a fost repartizat în plăci Petri (aproximativ 20 ml mediu Sabouraud) și înșămânțat cu inoculul bacterian (10^8 bacterie/mL), cu ajutorul unui tampon de vată steril, astfel încât să se obțină o dispersare uniformă a celulelor bacteriene pe suprafața mediului. Pe fiecare placă Petri s-a poziționat central proba studiată. În paralel, s-a montat un martor pentru fiecare bacterie testată care conține doar mediul de cultură și inoculul bacterian, cu rol de control pozitiv al dezvoltării. Imediat, plăcile au fost incubate timp de 18 h la temperatura de $35 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, în condiții atmosferice (ambientale). După această perioadă, activitatea antibacteriană a materialelor testate a fost determinată prin măsurarea diametrului zonelor de inhibiție al dezvoltării.

Metoda difuzimetrică se bazează pe proprietatea substanțelor de a difuza în medii solide de cultură realizând concentrații diferite care scad treptat de la locul de depunere spre marginea zonei de difuzie.

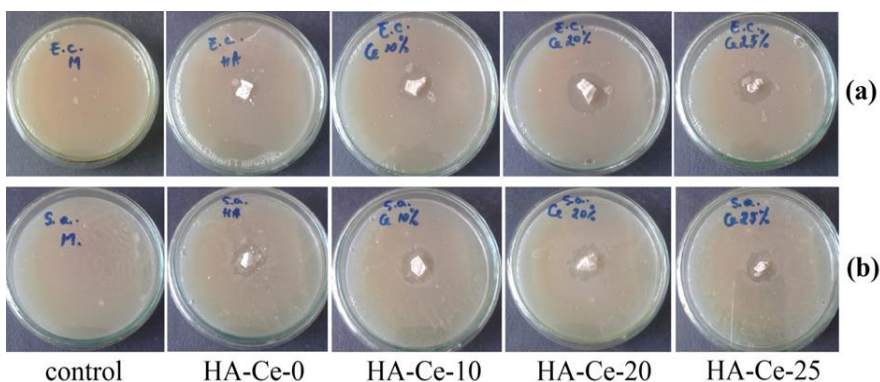


Figura VII.9. Testarea activității bacteriologice a probelor studiate pe tulpini de *Escherichia coli*(a) și *Staphylococcus aureus* (b)

După 18 de ore de incubare, probele pe bază de hidroxiapatită simplă și hidroxiapatită substituită cu ceriu au prezentat o sensibilitate bacteriană bună - zone de inhibiții de peste 50%. După cum se poate observa din figura VII.10 și din tabelul VII.5 gradul de dezvoltare microbiană scade odată cu creșterea cantității de ceriu din probă, comparativ cu proba martor al fiecărei bacterii. De asemenea se poate observa că microorganismul *Escherichia coli* prezintă o sensibilitate ridicată față de probele substituite cu ceriu și o ușoară creștere față de microorganismul *Staphylococcus aureus*.

Aceste rezultate demonstrează faptul că pulberile de hidroxiapatită substituită cu ceriu sunt mai eficiente împotriva bacteriilor gram-negative decât împotriva bacteriilor gram-pozitive. Se observă că activitatea antibacteriană de inhibare este mai mare în cazul tulpinilor bacteriene gram-negative pentru probele de hidroxiapatită substituite cu ceriu și crește odată cu creșterea concentrației de Ce în hidroxiapatită. Acest lucru ar putea indica faptul că, creșterea concentrației ceriului ar putea induce o sarcină de suprafață pozitivă pe nanoparticulele apatitice.

Tabelul VII.5. Inhibiția microbiană a probelor studiate față de tulpina patogenă *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*

Denumire probă	Diametrul zonei de inhibiție, (mm)	Ce/Ce+Ca	Inhibiție microbiană, (%)
<i>Escherichia coli</i>			
Martor	90	0,00	0,00
HA-Ce-0	14,787	0,00	16,43
HA-Ce 10	21	0,1	31,38
HA-Ce 20	48	0,2	53,33
HA-Ce 50	22,5	0,5	93,75
<i>Staphylococcus aureus</i>			
HA-Ce-0	73,33	0,00	81,48
HA-Ce-10	23,5	0,10	29,01
HA-Ce-20	24,5	0,20	34,03
HA-Ce-50	20	0,50	60,61

* La calculul procentual al inhibiției microbiene s-a ținut cont de masa de substanță luată în lucru care a fost raportată la 0,5 g probă și de diametrul zonei de inhibiție.

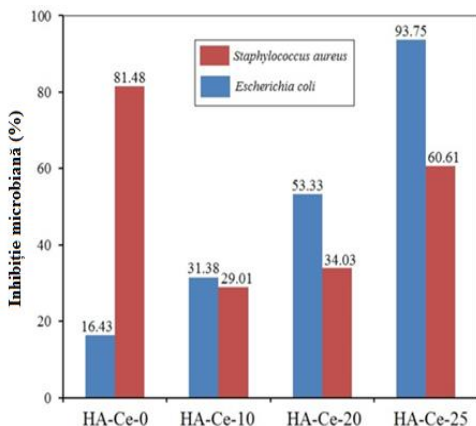


Figura VII.10. Inhibiția microbiană a probelor studiate

După cum dezvăluie și figura VII.10, nivelul creșterii microbiene a ambelor bacterii variază în mod diferit cu creșterea cantității de Ce în probe, raportate la proba pură

de hidroxiapatită. Bacteria *Escherichia coli* prezintă sensibilitate mare la probele substituie cu ceriu în timp ce bacteria *Staphylococcus aureus* are o sensibilitate mai mare la proba pură de hidroxiapatita.

VII.5. Concluzii:

În cadrul acestui capitol s-a urmărit **obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei substituie cu ceriu** sub formă de pulbere cristalină și de puritate ridicată, aplicând metoda precipitării chimice din soluție. Ținând cont de rezultatele obținute se pot trage următoarele concluzii:

- 1) Metoda bazată pe **reacții de precipitare** a fost folosită cu succes pentru a obține pulberi cristaline, nanometrice de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituie cu ceriu ($\text{Ca}_{10-x}\text{Ce}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $x = 0-7,5$), utilizând ca materiale: sursă de calciu - hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), acid orthofosforic (H_3PO_4) ca sursă de fosfor, și sulfat de ceriu ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ca sursă de ceriu.

- 2) Analizele DRX, SEM, SEM-EDX și XPS confirmă obținerea de hidroxiapatită simplă și substituie, ionul de ceriu (IV) fiind încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei. De asemenea, imaginile SEM ne arată faptul că ionul tetravalent de ceriu s-a încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei, obținându-se astfel un material poros, alcătuit din particule micro- (diametrul porilor < 2 nm) și macroporoase (2 - 10 nm). Această caracteristică poate fi utilă în folosirea materialului ca și transportor de medicamente în organism.

- 3) Astfel, analiza XPS ne arată reducerea unora dintre ionii Ce^{4+} la Ce^{3+} , având loc o extindere lentă a rețelei prin mărirea parametrilor de rețea a și c . Prin urmare, rezultatele indică faptul că ionii de ceriu (Ce^{4+} și Ce^{3+}) s-au dopat cu succes în rețeaua hidroxiapatitei în condițiile de sinteză ceea ce constituie un factor decisiv în rolul terapeutic al materialului. Ionul Ce^{3+} prezintă activități antibacteriene, și joacă un rol important în prevenția unor boli, precum cancerul și boala Alzheimer.

- 4) Toate spectrele DRX prezintă linii de difracție caracteristice hidroxiapatitei, conform standardelor și literaturii de specialitate. Faza majoră, așa cum era de așteptat, este hidroxiapatita, confirmată prin comparația cu datele obținute prin JCPDS Data Card 09-0432 (pentru hidroxiapatită). Spectrele corespunzătoare probei HA-Ce-0 (Ce 0%) afișează picuri bine definite și ascuțite, în acord cu un grad ridicat de cristalinitate. Pe de altă parte, spectrele probelor care conțin atât calciu cât și ceriu prezintă în general picuri de difracție mai largi, caracteristice unui grad redus de cristalinitate a probelor de hidroxiapatită substituie cu ceriu, însă cu particule micro- și mezoporoase, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 1,5-1,8 nm și o suprafață specifică cuprinsă în intervalul 140-170 m^2/g , așa cum reiese din analiza Brunauer-Emmett-Teller (BET) a probelor.

- 5) Analiza FT-IR indică faptul că nu există diferențe semnificative între spectrul hidroxiapatitei pure și cel al hidroxiapatitei substituie cu ceriu, fără să existe numere de undă mai mari sau mai mici. Spectrele FT-IR arată că ionii de ceriu încorporați în rețeaua de hidroxiapatită implică o reducere a acidității de pe suprafața apatitică, respectiv o reducere a grupărilor P-OH.

- 6) Spectroscopia de fluorescență și spectroscopia UV-Vis ne prezintă proprietățile optice ale probelor, demonstrându-ne existența în structura hidroxiapatitei a cuplului redox $\text{Ce}^{4+} / \text{Ce}^{3+}$.

- 7) Activitatea bacteriologică a probelor a fost studiată pe tulpini de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În cazul probelor de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituie cu ceriu s-a utilizat ca metodă de testare, metoda difuzimetrică (testul Kirby

Bauer Disk Diffusion). S-a demonstrat astfel că gradul de dezvoltare microbiană scade odată cu creșterea cantității de ceriu din probă, comparativ cu proba martor al fiecărei bacterii. De asemenea, se poate observa că microorganismul gram-negativ *Escherichia coli* prezintă o sensibilitate ușor ridicată față de probele substituite cu ceriu comparativ cu microorganismul gram-pozitiv *Staphylococcus aureus*. Datorită proprietăților bioactive pe care le prezintă, aceste nanopulberi pot fi considerate promițătoare în utilizarea lor ca și agenți antibacterieni.

Capitolul VIII

OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA HIDROXIAPATITEI SUBSTITUITĂ CU BISMUT

VIII.1. Introducere

De mai bine de un secol sărurile de bismut au fost folosite ca un remediu pentru anumite maladii, cum ar fi tulburările gastro-intestinale, sifilis și hipertensiune (Marshall, 1991). Astăzi, compușii cu bismut au două utilizari medicale majore, ca și agent antimicrobian și agent anticancerigen (Yang și colab., 2007). Compușii cu bismut, din cauza radio-opacității lor, sunt, de asemenea, adăugați la diverse implanturi osoase și dentare, catetere și instrumente chirurgicale, în scopul de a le face detectabile/vizibile prin analiza de raze X și tomografia computerizată (Stoltenberg și colab., 2007).

În literatura de specialitate disponibilă, doar câteva studii sunt dedicate pentru fosfați de calciu dopați cu ioni de bismut (Chen și colab., 2010; Webster și colab., 2004; Shanmugam și colab., 2014). Prin urmare, în această lucrare se prezintă sinteza de noi nanopulberi de hidroxiapatită substituită cu bismut prin metoda chimică umedă, respectiv prin reacții de co-precipitare. Au fost investigate și discutate efectele substituției ionului de calciu cu ionul de bismut asupra morfologiei, purității, cristalinității, dimensiunii cristalelor și activitatea antibacteriană a pulberilor de hidroxiapatită substituită cu bismut.

Principalele obiective urmărite în acest capitol au fost:

1) sinteza hidroxiapatitei nanometrice substituite cu bismut - au fost realizate probe de hidroxiapatită substituită cu 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% și 75% bismut prin metoda co-precipitării;

2) caracterizarea structural - morfologică a materialelor obținute apelând la metode și tehnici de analiză avansate și performante. Probele obținute au fost caracterizate fizico-chimic aplicând metode moderne precum:

- difracție de raze X (DRX) în vederea stabilirii gradului de cristalinitate, a dimensiunii cristalelor și identificarea fazelor cristaline din materialul pulverulent;
- spectroscopie în IR cu transformată Fourier (FT-IR) pentru evidențierea principalelor grupări funcționale 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 substituită cu bismut;

-Spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS) a fost utilizată pentru a determina starea de oxidare a ionilor de bismut în probele de hidroxiapatită substituită cu bismut.

3) caracterizarea bacteriologică a probelor obținute - s-a testat activitatea bacteriologică a probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu pe bacteriile gram-pozitiv *Staphylococcus aureus* și gram-negativ *Escherichia coli*.

VIII.2. Sinteza hidroxiapatitei substituie cu Bi (III)

VIII.2.1. Protocolul experimental de obținere a hidroxiapatitei substituie cu bismut (BiHA)

Hidroxiapatita substituie cu bismut a fost obținută prin metoda precipitării, în mod asemănător ca și sinteza hidroxiapatitei. S-a menținut raportul $\text{Ca}+\text{Bi} / \text{P} = 1,67$, precum și parametrii de sinteză. S-au realizat probe de hidroxiapatită substituie cu 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% și 75% bismut.

Astfel, ca materii prime s-au folosit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sursa de Ca^{2+}), H_3PO_4 (sursa de PO_4^{3-}) și $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sursa de bismut). Au fost realizate probe de hidroxiapatită substituie cu 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% și 75% bismut.

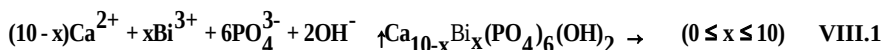
Procedul de lucru:

Se prepară **soluția A** - se cântărește $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ la balanța analitică și se pune într-un pahar Berzelius cu 100 ml apă bidistilată. Soluția se lasă la agitat până când se dispersează complet. Peste soluția de bismut se adaugă $\text{Ca}(\text{OH})_2$, cântărit de asemenea la balanța analitică.

Soluția B reprezintă soluția de H_3PO_4 , de concentrație 0,1 M - se măsoară cu o pipetă un volum de 6,29 ml H_3PO_4 concentrat, se transferă într-un flacon cotate de 100 ml și se aduce la cotă cu apă bidistilată.

În momentul în care soluția A ajunge la temperatura de 60 °C, se adaugă prin picurare soluția B, iar pH-ul soluției este menținut >10 cu NaOH de concentrație 10M. După adăugarea soluției B, proba se lasă la această temperatură timp de 5 h, sub agitare continuă. Se lasă apoi la maturat 24 h, după care, proba astfel obținută, se filtrează la vid și se spală cu apă bidistilată, apoi este supusă procesului de uscare la etuvă, la temperatura de 90 °C timp de 24 de ore.

În timpul sintezei are loc următoarea reacție:



VIII.2.2. Metode de caracterizare a pulberii de hidroxiapatită substituie cu bismut

Materialele obținute în cercetările efectuate au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic și compozițional prin următoarele tehnici de analiză:

- microscopie electronică cu baleiaj (SEM) cuplată cu spectroscopie de raze X prin dispersie de energie (EDX);
- analiză prin difracție de raze X (DRX);
- spectroscopie în infraroșu (FTIR);
- spectroscopie fotoelectronica cu raze X (XPS);
- spectroscopie de fluorescență;
- spectroscopie UV-Vis.

Morfologia probelor a fost studiată prin microscopie electronică cu baleiaj (SEM) cuplată cu spectroscopia de dispersie de energie cu raze X (EDX) cu microscop 3D QUANTA 200.

Pulverizarea cu aur a fost folosită pentru a realiza suprafețele de acoperire conductoare pentru investigațiile SEM. Valența chimică a ceriului pe structura hidroxiapatitei a fost evaluată prin spectroscopie fotoelectronica cu raze X (XPS) folosind un spectrometru PHI VersaProbe - 5000 photoelectron (Φ ULVAC - PHI, INC) cu un analizor de energie semisferică (0,85 eV rezoluția energiei de legătură). Un radiație monocromatică Al K α de raze X ($h \cdot \nu = 1486,7$ eV) a fost utilizată ca sursă de excitație. Compoziția chimică a fiecărei probe a fost analizată utilizând o combinație între analizele XPS și SEM / EDX.

Cu aceste metode au fost determinate conținutul de Ca, P și Bi din eșantioane, din care s-au calculat rapoartele atomice Ca / P și Bi + Ca / P. Spectrele FT-IR ale probelor au fost realizate prin metoda KBr folosind un spectrofotometru Digilab SCIMITAR - SERIES.

VIII.3. Mecanismul de substituție

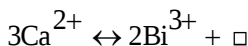
Înlocuirea ionului Ca²⁺ cu alți cationi din rețeaua cristalină a hidroxiapatitei induce schimbări în proprietățile acesteia care pot fi legate de raza ionică, electronegativitatea și încărcătura efectivă a cationului de substituție în comparație cu cele ale ionului Ca²⁺. Suzuki și colab. au studiat hidroxiapatita ca schimbători de cationi anorganici și au tras concluzia că acei cationi care au valori ridicate ale electronegativității și a razelor ionice în intervalul 0,9-1,3 Å sunt mai susceptibili de a fi eliminați din structura hidroxiapatitei.

Structura hidroxiapatitei cuprinde aproximativ 40% din atomii de calciu în poziția Ca(1) și aproximativ 60% din atomii de calciu aflați în poziția Ca(2) (Elliot, 1994). Cele două poziții de Ca din apatită pot oferi alte medii stereochemice și sunt capabile să primească o varietate de cationi ca substituenți (Fleet și colab., 2000). Teoretic, s-ar putea crede că ionii străini mai mari decât ionii Ca²⁺ ar înlocui în primul rând siturile Ca(1) în timp ce cele mai mici s-ar substitui preferențial pentru atomii din poziția Ca(2).

Unele cercetări referitoare la substituția calciului din structura hidroxiapatitei au arătat de asemenea că există o preferință în ceea ce privește locul de substituție a cationului în funcție de sarcina electrică. S-a constatat că ionul cu o sarcină electrică mai mică decât calciul ocupă în principal poziția atomilor Ca(1), în timp ce ionul cu o sarcină electrică mai mare ocupă mai compact poziția atomilor Ca(2) (Getman și colab., 2011).

Încorporarea ionului Bi³⁺ în structura hidroxiapatitei este favorabilă atunci când diferența dintre razele ionice este mică, apropiată de raza ionică a ionului Ca²⁺. Potrivit lui Shannon (1976) razele ionice efective ale ionului Ca²⁺ pentru numărul de coordinare șapte și nouă sunt de 1,06 Å, respectiv 1,18 Å. Pentru Bi³⁺ razele ionice sunt de 1,03 Å și 1,17 Å pentru numărul de coordinare șase, respectiv opt. Având dimensiuni comparabile, ionii Bi³⁺ pot substitui ionii de Ca²⁺ în timpul procesului de sintetizare.

De asemenea, pentru că ionii Bi³⁺ cât au sarcini pozitive mai mari decât ionii Ca²⁺ este necesară o substituție cuplată pentru a menține echilibrul de sarcină. Mai multe studii au arătat că cationii trivalenți pot substitui ionii de Ca printr-un mecanism deficitar de Ca precum locurile vacante (Baumer și colab., 1983). Astfel, compensarea locală a sarcinii în hidroxiapatită dopată cu bismut poate fi menținută prin următoarele substituții cuplate ($\square$ reprezintă post vacant de oxigen):



VIII.2

Luând în considerare observațiile de mai sus, studiul de față are drept scop obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei substituită cu bismut folosind azotat de bismut pentahidrat $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ca o sursă de bismut în stare trivalentă (Bi^{3+}). Prin efectuarea analizelor DRX, SEM-EDX și analiza XPS am dorit să demonstrez că ionii Bi^{3+} sunt prezenți în apatita substituită.

VIII.4. Caracterizarea structurală și morfologică pulberii de hidroxiapatită substituită cu bismut

VIII.4.1. Compoziția chimică a probelor studiate

Analiza SEM-EDX a fost folosită pentru a determina compoziția suprafeței elementelor existente în probele de hidroxiapatită substituită cu bismut. Toate probele conțin calciu sau / și bismut, fosfor, oxigen și hidrogen în anumite proporții, fără a fi detectate alte elemente în probe.

Prin analiza SEM-EDX s-a obținut masa fracțiilor a diferitelor elemente din bismut-hidroxiapatită, pe baza cărora s-a calculat raportul atomic prezentat în tabelul VIII.2.

Tabelul VIII.2. Rapoartele atomice din soluțiile sintetizate și din produsul final calcinat la 800 °C

Proba	În soluțiile sintetizate			În soluțiile finale		
	$\frac{\text{Bi}}{\text{Bi} + \text{Ca}}$	$\frac{\text{Bi} + \text{Ca}}{\text{P}}$	Concentrația bismutului (%)	$\frac{\text{Bi}}{\text{Bi} + \text{Ca}}$	$\frac{\text{Bi} + \text{Ca}}{\text{P}}$	Concentrația bismutului (%)
HA-Bi-0	0	1,677	0	0	1,673	0
HA-Bi-5	0,05	1,677	5	0,0498	1,666	4,98
HA-Bi-10	0,10	1,677	10	0,0933	1,660	9,33
HA-Bi-15	0,15	1,677	15	0,1449	1,671	14,49
HA-Bi-25	0.25	1,677	25	0,2443	1,683	24,43

Tabelul VIII.2 prezintă rapoartele atomice $\text{Bi}/(\text{Bi} + \text{Ca})$ (X_{Bi}) în soluția sintetizată și în produsul final. Valorile X_{Bi} în particulele finale sunt foarte apropiate de valorile X_{Bi} din soluție pentru toate probele cu bismut. Acest rezultat indică faptul că ionii de bismut adăugați în timpul sintezei s-au încorporat cu succes în particulele de hidroxiapatită.

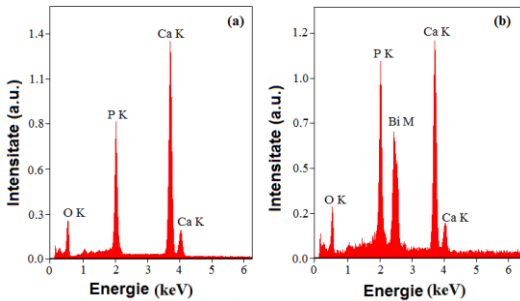


Figura VIII.2.
Spectrele EDX ale probelor calcinate
HA-Bi-0 (a) și
HA-Bi-25 (b)

Figura VIII.2 prezintă spectrele EDX a probelor HA-Bi-0 și HA-Bi-25, iar pentru ultima probă sunt evidențiate picurile caracteristice ionului de bismut.

Conținutul în bismut din probele BiHA crește odată cu concentrația bismutului din soluțiile precursorare, în concordanță cu încorporarea cantitativă a bismutului în faza solidă. Acest lucru sugerează că are loc un proces favorabil de schimb ionic între ionii de bismut și hidroxiapatită.

Substituția izomorfă $\text{Ca} \leftrightarrow \text{Bi}$ nu afectează semnificativ structura probelor BiHA așa cum poate fi dedus din rapoartele atomice $(\text{Bi}+\text{Ca})/\text{P}$ și care presupune o valoare medie foarte apropiată de valoarea stoechiometrică 1,67, independentă de conținutul de Ca și Bi.

VIII.4.2. Morfologia cristalului

Toate probele de apatită nanometrică prezintă forme sferice și aglomerare cu micropori intergranulari, așa cum se arată micrografiile SEM în figura VIII.3. Conținutul de Bi din apatită nu conduce la modificări semnificative în morfologia hidroxiapatitei, dar există o aglomerare mai mare. O posibilă explicație a comportamentului de aglomerare este dată de proprietățile de suprafață asociate cu cristale nanometrice, care împreună provoacă un mănunchi, după cum se observă în figura VIII.3.

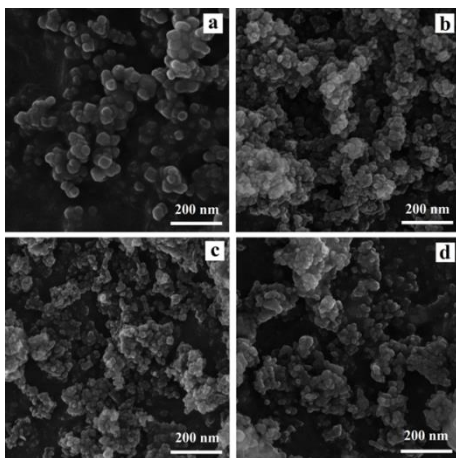


Figura VIII.3. Imagini SEM ale probelor calcinate HA-Bi-0 (a), HA-Bi-5 (b), HA-Bi-15 (c) și HA-Bi-25 (d)

Atunci când probele sunt calcinate la temperaturi ridicate (800 °C), pentru a crește stabilitatea termică și chimică, particulele au tendința de a sinteriza sub formă de aglomerate (Bernache-Assollant și colab., 2003). Toate probele prezintă aceeași morfologie. Imaginile SEM relevă o scădere a dimensiunii particulelor de la aproximativ 51 nm (HA-Bi-0 probă) la 28 nm (HA-Bi-25 eșantion) cu creșterea conținutului de Bi, în acord cu datele XRD.

În ceea ce privește proprietățile optice, probele necalcinate erau albe (figura VIII.4). Culoarea probelor a fost afectată după calcinarea lor la 800 °C. Astfel, hidroxiapatita pură (HA-Bi-0) capătă culoarea albastră, în timp ce culoarea galbenă a fost observată pentru probele de hidroxiapatită substituită cu bismut, care ar putea constitui cationii Bi^{3+} (în stare f_0 , galben) (figura VIII.4). Intensitatea de culoare variază proporțional cu concentrațiile de dopaj. Aceste observații optice pot fi corelate cu rezultatele XPS corespunzătoare care a relevat că cationii Bi^{3+} (în stare f_0 , galben) există la suprafața probelor.

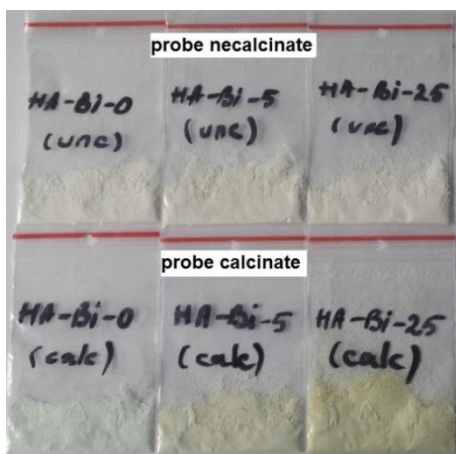


Figura VIII.4. Imagini optice ale probelor de hidroxiapatită calcinată și necalcinată

VIII.4.3. Structura cristalului

Compoziția fazei, parametrii de rețea, gradul de cristalinitate și dimensiunea cristalelor au fost determinate prin analize DRX și rezultatele obținute sunt prezentate în figura VIII.5 și tabelul VIII.3. Difractogramele din figura VIII.5 sunt în concordanță cu faza hexagonală a hidroxiapatitei ($P6_3 / m$) (JCPDS card de date 09-0432) și nici unul dintre modelele afișate nu prezintă vârfuri suplimentare, ceea ce indică faptul că toate probele prezintă ca fază unică hidroxiapatita. Comparativ cu hidroxiapatita pură, toate probele de hidroxiapatită substituită cu bismut au arătat vârfuri comparabile fără schimbarea semnificativă a pozițiilor de vârf, indiferent de concentrațiile de substituție. Aceasta sugerează că procesul de schimb ionic nu a modificat semnificativ structura hidroxiapatitei.

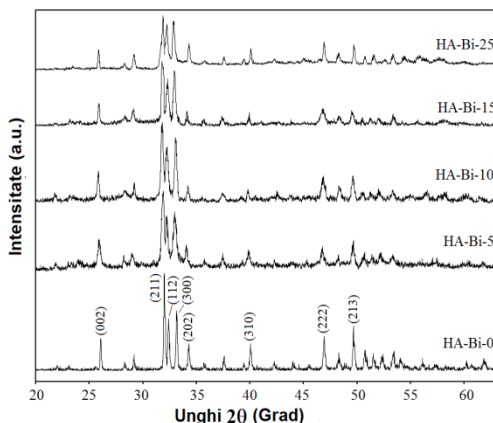


Figura VIII.5. Spectrele DRX pentru probele de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu bismut

Spectrele DRX ale probelor de hidroxiapatită substituită cu bismut prezintă picurile mai largi și mai puțin intense comparativ cu hidroxiapatita pură (HA-Bi-0). Acestea indică scăderea de cristalinitate odată cu creșterea conținutului de bismut (tabelul VIII.3),

care ar putea fi atribuite la diferite mecanisme de compensare a sarcinii pentru înlocuirea izomorfă a ionilor de Ca^{2+} cu ioni de Bi^{3+} . Cristalinitatea scăzută a probelor de hidroxiapatita substituită cu bismut poate duce în continuare la o solubilitate crescută, contribuind astfel la eliberarea locală de ioni de bismut, care pot îmbunătăți la rândul său, biodegradabilitatea și proprietățile antibacteriene (Chen, 2010).

De asemenea, vârfurile largi arată că particulele de hidroxiapatită sunt de dimensiuni nanometrice. Dimensiunea medie a cristalelor de hidroxiapatita pură (HA-Bi-0) estimată folosind ecuația Scherrer a fost de 58,32 nm și pentru pulberile de hidroxiapatită substituită cu bismut a fost mai mic de 51 nm (tabelul VIII.3). Pentru toate probele dopate cu bismut, s-a observat o scădere în dimensiune a cristalelor odată cu creșterea conținutului de bismut, în acord cu imaginile SEM.

Valorile parametrilor a și c au fost obținute de la vârfurile picurilor corespunzătoare planelor (002) și (211), care sunt bine rezolvate și nu prezintă interferențe. În cazul substituirii cu Bi^{3+} în structura apatică, datorită similitudinilor dintre razele ionice ale ionilor Ca^{2+} și Bi^{3+} nu există nici o schimbare în rețeaua cristalină, deși diferența de valență cauzată de această înlocuire necesită o creștere în sarcină negativă pentru a menține sarcina de echilibru. Acest lucru se realizează prin formarea de locuri vacante de calciu pe sit-urile de cationi. După cum se poate vedea în tabelul VIII.3, valorile parametrilor de rețea și a volumului cristalelor din probele de hidroxiapatita substituită sunt foarte apropiate cu cele ale probei de hidroxiapatită pură. Cu toate acestea, se observă o creștere lentă a parametrilor de rețea și a volumului de cristal odată cu creșterea conținutului de bismut.

Tabelul VIII.3. Gradul de cristalinitate (X_c), mărimea cristalelor (D), volumul celulei elementare (V), parametrii de rețea (a și c) a probelor calcinate de HA și BiHA obținute din spectrele DRX

Proba	D (nm)	X_c (%)	V ($\text{\AA}^3$)	a ($\text{\AA}$)	c ($\text{\AA}$)
HA-Bi-0	58,32	99,78	1605,77	9,5271	6,8333
HA-Bi-5	51,01	92,75	1616,90	9,5297	6,8769
HA-Bi-10	44,19	90,97	1627,17	9,5514	6,8892
HA-Bi-15	42,60	88,95	1629,46	9,5597	6,8869
HA-Bi-25	36,02	84,16	1632,34	9,5623	6,8953

VIII.4.4. Valența chimică a ionului de bismut în produșii finali

Analiza XPS a fost aplicată pentru a studia starea suprafeței chimice a hidroxiapatitei simple și a hidroxiapatitei substituită cu bismut, rezultatele prezentând dovada pentru doparea cu succes a ionilor de bismut în structura hidroxiapatitei. Astfel, figura VIII.6 prezintă spectrul XPS al probei HA-Bi-25 pentru intervalul energiei de legătură 0-1200 eV. Se poate observa că energia de legătură a bismutului (regiunea 4f, 150-170 eV), Ca (2p, 344 eV), O (1s, 528 eV) și P (2p, 135 eV) sunt detectate în probe. Vârful la nivel de bază P 2p situat la 135 eV este atribuit legăturii P-O în mediul chimic PO_4^{3-} (Chung și colab., 2003).

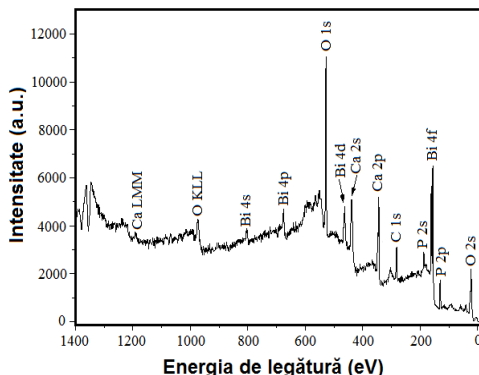


Figura VIII.6. Spectrul XPS al probei HA-Bi-25

Semnalul carbonului C 1s (287 eV) se datorează carbonului utilizat ca referință internă. Nu sunt evidențiate alte impurități în probe, fiind o bună concordanță cu datele DRX. Prin urmare, datele XPS demonstrează că rețeaua hidroxiapatitei conține ioni de bismut Bi^{3+} .

VIII.4.5. Spectroscopie în IR cu transformată Fourier (FT-IR)

Spectrele FT-IR ale probelor analizate în cadrul acestui studiu s-au înregistrat cu un spectrofotometru **SPECTRUM BX II / PerkinElmer**, parametrii de lucru fiind: rezoluția de scanare de $0,8 \text{ cm}^{-1}$, viteza de scanare de $0,1 - 1,5 \text{ cm/s}$, regiunea de frecvențe cuprinsă între $400 - 4,000 \text{ cm}^{-1}$.

O cantitate mică de pulbere a fost amestecată cu bromura de potasiu (KBr) și apoi presată în discuri de măsurare.

Spectrele FT-IR obținute pentru hidroxiapatită pură și pulberi de hidroxiapatită substituită cu bismut sunt date în figura VIII.7.

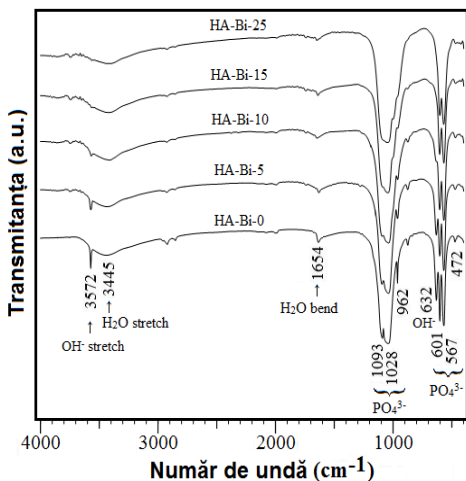


Figura VIII.7.
Spectre FT-IR ale probelor de hidroxiapatită pură și hidroxiapatită substituită cu bismut

Aceste spectre oferă o serie de detalii spectrale ce demonstrează formarea hidroxiapatitei (Guo și colab., 2009). Spectrul de hidroxiapatita pură (HA-Bi-0) arată benzile de la 1093, 1028 și 962 cm^{-1} ca urmare a modului de întindere a legăturii P-O, în timp ce benzile de la 601, 567 și 472 cm^{-1} sunt datorate modului de întindere a legăturii O-P-O. Benzile de la 2146-1996 cm^{-1} sunt atribuite grupării fosfat PO_4^{3-} . În structura apatitică se observă o concentrație semnificativă de grupe OH^- din intensitatea benzilor existente la 3572 și 632 cm^{-1} . Benzile de apă moleculare și adsorbite sunt, de asemenea, observate la 1654 și 3446 cm^{-1} (ca o bandă largă).

Se observă faptul că în cazul probelor ce conțin bismut intensitatea acestor picuri este mai mică, fapt ce denotă o scădere a gradului de cristalinitate a pulberii apatitice. Modificarea profilului acestor linii indică o schimbare a raportului dintre fazele cristaline și amorfe. Probele de hidroxiapatită substituită cu bismut arată structuri similare cu hidroxiapatita pură. Cu toate acestea, se poate observa că vârfurile picurilor ce aparțin legăturilor O-H și P-O descresc treptat cu creșterea cantității de bismut în rețeaua apatitică.

Astfel, în figura VIII.7 se poate observa că intensitatea la lungimea de undă 3572 cm^{-1} atribuită benzii grupării OH^- scade fără schimbări în numărul de undă. Prin urmare, aciditatea de la suprafața grupărilor P-OH a fost redusă prin înlocuirea ionilor Ca^{2+} cu ioni de Bi^{3+} . Slăbirea benzii OH^- ar putea fi cauzată de ruperea echilibrului sarcinii electrice în rețeaua apatitică datorită substituirii ionilor Ca^{2+} cu ioni de Bi^{3+} . Pentru a compensa aceste sarcini pozitive, gruparea OH^- ar putea fi transformată în O^{2-} , așa cum este sugerat de către Serret și colab. (2000).

Din analizele FT-IR, SEM-EDX, XPS și DRX poate fi trasă concluzia că ionii Bi^{3+} sunt dopați în rețeaua de hidroxiapatită. Rezultatele experimentale arată că dopajul cu bismut afectează într-o manieră lentă cristalinitatea hidroxiapatitei, dimensiunea cristalelor, proprietățile texturale și de suprafață.

VIII.4.6. Spectroscopia de fluorescență

Datorită numărului mare de posibile stări de valență, interacțiunea puternică cu rețeaua din jur și, în unele cazuri, formarea de grup, ca dopant în matrici anorganice, ionul de bismut prezintă o varietate largă de proprietăți optoelectronice și aplicații potențiale. De exemplu, (1), cei mai mulți compuși tradiționali din sticlă care conțin Bi au fost cercetați până în prezent datorită potențialului lor pentru amplificatoare de bandă largă și lasere acordabile (Hughes și colab., 2009); (2) luminiscentă multicoloră de la albastru-verde, portocaliu, roșu, alb și în regiunea NIR pot fi observate la toate tipurile de sticle anorganice dopate cu bismut (Zhou și colab., 2009); (3) proprietățile luminiscente ale ionilor Bi^{3+} și Bi^{2+} au fost intens investigate în diferite rețele gazdă.

În ceea ce privește proprietățile optice ale probelor de hidroxiapatită simplă și hidroxiapatită substituită cu bismut în diferite proporții, figura VIII.8, ne arată faptul că odată cu creșterea cantității de bismut din probă are loc o scădere a intensității semnalelor optice

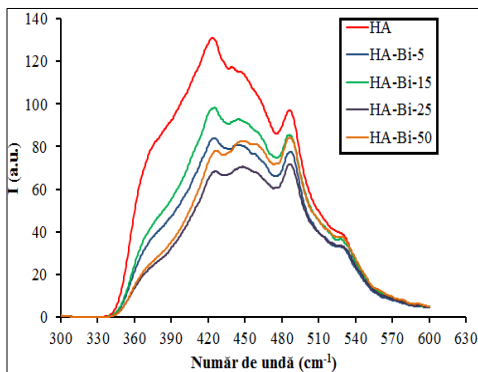


Figura VIII.8. Spectrele de luminescență a probelor de hidroxiapatită simplă și hidroxiapatită substituită cu bismut

VIII.4.7. Caracterizarea texturală și proprietățile suprafeței specifice

Proprietățile suprafeței specifice a probelor BiHA au fost determinate prin metoda Brunauer-Emmett-Teller (BET), ecuația izotermei de adsorbție N₂, și rezultatele sunt prezentate în tabelul VIII.4.

Tabelul VIII.4. Proprietățile suprafeței specifice a probelor calcinate BiHA

Proba	Suprafața specifică (m ² /g)	Suprafața externă (m ² /g)	Volumul total al porilor (cm ³ /g)	Dimensiunea porilor (nm)
HA-Bi-0	139,365	45,454	0,098	1,181
HA-Bi-5	24,866	17,533	0,048	1,645
HA-Bi-10	21,698	14,967	0,041	2,064
HA-Bi-15	20,008	14,423	0,033	1,542
HA-Bi-25	12,003	8,58	0,021	2,180

Figura VIII.8 rezumă rezultatele adsorbției N₂ și distribuția porilor caracteristice pentru probele HA-Bi-0 și HA-Bi-15 calcinate la 800 °C. Conform clasificării IUPAC toate probele arată o izoterma de adsorbție de tip IV cu o curbă histeresis H1, demonstrând astfel proprietăți tipice pentru materiale mezoporoase.

Distribuția Barrett-Joyner-Halenda (BJH) indică o textură micro (diametrul porilor < 2 nm) și mezoporoasă (2 - 10 nm) pentru ambele probe. Rezultatele arată că doparea cu ioni de bismut nu a modificat structura hidroxiapatitei, în ceea ce privește textura de bază a porilor, și anume textura mezoporoasă.

Analiza BET corelează foarte bine rezultatele cu rapoartele atomice X_{Bi} ale probelor dopate. S-a observat o scădere a suprafeței probelor BiHA odată cu creșterea cantității de bismut adăugată în probă, precum și o scădere a volumului total al porilor.

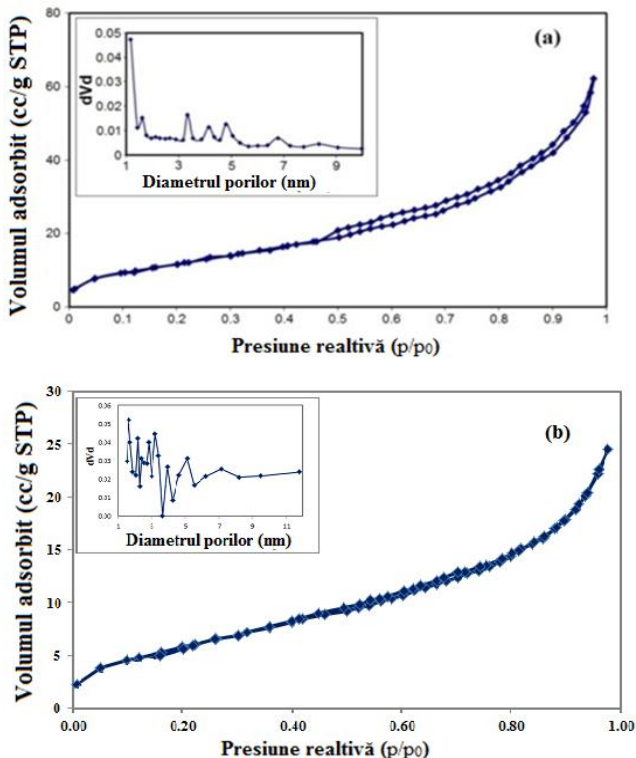


Figura VIII.4. Izoterma BET și distribuția porilor a probelor calcinate la 800 °C HA-Bi-0 (a) și HA-Bi-15(b)

VIII.4.8. Caracterizarea bacteriologică a materialelor

În literatura de specialitate există foarte puține lucrări consacrate proprietăților antibacteriene ale ionilor de bismut și utilizarea lor în ingineria biomaterialelor. Astfel, numai Shanmugam și Gopal (2014) au sintetizat hidroxiapatită ce conține atât Bi^{3+} , cât și ioni monovalenți (Na^+ , K^+ , Ag^+), arătând că aceste biomateriale dopate au o capacitate antibacteriană ridicată împotriva tulpinilor *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* și *Candida albicans*.

În studiul nostru, proprietățile antibacteriene ale hidroxiapatitei pure și ale nanopulberilor de hidroxiapatită substituită cu bismut au fost demonstrate prin metoda zonei de inhibare împotriva bacteriilor *Escherichia coli* (bacterii gram negative) și *Staphylococcus aureus* (bacterii gram-pozitive), iar rezultatele au fost prezentate în figurile VIII.9, VIII.10 și VIII.11.

După cum arată figura VIII.9, nivelul creșterii microbiene a ambelor bacterii variază în mod diferit cu creșterea cantității de Bi în probele dopate cu bismut, comparativ cu proba pură de hidroxiapatită. Bacteria *Escherichia coli* are o sensibilitate mare la probele substituite cu Bi în timp ce bacteria *Staphylococcus aureus* are o sensibilitate mai mare la proba pură de hidroxiapatită.

După 24 ore de incubare, activitatea de inhibare antibacteriană împotriva tulpinii *Escherichia coli* crește odată cu creșterea concentrației de bismut în hidroxiapatită, iar activitatea antibacteriană maximă este observată pentru proba HA-Bi-50. Pe de altă parte, o creștere a activității antibacteriene pentru nanopulberile de hidroxiapatită substituită cu bismut se observă pentru *Staphylococcus aureus*, dar nu la fel de puternic ca și pentru *Escherichia coli*. Aceste rezultate demonstrează că pulberile de hidroxiapatită substituite cu bismut sunt mai eficiente împotriva bacteriilor gram-negative decât bacteriile gram-pozitive.

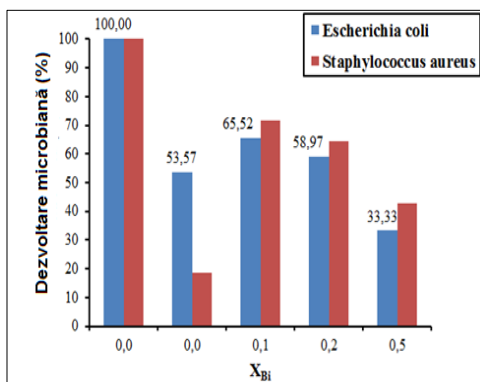


Figura VIII.9.
Gradul de dezvoltare
microbiană a probelor
împotriva tulpinilor patogene
Escherichia coli și
Staphylococcus aureus

Astfel, proprietatea antibacteriană împotriva *Escherichia coli* este îmbunătățită după ce ioni de Ca^{2+} sunt substituiți cu ioni Bi^{3+} în structura de hidroxiapatită. Aceasta se poate datora unei solubilități mai mari a probelor de hidroxiapatită substituită cu bismut decât cea a hidroxiapatitei pure, astfel mai mulți ioni de Bi sunt eliberați pentru a inhiba existența bacteriilor testate.

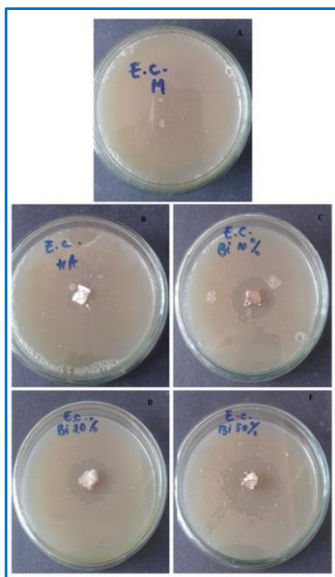


Figura VIII.10.
Testarea activității
bacteriologice a
biocompozitelor studiate pe
tulpini de *Escherichia coli*:
A) Martor; B) HA;
C) HA-Bi-10%;
D) HA-Bi-20%; E) HA-Bi-50

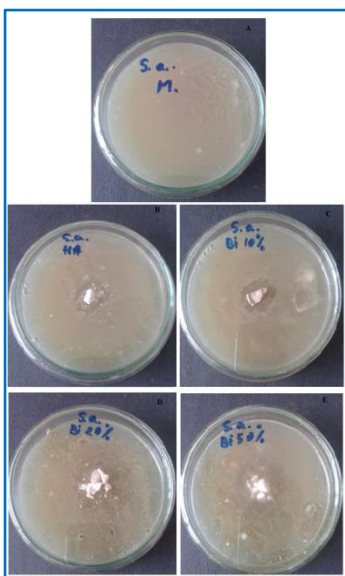


Figura VIII.11.
Testarea activității
bacteriologice a
biocompozitelor studiate pe
tulpini de *Staphylococcus*
aureus:
A) Martor; B) HA; C) HA-Bi-
10; D) HA-Bi-20;
E) HA-Bi-50

De asemenea, activitatea antibacteriană de inhibare mai mare împotriva tulpinilor bacteriene gram-negative pentru probe de hidroxiapatită substituită cu bismut arată că creșterea concentrației de Bi poate induce o sarcină de suprafață pozitivă pentru nanoparticule apatită. Având în vedere rezultatele obținute, se poate spune că nanopulberile de hidroxiapatită substituită cu bismut pot fi agenți antimicrobieni promițători datorită proprietăților lor bioactive în special împotriva bacteriilor gram-negative.

În final, caracterizarea completă a acestor biomateriale ar necesita evaluarea bioactivității (prin estimarea capacității lor de a stimula depunerea de hidroxiapatită pe suprafața lor) și biocompatibilitatea (prin proliferarea celulelor testare și supraviețuire).

VIII.5. Concluzii:

În cadrul acestui capitol s-a urmărit **obținerea și caracterizarea hidroxiapatitei substituite cu bismut** sub formă de pulbere cristalină și de puritate ridicată, aplicând metoda precipitării chimice din soluție. Ținând cont de rezultatele obținute se pot trage următoarele concluzii:

- 1) Metoda bazată pe **reacții de precipitare** a fost folosită cu succes pentru a obține pulberi cristaline, nanometrice de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu bismut ($\text{Ca}_{10-x}\text{Bi}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $x = 0-7,5$). S-au utilizat ca materii prime: hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ca sursă de calciu; acid orthofosforic (H_3PO_4) ca sursă de fosfor și azotat de bismut ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ca sursă de bismut.

- 2) Analizele XPS, SEM-EDX, FTIR confirmă obținerea de hidroxiapatită simplă și substituită, ionul de bismut (Bi^{3+}) fiind încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei. Produsele finale sunt formate din agregate sferice formate din nanoparticule cu o dimensiune de aproximativ 30-55 nm. Având în vedere creșterea conținutului de bismut cristalele devin din ce în ce mai mici și formează aglomerate datorită efectului de mărime.

- 3) Toate spectrele XRD prezintă linii de difracție caracteristice hidroxiapatitei, conform standardelor și literaturii de specialitate. Faza majoră, așa cum era de așteptat, este hidroxiapatita, confirmată prin comparația cu datele obținute prin JCPDS Data Card 09-0432 (pentru hidroxiapatită). Pe de altă parte, spectrele probelor care conțin atât calciu cât și bismut prezintă în general picuri de difracție mai largi, caracteristice unui grad redus de cristalinitate a probelor de hidroxiapatită substituită cu bismut, însă fără schimbări majore în structura cristalină.

- 4) Spectrele FTIR demonstrează menținerea structurii de bază, hidroxiapatita, spectrele FTIR arată că ionii de bismut încorporați în rețeaua de hidroxiapatită reduce aciditatea de la suprafața grupărilor P-OH.

- 5) Activitatea bacteriologică a biocompozitelor a fost studiată pe tulpini de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În cazul probelor de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu bismut s-a utilizat ca metodă de testare, metoda difuzimetrică (testul Kirby Bauer Disk Diffusion). S-a demonstrat astfel că gradul de dezvoltare microbiană scade odată cu creșterea cantității de bismut din probă, comparativ cu proba martor al fiecărei bacterii. De asemenea, se poate observa că bacteria gram-negativă *Escherichia coli* prezintă o sensibilitate ușor ridicată față de probele substituite cu bismut, iar bacteria gram-pozitivă *Staphylococcus aureus* prezintă o sensibilitate mai mare față de proba de hidroxiapatită simplă.

Capitolul IX

MATRICI POROASE PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ ȘI ACETAT DE CELULOZĂ

IX.1. Protocolul experimental de obținere a biocompozitelor

IX.1.1. Obținerea materialului poros din acetat de celuloză

O matrice poroasă servește și acționează ca suport fizic și regulator insolubil al activității biologice, afectând migrarea, contracția și diviziunea celulelor. Asemenea matrici se aplică în medicină ca material hemostatic și material de protecție pentru răni, schelet în ingineria tisulară, sisteme de eliberare predictibilă și îndelungată a celulelor, proteinelor, acizilor nucleici și medicamentelor, accelerând legarea și creșterea celulelor și țesuturilor.

Matricile pe bază de acetat de celuloză au fost obținute prin procedeul turnării, metodă favorabilă obținerii de membrane poroase cu aplicații multiple în medicină.

În studiul de față s-au utilizat o serie de reactivi / materii prime pentru obținerea membranelor poroase după cum urmează:

- Acetat de celuloză (AC)
- Pulbere de hidroxiapatită (HA)
- Nistatină (Nys)
- Acetonă
- Apă bidistilată.



Figura IX.3. Turnarea filmului de acetat de celuloză



Figura IX.4. Filmul uscat de acetat de celuloză

Filmul a fost turnat în vas Petri (figura IX.3) și lăsat timp de o oră, după care membrana obținută s-a imersat în apă rece până s-a desprins de vasul Petri.

Pentru prepararea membranei de acetat de celuloză s-au cântărit 1,5 g de acetat de celuloză care au fost dizolvate în 13,5 ml acetonă.

Amestecul a fost pus sub tare mecanică timp de o oră.

S-a obținut o membrană poroasă cu dimensiunile porilor de diferite mărimi, cu o porozitate controlată, care s-a uscat la 38 °C în etuvă până masa a rămas constantă (figura IX.4).

IX.1.2. Obținerea compozitelor acetat de celuloză / hidroxiapatită

Membrana de tip acetat de celuloză - hidroxiapatită a fost preparată conform următoarelor proceduri: s-au cântărit 1,5 g acetat de celuloză care au fost dizolvate în 13,5 ml acetonă. Amestecul a fost pus sub agitare mecanică timp de o oră. După expirarea timpului s-au adăugat 0,5 g hidroxiapatită peste soluția de acetat de celuloză și s-a continuat agitarea până amestecul s-a omogenizat.

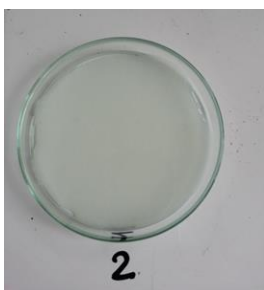


Figura IX.5. Turnarea filmului de acetat de celuloză și hidroxiapatită



Figura IX.6. Filmul uscat de acetat de celuloză și hidroxiapatită

Filmul a fost apoi turnat într-o cutie Petri (figura IX.5) și lăsat timp de o oră, după care membrana obținută a fost imersată în apă rece până s-a desprins de cutia Petri. Scaffold-ul acetat de celuloză - hidroxiapatită a fost uscat în etuvă la 38 °C până când masa a rămas constantă (figura IX.6).

S-a obținut un scaffold cu o porozitate suficientă pentru a sprijini activitățile biologice, cu o interconectivitate ridicată între pori și cu o rezistență mecanică și o degradare corespunzătoare.

IX.1.3. Obținerea compozitelor acetat de celuloză/nistatină

Legarea chimică a moleculelor active pe polimeri sau pe matrici polimerice se face prin metoda grefării de principii active pe structuri macromoleculare funcționalizate.

În studiul de față metoda de înglobare a medicamentului s-a ales astfel încât să satisfacă cerințele structurale și de funcționalitate impuse de scopul propus, condițiile de puritate și de reproductibilitate și condițiile tehnologice de realizare.

În studiul de față pentru grefarea membranelor poroase cu principiu activ s-a utilizat **Nistatina** datorită proprietăților sale antifungice.

Nistatina este un antibiotic polienic ce interferează (prin legarea sterolilor, în principal a ergosterolului) cu permeabilitatea membranei celulare a fungilor sensibili. Are o acțiune fungistatică sau fungicidă în funcție de concentrație. Pentru prepararea membranei acetat de celuloză-nistatină s-au pregătit soluțiile de acetat de celuloză și Nistatină.

Cele două soluții se amestecă și se agită până când masa devine constantă.

După acest moment amestecul a fost turnat în cutia Petri (figura IX.8) și lăsat timp de o oră, după care scaffold-ul obținut s-a imersat în apă rece până s-a desprins de pe cutia Petri. Membrana a fost uscată în etuvă la 38 °C până masa a rămas constantă (figura IX.9).



Figura IX.7.
Soluția de nistatină
-acetonă

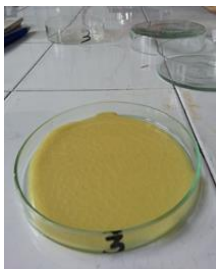


Figura IX.8.
Turnarea filmului
de acetat de
celuloză și nistatină



Figura IX.9.
Filmul uscat de
acetat de celuloză
și nistatina

IX.1.4. Obținerea compozitelor acetat de celuloză / hidroxiapatită / nistatină

Prepararea membranei acetat de celuloză-hidroxiapatită-nistatină a avut loc în două etape:

- 1) În prima etapă a fost preparată membrana poroasă acetat de celuloză-hidroxiapatită astfel:

s-au cântărit 1,5 g acetat de celuloză care au fost dizolvate în 13,5 ml acetonă și puse sub agitare mecanică timp de oră. După expirarea timpului s-au adăugat 0,5 g hidroxiapatită și s-a omogenizat prin agitare mecanică timp de o oră.

- 2) A doua etapă presupune încorporarea nistatinei în matricea poroasă: s-a preparat soluția de Nistatină astfel: s-au cântărit 0,45 g Nistatină care au fost dizolvate în 1,5 ml acetonă. Soluția de Nistatină s-a amestecat cu soluția de acetat de celuloză – hidroxiapatită și puse sub agitare timp de 3 ore.

După expirarea timpului amestecul s-a turnat în sticlă Petri (figura IX.10) și lăsat timp de o oră, după care membrana obținută a fost imersată în apă rece până s-a desprins din cutia Petri.

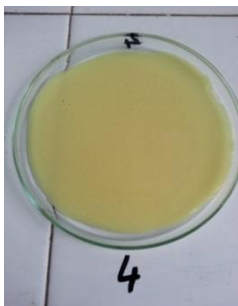


Figura IX.10. Turnarea filmului de acetat de celuloză, hidroxiapatită și nistatină



Figura IX.11. Filmul uscat de acetat de celuloză, hidroxiapatită și nistatina

Membrana a fost uscată în etuvă la 38 °C până când masa a rămas constantă (figura IX.11).

IX.2. Caracterizarea biocompozitelor pe bază de acetat de celuloză

Obținerea și caracterizarea biocompozitelor pe bază de acetat de celuloză și hidroxiapatită a fost descrisă în articolul *Nystatin-loaded Cellulose Acetate / Hydroxyapatite Biocomposites*, publicat în Revista de Chimie (Bucharest), 64, No.12, pp. 1426 - 1429, 2013.

Morfologia și compoziția chimică a suprafeței probelor au fost elucidate prin microscopie electronică cu baleiaj (SEM), cuplată cu spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX), folosind un microscop electronic QUANTA 200 3D cu fascicul dual de scanare (FEI Co, Statele Unite ale Americii). Pentru investigații SEM-EDX, probele au fost acoperite cu aur, pentru a crea o suprafață de acoperire conductivă. Caracterizarea structurală a probelor s-a realizat cu ajutorul analizei de difracție de raze X (XRD) cu un difractometru X'PERT PRO MRD cu radiații Cu-Ka ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Analiza ATR-FTIR a probelor a fost realizată cu un spectrofotometru Digilab-Scimitar cu seria FTS 2000 (Digilab Co, Statele Unite ale Americii). Măsurătorile au fost efectuate în domeniul 400 și 4000 cm^{-1} , cu o rezoluție stabilită la 4 cm^{-1} .

Matricile poroase de acetat de celuloză cu hidroxiapatită și / sau nistatină au fost obținute prin metoda de inversiei de fază.

Patru tipuri de compozite poroase au fost obținute, a căror compoziție este prezentată în tabelul IX.1. În ultimele două probe, raportul de masă, acetat de celuloză / nistatină, s-a păstrat constant în jurul valorii 3,34.

Tabelul IX.1. Compoziția membranelor de acetat de celuloză utilizate în acest studiu

Proba	Acetat de celuloză (wt.%)	Hidroxiapatita (wt.%)	Nistatină (wt.%)
AC	100	0	0
AC-HA	75	25	0
AC-Nis	76,92	0	23,08
AC-HA-Nis	61,22	20,41	18,37

Matricele poroase de acetat de celuloză cu hidroxiapatită și / sau nistatină au structuri asimetrice poroase care permit utilizarea lor în calitate de membrane în ingineria tisulară. Imaginile SEM ale secțiunii transversale (figura IX.12) dau informații privind morfologia probelor.

Proba de acetat de celuloză (figura IX.12a) are o structură asimetrică cu macropori de dimensiuni cuprinse între 20-100 μm și micropori de 2-5 μm , constând dintr-un strat ultrasubțire (stratul activ) și regiunea de bază, care este un strat de tranziție nodulară bine ambalată, susținută de o structură tip burete.

În imaginile SEM ale probei de acetat de celuloză cu hidroxiapatită și / sau nistatină (figura IX.12.b - d) se observă depozitele de hidroxiapatită și / sau nistatină. Cristalele de hidroxiapatită și / sau particulele de nistatină pot fi văzute împrăștiate pe suprafața internă a membranei ca niște pete / spoturi albe. După cum se vede și în imaginile SEM, macroporozitatea probelor compozite descrește odată cu adăugarea de hidroxiapatită și / sau nistatină. Imaginea în secțiune a probelor compozite confirmă o bună încorporare a hidroxiapatitei și / sau nistatinei în structura polimerică.

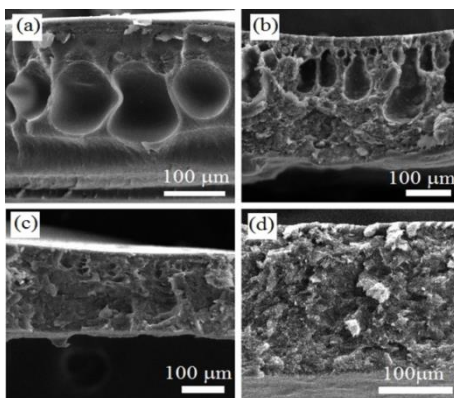


Figura IX.12. Imagini SEM în secțiune ale probelor: AC (a), AC-HA (b), AC-Nis (c) și AC-HA-Nis (d)

Probele au fost caracterizate și prin spectroscopie ATR-FTIR. În figura IX.13, spectrul ATR-FTIR al probei de AC (matricea din acetat de celuloză) prezintă o bandă largă de adsorbție la lungimea de undă de 3410 cm^{-1} caracteristic legăturii O-H.

Banda de la lungimea de undă cuprinsă între $3097 - 1737\text{cm}^{-1}$ este specifică pentru legătura C-H și pentru vibrația legăturii duble C=O a grupării esterice din acetatul de celuloză.

Vârfurile picurilor pentru gruparea alchil (CH_2 și CH_3) se află în intervalul $2850 - 2950\text{ cm}^{-1}$ și $1369 - 1508\text{ cm}^{-1}$, în timp ce picurile din intervalul $1026 - 1215\text{ cm}^{-1}$ corespund tipului de legătura simplă C-O a grupării eter și ester.

Spectrele ATR-FTIR ale probelor compozite (AC-HA, AC-Nis și AC-HA-Nis) prezintă benzi adiționale ce aparțin hidroxiapatitei și / sau nistatinei din matricea polimerică de acetat de celuloză (figura IX.13). Trebuie remarcat faptul că unele benzi aparținând acetatului de celuloză, hidroxiapatitei și nistatinei se suprapun deoarece unele grupări sunt comune și vibrează la aceeași lungime de undă.

Prezența hidroxiapatitei în probele AC-HA și AC-HA-Nis poate fi explicată prin prezența picurilor caracteristice grupării PO_4^{3-} ($820\text{-}870\text{ cm}^{-1}$ și $970\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$). Așa cum a fost menționat mai devreme, acetatul de celuloză dă un semnal caracteristic în intervalul $1026\text{-}1029\text{ cm}^{-1}$ și interferează cu vibrația grupării fosfat, cea mai proeminentă bandă a hidroxiapatitei.

În probele AC-Nis și AC-HA-Nis prezența nistatinei poate fi explicată prin existența picurilor foarte bine definite la lungimile de undă 2924 și 2852 cm^{-1} atribuite grupării CH_2 . Aceste picuri intense interferează cu vibrația grupărilor alchil din acetatul de celuloză. De asemenea, comparativ cu proba AC, la probele compozite banda ce se află la lungimea de undă în jur de 3400 cm^{-1} este mai intensă. Acest lucru poate fi explicat prin absorbția de apă de către hidroxiapatită și nistatină.

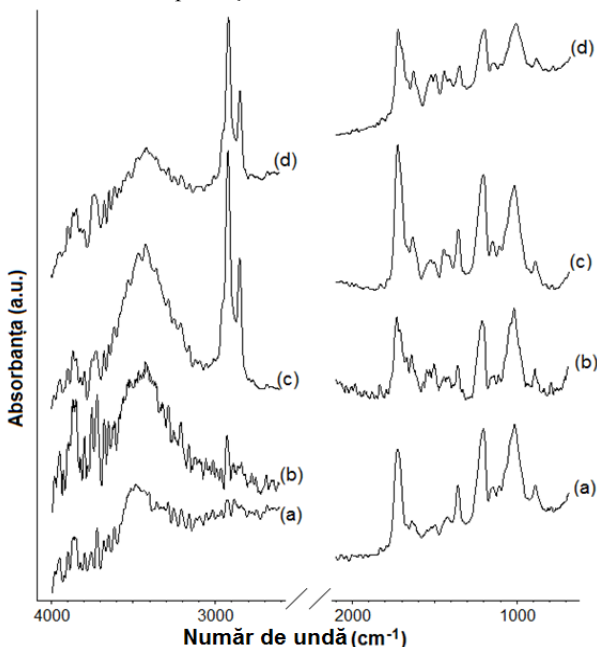


Figura IX.13. Spectrele ATR-FTIR ale probelor: AC (a), AC-HA (b), AC-Nis (c) și AC-HA-Nis (d)

IX.3. Studii de interacțiune cu fluide de interes biologic „in vitro”

IX.3.1. Determinarea gradului de umflare

Umflarea (gonflarea) este procesul prin care moleculele unui lichid / solvent pătrund într-un material polimeric solid, respectiv între spațiile libere ale macromoleculelor polimerice, proces însoțit de creșterea masei și volumului materialului polimeric.

Gradul de umflare (gonflare) a unui material polimeric reprezintă o caracteristică importantă din punct de vedere practic, dacă acesta urmează să fie utilizat în medii în care există solvenți.

Gradul de umflare (%GU) reprezintă masa lichidului absorbit de unitatea de masă a polimerului. El se exprimă prin creșterea relativă a masei sau volumului polimerului:

$$\%GU = \frac{m_i - m_o}{m_o} \cdot 100 = \left(\frac{m_i}{m_o} - 1 \right) \cdot 100 \quad \text{IX.1}$$

unde: m_o = masa inițială a polimerului (g);

m_i = masa după umflare a polimerului la timpul t_i (g);

Studiul cinetic al procesului de umflare presupune determinarea gradului de umflare a materialului la diverși timpi și reprezentarea grafică $\%GU = f(t)$ conform figurii IX.14. Din grafic se poate determina gradul de umflare maxim (%GU_{max}) pe care îl poate suporta materialul studiat.

IX.3.2. Determinarea gradului de degradare

Biodegradarea este un termen care poate fi folosit pentru situația în care între un biomaterial și organismul viu în care este introdus se produc reacții în timp mai scurt sau mai lung. În urma biodegradării, biomaterialele implantate se pot dizolva, fărâmița, pot deveni elastice sau rigide. În ceea ce privește produsele rezultate în urma degradării, acestea pot fi toxice corpului viu sau, dimpotrivă, pot fi concepute să realizeze o funcție farmaceutică.

Așa cum s-a prezentat anterior, este necesar să se cunoască stabilitatea chimică a unui biomaterial în relație cu mediul ce îl înconjoară și cu care poate reacționa, eliberând produse de degradare sub formă de mici particule, ce pot fi toxice. Toxicitatea puternică se poate manifesta în țesuturile imediate, alăturate implantului, prin decolorare, necroză, creșterea temperaturii și reacții alergice.

Gradul de degradare (%GD) reprezintă pierderea în greutate a polimerului în contact cu un anumit fluid / solvent:

$$\%GD = \frac{m_o - m_i}{m_o} \cdot 100 = \left(1 - \frac{m_i}{m_o} \right) \cdot 100 \quad \text{IX.2}$$

unde:

m_o = masa inițială a polimerului (g);

m_i = masa polimerului la timpul t_i (g);

Studiul cinetic al procesului de degradare presupune determinarea gradului de degradare a materialului la diverși timpi și reprezentarea grafică $\%GD = f(t)$.

IX.3.3. Rezultatele obținute

Toate membranele obținute au fost incubate în apă deionizată și în soluție PBS (soluție salină tamponată cu fosfat) la temperatura ambientală și $pH = 7,4$, dar la diferiți timpi de imersare. Figura IX.17 afișează gradul de umflare în apă (fig. IX.17a) și în soluție PBS (fig. IX.17b), iar figura IX.18 prezintă profilurile de degradare ale membranelor în apă (fig. IX.18a), respectiv în soluție PBS (fig. IX.18b) în timpul perioadei de studiu (Bargan și colab., 2014).

Din analiza datelor prezentate în figura IX.17 putem vedea că biocompozitele aflate sub investigație accepta apă și PBS la rate diferite. Cel mai mare grad de umflare în apă deionizată și în soluție PBS atins în cel mai scurt timp a fost observat pentru proba AC-HA, urmată de probele AC-HA-Nis, AC-Nis și AC.

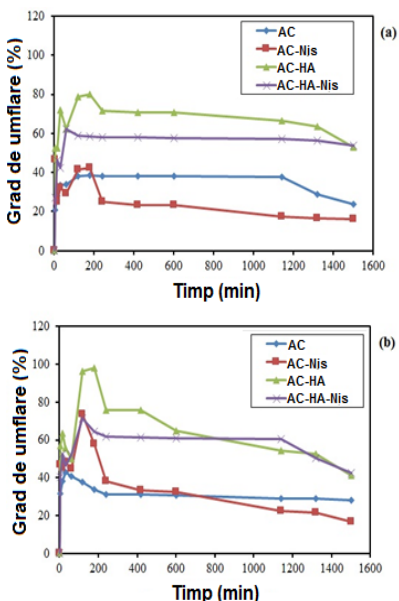


Figura IX.17.
Gradul de umflare în apă (a) și
în soluție PBS (b) a
compozitelor

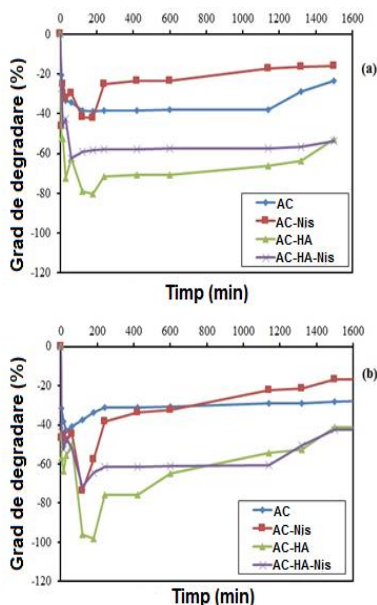


Figura IX.18.
Gradul de degradare în apă
(a) și în soluție PBS (b) a
compozitelor

Capacitatea matricei acetat de celuloză / hidroxiapatită și nistatină de a absorbi suficientă apă este un factor important în formarea stratului de gel care controlează eliberarea medicamentului. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din articolul anterior (Bargan și colab., 2013), în care eliberarea nistatinei s-a dovedit a fi mai rapidă în cazul probei AC-HA comparativ cu biocompozitul pe bază de acetat de celuloză / nistatină.

Acest rezultat este, probabil, o consecință a creșterii numărului de grupări hidrofile în sistemul polimeric datorită adăugării de hidroxiapatită.

De asemenea, a fost investigat și gradul de degradare a membranelor. O analiză a profilurilor de degradare (fig. IX.18a și IX.18b) indică faptul că membranele cu hidroxiapatită în structura lor arată o pierdere mai mică în greutate în raport cu probele AC-Nis și AC. Adaosul de hidroxiapatită într-un compozit polimeric reduce rata de degradare. Astfel, se poate spune că în matricea polimerică hidroxiapatita acționează ca stabilizator rețea.

IX.4. Studiul eliberării controlate a medicamentului din matricea poroasă

Sistemele de cedare a medicamentelor sunt formulări / dispozitive biocompatibile, care eliberează agenți terapeutici în locul dorit din organism și / sau asigură eliberarea adecvată, îmbunătățind eficiența și / sau siguranța medicamentului transportat.

Matricele poroase sunt proiectate prin prisma medicamentului de eliberare predominant scopului de utilizare urmărit, putându-se obține sisteme cu caracteristici particulare, incluzând utilizarea lor în situații limită, în care sistemele clasice de administrare a medicamentelor nu pot fi aplicate cu aceleași rezultate terapeutice.

Scaffold-urile obținute sunt în mediu uscat, iar pentru ca eliberarea controlată a medicamentului să aibă loc, acestea au fost imersate într-un solvent.

În studiul de față drept solvent s-a utilizat soluția tampon fosfat- **Phosphate Buffered Saline- PBS**. PBS este o soluție tampon utilizată, în mod obișnuit, în cercetarea biologică. Este o soluție salină care conține clorură de sodiu, fosfat de sodiu și, în unele formulări, clorura de potasiu și fosfat de potasiu. Soluția tampon ajută la menținerea pH-ului constant. PBS are mai multe aplicații deoarece este izotonic și netoxic pentru celule.

În studiul de față s-a utilizat PBS ca solvent pentru membrana acetat de celuloză-hidroxiapatită și membrana acetat de celuloză – hidroxiapatită - nistatină datorită faptului că moleculele de apă din PBS formează o peliculă subțire în jurul membranelor cu rolul de a preveni denaturarea acestora sau alte modificări conformaționale.

S-a preparat 500 ml PBS după rețeta (tabel IX.2):

Tabelul IX.2. Compoziție soluție PBS

Compoziție Sare	Concentrație Mol/L	Concentrație g/L
NaCl	137	8,01
KCl	2,7	0,20
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	10	1,78
KH ₂ PO ₄	2,0	0,27
pH	7,4	7,4

Sărurile au fost cântărite pe rând și amestecate cu apă bidistilată energic. pH-ul soluției de PBS a fost corectat cu HCl diluat până la 7,41.

Pentru a putea studia eliberarea controlată a medicamentului din matricile poroase a fost realizată curba de etalonare pentru Nistatină.

În vederea realizării curbei de etalonare s-au preparat următoarele soluții:

1) Soluția etalon: s-au cântărit 0,01 g Nistatină care s-au dizolvat în 100 ml PBS și s-a agitat energic.

2) Soluții luate drept probe în realizarea curbei etalon:

- Soluția 1: 5 ml soluție etalon au fost diluate în 45 ml PBS;
- Soluția 2: 10 ml soluție etalon au fost diluate în 40 ml PBS;
- Soluția 3: 15 ml soluție etalon au fost diluate în 35 ml PBS;
- Soluția 4: 20 ml soluție etalon au fost diluate în 30 ml PBS.
- Pentru fiecare probă s-a măsurat adsorbanța cu $\lambda=340$ nm.

În urma datelor obținute se realizează curba de etalonare pentru soluția de Nistatină.

Concentrațiile inițiale ale soluției de Nistatină și ale celor patru probe s-au calculat după formula:

$$C_i = C_{stock} \cdot \frac{m_{nys}}{ml_{sol.totala}} \quad \text{IX.3.}$$

Pentru a studia eliberarea controlată a medicamentului din matricele poroase s-au prelevat probe din membranele acetat de celuloză- nistatină și acetat de celuloză - hidroxiapatită- nistatină (figura IX.20).

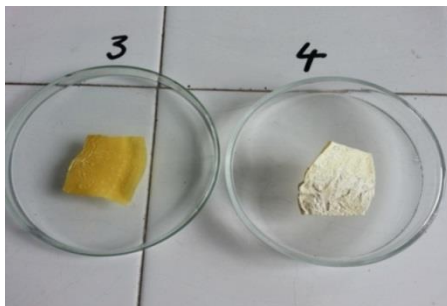


Figura IX.20.

Eșantioanele probelor 3 și 4 folosite în studiul eliberării de medicament

Fiecare probă a fost imersată în câte 50 ml PBS după care s-a prelevat câte 1,5 ml soluție la intervale de timp de 1 minut, 5 minute, 10 minute, până la 24 ore și se citește adsorbanța cu $\lambda=340$ nm.

În funcție de datele obținute și din curba de etalonare s-au calculat concentrațiile finale a soluțiilor de nistatină și s-a determinat cantitatea de nistatină eliberată.

IX.4.1. Eliberarea de medicament *in vitro*

Experimentele au fost efectuate în soluție de tampon fosfat (PBS) de concentrație 0,2 M (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 termostatăă. La intervale de timp predeterminate, 5 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, Statele Unite ale Americii) la $\lambda_{max} = 320$ 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 nistatinei în apă distilată. Cantitatea de medicament eliberată la un moment dat (R%) din eșantioanele compozite a fost calculată conform următoarei ecuații:

$$R\% = \frac{M_o - M_t}{M_o} \cdot 100 \quad \text{IX.4.}$$

unde M_t este cantitatea de medicament eliberat la momentul t (mg/g) și M_o este cantitatea inițială de medicament pe eșantionul compozit (mg/g).

IX.4.2. Rezultatele obținute

Studiul de față se referă la obținerea de biocompozite care includ o substanță medicament activă (de exemplu, Nistatina), în matricea lor. Aceste materiale au o structură tridimensională bazată pe o matrice polimerică de acetat de celuloză, în care s-au dispersat cristalele de hidroxiapatită și / sau nistatină pentru obținerea compozitelor cu aplicații medicale.

În acest studiu a fost selectată nistatina ca model de medicament. Nistatina este un antibiotic polienic obținut din *Streptomyces noursei*. Nistatina este un antibiotic care este atât fungistică cât și fungicidă *in vitro* împotriva unei varietăți de drojdii și ciuperci precum *Candida albicans*.

Nistatina este utilizată pentru profilaxia și tratamentul candidozei ce se poate localiza pe piele și mucoase. În contrast, nistatina nu prezintă o activitate semnificativă împotriva bacteriilor, protozoarelor sau virusilor.

Profilul eliberării cumulative de nistatină din probele compozite este arătat în figura IX.21.

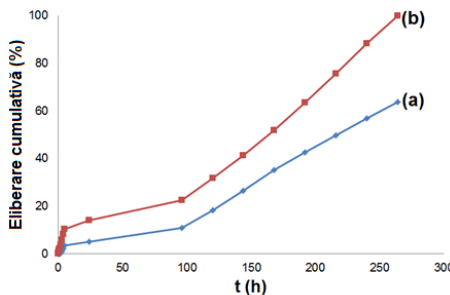


Figura IX.21.
Profilul de eliberare a nistatinei
(R% versus t), din probele:
AC-Nis (a) și AC-HA-Nis (b)

Este clar faptul că proba de AC-HA-Nis eliberează medicamentul mai rapid decât proba AC-Nis. Acest lucru poate fi datorat următoarelor motive: mărirea cristalului de medicament descrește, matricea polimerică are efect de solubilizare, cristalele de medicament nu sunt agregate, iar umectarea și dispersabilitatea medicamentului a fost îmbunătățită.

Cel mai probabil, mecanismul pentru eliberarea nistatinei în studiul de față ar putea fi datorat unei reduceri a mărimii particulei de medicament, deoarece cristalele de hidroxiapatită se dispersează în matricea polimerului și adsorb molecule de medicament, favorizând astfel dispersia medicamentului.

Când compozitul polimer / hidroxiapatita / nistatină a fost introdus în mediul de dizolvare (soluția PBS), multe molecule de medicament au fost expuse mediului de dizolvare, provocând o dizolvare rapidă și o rată de eliberare mai mare.

Modelul cinetic al eliberării nistatinei din probele compozite a fost realizat după modelul cinetic Korsmeyer-Peppas (Korsmeyer și colab., 1983, Narasimhan și colab., 1999). Acest model este utilizat pentru a caracteriza difuzia medicamentului în timpul procesului de eliberare. Ecuația Korsmeyer-Peppas este dată de relația:

$$F = \frac{M_t}{M_o} = K \cdot t^n \quad \text{IX.5.}$$

unde: M_t reprezintă cantitatea de medicament eliberată la timpul t , M_o este cantitatea inițială de medicament, K este constanta Peppas (reunește caracteristici structurale și geometrice ale sistemului de eliberare a medicamentului – transportorul acestuia), n este exponentul de eliberare care indică **mecanismul de eliberare al medicamentului** și F este factorul de eliberare fracțională a medicamentului.

Dacă $n \leq 0,5$, mecanismul de eliberare urmează difuzia Fickian; la valori mai mari $0,5 < n < 1$ urmează modelul non-Fickian (transport anormal). Eliberarea medicamentului se realizează după cinetica de ordin zero dacă n este egal cu zero.

Prin liniarizarea ecuației IX.5., se poate obține următoare expresie:

$$\ln \frac{M_t}{M_o} = \ln K + n \cdot \ln t \quad \text{IX.6.}$$

Prin reprezentarea grafică $\ln (M_t/M_o)$ versus $\ln t$ se obține o dreaptă ce permite calcularea parametrului cinetic (n), având un coeficientul de corelație (R^2) optim așa cum se prezintă în tabelul IX.3. Conform tabelului IX.3, coeficientul de corelație R^2 al modelului cinetic Korsmeyer-Peppas pentru toate probele testate este foarte apropiat de valoarea 1, indicând că datele experimentale de difuzie sunt bine explicate prin acest model. Deoarece valorile exponentului de eliberare (n) sunt mai mici de 0,5, eliberarea nistatinei din matricea solidă urmează un mecanism de difuzie Fickiană pentru ambele tipuri de compozite. Eliberare difuzională Fickiană are loc prin difuzia moleculară obișnuită a medicamentului datorat unui gradient de potențial chimic.

Tabelul IX.3. Exponentul de eliberare (n), coeficientul de corelare (R^2) și eliberarea cumulativă ($R\%$) a nistatinei pentru probele compozite

Proba	n	R^2	R%
AC-Nis	0,0156	0,9893	63,83
AC-HA-Nis	0,0713	0,9774	99,82

Rezultatele obținute demonstrează că matricea acetat de celuloză / hidroxiapatită poate fi folosită ca un vehicul solid pentru nistatină în aplicațiile medicale topice (locale).

IX.5. Caracterizarea bacteriologică a biocompozitelor

Controlul creșterii microbilor, cum ar fi bacterii, fungi, drojdii și alge, în natură este unul dintre conceptele fundamentale pentru supraviețuirea speciilor superioare. Plantele, animalele, chiar și microbii și-au dezvoltat o mare varietate de mecanisme care să păstreze microbii la distanță (Nicolas și Mor, 1995). În societatea umană aceste mecanisme de control de multe ori nu funcționează eficient, ceea ce face ca infecțiile microbiene să devină ucigașul numărul unu în lume. Tratatamentul infecțiilor microbiene devine tot mai dificil, pentru că numărul tulpinilor microbiene rezistente, precum și numărul antibioticelor ce scad în rezistență microbială crește mult mai repede decât numărul de antibiotice utilizabile (Lode, 2009; Gonzales, 2010).

IX.5.1. Izolarea și conservarea tulpinii levuriene

În prezenta teză a fost studiată activitatea antifungică pe care o manifestă biocompozitele pe bază de acetat de celuloză / hidroxiapatită / nistatină față de tulpina levuriană *Candida albicans*.

Candida albicans a fost izolată de pe țesut tegumentar utilizând ca mediu de cultură „Candida Agar” cu următoarea compoziție pe litru: glucoză - 10g, peptonă digerată din țesuturi animale - 5g, extract de drojdie - 3g, extract de malț - 3g, albastru de anilină - 0,1g, agar - 20g, apă distilată 1000 ml, pH $6,2 \pm 0,2$, 25 °C, sterilizare la autoclav 15 min la 121 °C.

Tulpina levuriana (drojdie) a fost păstrată în condiții de refrigerare (4 °C) și pasată 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 $7 \pm 0,2$ la temperatura de 25 °C. Microorganismul test a fost însămânțat (10^4 CFU/mL) pe mediul lichid Sabouraud la temperatura de 37 °C.

În cazul probelor de acetat de celuloză, acetat de celuloză / nistatină, acetat de celuloză / hidroxiapatită și acetat de celuloză / hidroxiapatită / nistatină s-a utilizat ca metodă de testare, metoda difuzimetrică (testul Kirby Bauer Disk Diffusion). Se măsoară cu rigla diametrul zonei de inhibiție a dezvoltării microbiene (exprimat în mm), iar rezultatul se compară cu tabele standard. Rezultatele se exprimă: Sensibil (S), Intermediar (I) sau Rezistent (R) (NCCL, 2008).

Tabelul IX.4. Criterii de interpretare a nistatinei

Criterii de interpretare	Diametrul zonei de inhibiție (mm)
Sensibil (S)	≥ 15
Intermediar (I)	10 – 14
Rezistent (R)	Fără zonă

Antibiograma difuzimetrică permite definirea unei tulpini levuriene ca S, I sau R prin raportarea la diametrului zonei de inhibare a culturii:

- **levuri sensibile** = antibioticul, în doze uzuale, va asigura vindecarea infecției
- (diametrul zonei de inhibiție ≥ 15 mm);

- **levuri rezistente** = antibioticul, cel mai probabil, va determina eșec terapeutic (nu există zonă de inhibiție);
- **levuri intermediare** = efectul terapeutic poate fi obținut numai în anumite condiții (diametrul zonei de inhibiție = 10-14 mm) (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Pentru realizarea experimentelor s-a utilizat un inocul de candida în vârstă de 20 de ore, obținut prin însămânțarea tulpinelor bacteriene pe mediul lichid Sabouraud (fără agar).

Mediul Sabouraud agarizat repartizat în plăci Petri (aproximativ 20 ml mediu Sabouraud) a fost însămânțat cu inoculul levurian (10⁸ bacterie/mL), cu ajutorul unui tampon de vată steril, astfel încât să se obțină o dispersare uniformă a celulelor levuriene pe suprafața mediului. Pe fiecare placă Petri s-au poziționat central biocompozitul sub formă de disc (grosime 4 mm).

În paralel, s-a montat un martor pentru tulpina testată (*Candida albicans*) care conține doar mediul de cultură și inoculul levurian, cu rol de control pozitiv al dezvoltării. Imediat, plăcile au fost incubate timp de 18 h la temperatura de 35 °C ± 0,2 °C, în condiții atmosferice (ambientale). După această perioadă, activitatea antilevuriană a materialelor testate a fost determinată prin măsurarea diametrului zonelor de inhibiție al dezvoltării.

IX.5.2. Rezultatele obținute

Susceptibilitatea nistatinei față de compozitele utilizate a fost testată prin metoda de difuzie Kirby Bauer. Aceasta se bazează pe proprietățile mediului solid de a difuza diferite culturi la concentrații care scad treptat de la locul de depunere la zona de difuzie.

După un anumit timp activitatea antifungică a materialelor testate a fost estimată prin măsurarea diametrului zonelor de inhibiție.

După 18 h de incubare s-a putut observa (figura IX.22) că probele de acetat de celuloză și acetat de celuloză / hidroxiapatită nu prezintă zone de inhibiție față de tulpina levuriană *Candida albicans*, iar probele ce conțin nistatină prezintă o zonă de inhibiție foarte bună (tabel IX.5).

În conformitate cu criteriile de interpretare ale NCCLS, probele AC-Nis și AC-HA-Nis au o zonă de inhibiție cu diametrul > 15 mm ceea ce arată o mare sensibilitate față de tulpina fungică. Acest lucru demonstrează că activitatea antifungică a nistatinei nu este diminuată sau anulată de prezența hidroxiapatitei și a acetatului de celuloză în eșantion.

Tabelul IX.5. Dimensiunea zonelor de inhibiție și sensibilitatea tulpinei levuriene *Candida Albicans* față de biocompozitele studiate

Nr. probă	Denmire probă	Masa (g)	Zona de inhibiție (mm)	Criterii de interpretare	Inhibiție microbiană (%)
1	martor	0	90	-	0
2	AC	0,1	0	R	0
3	AC-Nis	0,1	27,6	S	30,66
4	AC-HA	0,1	0	R	0
5	AC-HA-Nis	0,1	28	S	31,11

În figura IX.23 se observă că gradul de creștere microbiană este de 100 % în cazul probelor AC și AC-HA. Hidroxiapatita nu prezintă activitate antifungică, tulpina fungică putând coloniza foarte ușor la suprafața acesteia. Acest lucru poate cauza infecții post-chirurgicale care pot fi asociate și implanturilor ortopedice și dentare realizate cu hidroxiapatită. Studiile *in vitro* au arătat că biocompozitul AC-HA-Nis a fost realizat cu succes în prevenția adeziunii fungice pe suprafața acestuia. Activitatea antifungică mai bună a probelor AC-Nis și AC-HA-Nis ar putea fi un rezultat al conținutului de nistatină în membrane, ceea ce duce la creșterea potențialului inhibitor al acestora.

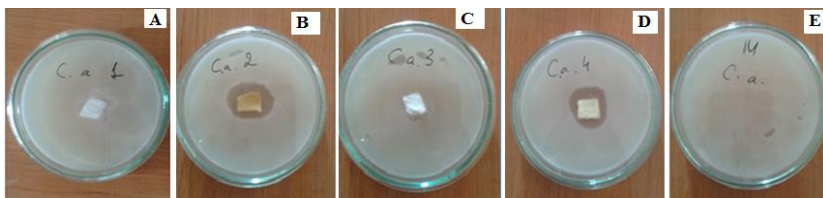


Figura IX.23. Testarea activității microbiologice a biocompozitelor studiate pe tulpina levuriană *Candida albicans*: A) AC; B) AC-Nis; C) AC-HA; D) AC-HA-Nis; E) Martor

IX.6. Concluzii:

În acest capitol s-a urmărit obținerea prin metoda inversiei de fază a patru biocompozite poroase pe bază de acetat de celuloză, hidroxiapatită și / sau nistatină (un medicament antifungal), ce pot fi utilizate în diferite aplicații biomedicale. Astfel, în urma studiului efectuat s-au trasat următoarele concluzii:

- 1) Imaginile SEM arată că macroporozitatea probelor compozite scade prin adăugarea de hidroxiapatită și / sau nistatină. Secțiunea transversală confirmă buna încorporare a hidroxiapatitei și nistatinei în matricea polimerică.
- 2) Probele au fost caracterizate și prin spectroscopie ATR-FTIR. Spectrele ATR-FTIR ale probelor compozite (AC-HA, AC-Nis și AC-HA-Nis) prezintă benzi adiționale ce aparțin hidroxiapatitei și / sau nistatinei din matricea polimerică de acetat de celuloză (figura IX.13). Analiza SEM și ATR-FTIR demonstrează faptul că toate cele trei substanțe s-au încorporat cu succes, obținându-se matrici polimerice cu structuri poroase asimetrice ce permit utilizarea lor în ingineria tisulară ca membrane suport pentru medicamente.
- 3) Studiul eliberării *in vitro* a nistatinei indică faptul că aceste compozite pe bază de acetat de celuloză ce conțin cristale de hidroxiapatită și nistatină duc la o eliberare mult mai rapidă a medicamentului decât proba ce conține doar nistatină. Eliberarea nistatinei din compozite urmează mecanismul de difuzie Fickian. Aceste compozite pot fi utilizate pentru transportul de medicament direct în aria de risc a infecției din organism.
- 4) Determinarea gradului de degradare și de umflare a biocompozitelor ne ajută să evidențiem capacitatea probelor obținute de a absorbi apă deionizată și PBS, proprietate benefică pentru eliberarea controlată a medicamentelor în organism. Astfel, cel mai mare grad de umflare în apă deionizată și în soluție PBS atins în cel mai scurt timp a fost observat pentru proba AC-HA, urmată de probele AC-HA-Nis, AC-Nis și compozitul AC. Acest rezultat este, probabil, o consecință a creșterii numărului de grupări hidrofile ale sistemului polimer datorită adăugării de hidroxiapatită. Se poate concluziona că membrana AC-HA

poate fi utilizată cu succes ca matrice polimerică în eliberarea controlată a medicamentelor prin capacitatea sa de a absorbi apă și soluție PBS.

- 5) Testele antimicrobiene au demonstrat activitatea antifungică a compozitelor AC-Nis și AC-HA-Nis, cu o zonă de inhibiție ce are diametrul > 15 mm. Membranele încărcate cu nistatină au prezentat un efect de inhibare clară asupra creșterii tulpinii *Candida albicans* sugerând astfel, potențiala lor utilizare clinică cu un apel mare pentru tratamentul infecțiilor locale.

CONCLUZII GENERALE

Scopul principal al tezei de doctorat este obținerea de biomateriale pe bază de hidroxiapatită în calitate de material biocompatibil și bioactiv cu utilizări în aplicații biomedicale.

Pentru realizarea acestui scop au fost realizate următoarele obiective:

1) obținerea de hidroxiapatită stoechiometrică, cristalină, de puritate ridicată, sub formă de pulbere prin metoda precipitării din soluție, ce poate fi utilizată în aplicații din domeniul biomedical:

1.a. Metoda bazată pe reacții de precipitare a fost folosită cu succes pentru a obține pulberi cristaline, nanometrice de hidroxiapatită ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), utilizând ca materiale: sursă de calciu - hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), acid orthofosforic (H_3PO_4) ca sursă de fosfor.

1.b. Forma probelor obținute prin difracție de raze X ne arată gradul de cristalinitate a structurii apatitice. Cu ajutorul ecuației Debye - Scherrer s-a calculat mărimea medie a cristalelor apatitice, observându-se astfel că proba apatitică prezintă cristale nanometrice cu dimensiuni sub 60 nm. De asemenea în urma calculelor efectuate s-a determinat gradul de cristalinitate, care s-a dovedit a fi în proporție de 99,78 %, valoare ce ne indică obținerea unei structuri apatitice înalt cristalină.

1.c. Apelând la analiza elementală SEM-EDX s-a putut stabili că raportul Ca/P pentru fiecare probă sintetizată este în domeniul 1,65 – 1,68, ceea ce concordă cu datele din literatură unde se menționează că acest raport trebuie să fie în jurul valorii de 1,67.

1.d. Forma izotermelor ne oferă o primă informație privind tipul de porozitate a materialului. Astfel, izoterma de adsorbție pentru proba HA se prezintă sub forma unei curbe histerezis de tipul IV (în clasificarea IUPAC) prezentă la presiune p/po înaltă, caracteristică materialelor mezostructurate, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 1,5-1,8 nm și o suprafață specifică cuprinsă în intervalul 140-170 m²/g, așa cum reiese din analiza Brunauer-Emmett-Teller (BET) a probelor.

1.e. Studiul spectrelor FT-IR ale probelor analizate oferă informații privind grupările existente în structura hidroxiapatitei, respectiv grupările fosfat (PO_4^{3-}) și grupările hidroxil (OH^-). Grupările hidroxil (OH^-) din structura hidroxiapatitei au fost identificate prin picurile situate la 3575 cm⁻¹ și 638 cm⁻¹, iar intensitatea lor demonstrează un grad de cristalinitate ridicat.

2) obținerea de hidroxiapatită substituită cu ceriu - ionul de ceriu (IV) este încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei, îmbunătățind astfel efectul antimicrobian al hidroxiapatitei:

2.a. Metoda bazată pe reacții de precipitare a fost folosită cu succes pentru a obține pulberi cristaline, nanometrice de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu ceriu ($\text{Ca}_{10-x}\text{Ce}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, x = 0-7,5), utilizând ca materiale: sursă de calciu - hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), acid orthofosforic (H_3PO_4) ca sursă de fosfor, și sulfat de ceriu ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ca sursă de ceriu.

2.b. Analizele DRX, SEM, SEM-EDX și XPS confirmă obținerea de hidroxiapatită simplă și substituită, ionul de ceriu (IV) fiind încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei. De asemenea, imaginile SEM ne arată faptul că ionul tetravalent de ceriu s-a încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei, obținându-se astfel un material poros, alcătuit din particule micro- (diametrul porilor < 2 nm) și macroporoase (2 - 10 nm).

Această caracteristică poate fi utilă în folosirea materialului ca și transportor de medicamente în organism.

2.c. Astfel, analiza XPS ne arată reducerea unora dintre ionii Ce^{4+} la Ce^{3+} , având loc o extindere lentă a rețelei prin mărirea parametrilor de rețea a și c . Prin urmare, rezultatele indică faptul că ionii de ceriu (Ce^{4+} și Ce^{3+}) s-au dopat cu succes în rețeaua hidroxiapatitei în condițiile de sinteză ceea ce constituie un factor decisiv în rolul terapeutic al materialului. Ionul Ce^{3+} prezintă activități antibacteriene, și joacă un rol important în prevenția unor boli, precum cancerul și boala Alzheimer.

2.d. Toate spectrele DRX prezintă linii de difracție caracteristice hidroxiapatitei, conform standardelor și literaturii de specialitate. Faza majoră, așa cum era de așteptat, este hidroxiapatita, confirmată prin comparația cu datele obținute prin JCPDS Data Card 09-0432 (pentru hidroxiapatită). Spectrele corespunzătoare probei HA-Ce-0 (Ce 0%) afișează picuri bine definite și ascuțite, în acord cu un grad ridicat de cristalinitate. Pe de altă parte, spectrele probelor care conțin atât calciu cât și ceriu prezintă în general picuri de difracție mai largi, caracteristice unui grad redus de cristalinitate a probelor de hidroxiapatită substituită cu ceriu, însă cu particule micro- și mezoporoase, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 1,5-1,8 nm și o suprafață specifică cuprinsă în intervalul 140-170 m^2/g , așa cum reiese din analiza Brunauer-Emmett-Teller (BET) a probelor.

2.e. Analiza FT-IR indică faptul că nu există diferențe semnificative între spectrul hidroxiapatitei pure și cel al hidroxiapatitei substituită cu ceriu, fără să existe numere de undă mai mari sau mai mici. Spectrele FT-IR arată că ionii de ceriu încorporați în rețeaua de hidroxiapatită implică o reducere a acidității de pe suprafața apatitică, respectiv o reducere a grupărilor P-OH.

2.f. Activitatea bacteriologică a probelor a fost studiată pe tulpini de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În cazul probelor de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu ceriu s-a utilizat ca metodă de testare, metoda difuzimetrică (testul Kirby Bauer Disk Diffusion). S-a demonstrat astfel că gradul de dezvoltare microbiană scade odată cu creșterea cantității de ceriu din probă, comparativ cu proba martor al fiecărei bacterii. De asemenea, se poate observa că microorganismul gram-negativ *Escherichia coli* prezintă o sensibilitate ușor ridicată față de probele substituite cu ceriu comparativ cu microorganismul gram-pozitiv *Staphylococcus aureus*. Datorită proprietăților bioactive pe care le prezintă, aceste nanopulberi pot fi considerate promițătoare în utilizarea lor ca și agenți antibacterieni.

3) obținerea de hidroxiapatită substituită cu bismut - aceste apatite substituite s-au obținut prin metoda precipitării; ele au aplicabilitate medicală deoarece ionul de bismut se comportă ca agent antimicrobian și agent anticancerigen. Încorporarea bismutului în structura hidroxiapatitei a dus la formarea unui compus cu proprietăți antimicrobiene excelente, putând fi utilizat în tratarea diferitelor infecții din organism:

3.a. Metoda bazată pe reacții de precipitare a fost folosită cu succes pentru a obține pulberi cristaline, nanometrice de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu bismut ($\text{Ca}_{10-x}\text{Bi}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $x = 0-7,5$). S-au utilizat ca materii prime: hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ca sursă de calciu; acid orthofosforic (H_3PO_4) ca sursă de fosfor și azotat de bismut ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ca sursă de bismut.

3.b. Analizele XPS, SEM-EDX, FTIR confirmă obținerea de hidroxiapatită simplă și substituită, ionul de bismut (Bi^{3+}) fiind încorporat cu succes în structura hidroxiapatitei. Produsele finale sunt formate din agregate sferice formate din nanoparticule cu o dimensiune de aproximativ 30-55 nm. Având în vedere creșterea conținutului de bismut cristalele devin din ce în ce mai mici și formează aglomerate datorită efectului de mărime.

3.c. Toate spectrele DRX prezintă linii de difracție caracteristice hidroxiapatitei, conform standardelor și literaturii de specialitate. Faza majoră, așa cum era de așteptat, este hidroxiapatita, confirmată prin comparația cu datele obținute prin JCPDS Data Card 09-0432 (pentru hidroxiapatită). Pe de altă parte, spectrele probelor care conțin atât calciu cât și bismut prezintă în general picuri de difracție mai largi, caracteristice unui grad redus de cristalinitate a probelor de hidroxiapatită substituită cu bismut, însă fără schimbări majore în structura cristalină.

3.d. Spectrele FT-IR demonstrează menținerea structurii de bază, hidroxiapatita, spectrele FT-IR arată că ionii de bismut încorporați în rețeaua de hidroxiapatită reduce aciditatea de la suprafața apatitică, respectiv a grupărilor P-OH.

3.e. Activitatea bacteriologică a biocompozitelor a fost studiată pe tulpini de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. În cazul probelor de hidroxiapatită și hidroxiapatită substituită cu bismut s-a utilizat ca metodă de testare, metoda difuzimetrică (testul Kirby Bauer Disk Diffusion). S-a demonstrat astfel că gradul de dezvoltare microbiană scade odată cu creșterea cantității de bismut din probă, comparativ cu proba martor al fiecărei bacterii. De asemenea, se poate observa că bacteria gram-negativă *Escherichia coli* prezintă o sensibilitate ușor ridicată față de probele substituite cu bismut, iar bacteria gram-pozitivă *Staphylococcus aureus* prezintă o sensibilitate mai mare față de proba de hidroxiapatită simplă.

4) obținerea unui biomaterial compozit pe bază de acetat de celuloză, hidroxiapatită și / sau nistatină - compozitul obținut a fost utilizat ca și sistem de eliberare controlată a medicamentului în organism. A fost investigat studiul eliberării *in vitro* al nistatinei, iar acest compozit poate fi utilizat pentru transportul de medicament direct în aria de risc a infecției din organism, astfel s-a observat:

4.a. Imaginile SEM arată că macroporozitatea probelor compozite scade prin adăugarea de hidroxiapatită și / sau nistatină. Secțiunea transversală confirmă buna încorporare a hidroxiapatitei și nistatinei în matricea polimerică. Probele au fost caracterizate și prin spectroscopie ATR-FTIR. Spectrele ATR-FTIR ale probelor compozite (AC-HA, AC-Nis și AC-HA-Nis) prezintă benzi adiționale ce aparțin hidroxiapatitei și / sau nistatinei din matricea polimerică de acetat de celuloză (figura IX.13). Analiza SEM și ATR-FTIR demonstrează faptul că toate cele trei substanțe s-au încorporat cu succes, obținându-se matrici polimerice cu structuri poroase asimetrice ce permit utilizarea lor în ingineria tisulară ca membrane suport pentru medicamente.

4.b. Studiul eliberării *in vitro* a nistatinei indică faptul că aceste compozite pe bază de acetat de celuloză ce conțin cristale de hidroxiapatită și nistatină duc la o eliberare mult mai rapidă a medicamentului decât proba ce conține doar nistatină. Eliberarea nistatinei din compozite urmează mecanismul de difuzie Fickian. Aceste compozite pot fi utilizate pentru transportul de medicament direct în aria de risc a infecției din organism.

4.c. Determinarea gradului de degradare și de umflare a biocompozitelor ne ajută să evidențiem capacitatea probelor obținute de a absorbi apă deionizată și PBS, proprietate benefică pentru eliberarea controlată a medicamentelor în organism. Astfel, cel mai mare grad de umflare în apă deionizată și în soluție PBS atins în cel mai scurt timp a fost observat pentru proba AC-HA, urmată de probele AC-HA-Nis, AC-Nis și compozitul AC. Acest rezultat este, probabil, o consecință a creșterii numărului de grupări hidrofile ale sistemului polimer datorită adăugării de hidroxiapatită. Se poate concluziona că membrana AC-HA poate fi utilizată cu succes ca matrice polimerică în eliberarea controlată a medicamentelor prin capacitatea sa de a absorbi apă și soluție PBS.

4.d. Testele antimicrobiene au demonstrat activitatea antifungică a compozitelor AC-Nis și AC-HA-Nis, cu o zonă de inhibiție ce are diametrul > 15 mm. Membranele încărcate cu nistatină au prezentat un efect de inhibare clară asupra creșterii tulpinii *Candida albicans* sugerând astfel, potențiala lor utilizare clinică cu un apel mare pentru tratamentul infecțiilor locale.

Gradul de noutate al prezentei teze de doctorat constă în obținerea de noi biomateriale pe bază de **hidroxiapatită substituită cu Ce(IV) și Bi(III)**, precum și compozite pe bază de **hidroxiapatită/acetat de celuloză/nistatină**, acestea dovedind a fi compatibile cu organismul uman, prin efectul terapeutic pe care îl manifestă.

Lucrarea de doctorat are o extindere de 207 pagini și cuprinde 85 figuri (51 originale), 31 tabele (19 tabele originale), 217 de trimiteri bibliografice actualizate, dintre care 10 citări contribuția autoarei.

Rezultatele cercetărilor efectuate sunt cuprinse în 7 articole publicate (dintre care 3 lucrări în reviste ISI, 2 în reviste BDI și 2 lucrări în volumele simpoziunelor) și, respectiv, prin participarea la 8 manifestări științifice (naționale și internaționale).

DISEMINAREA REZULTATELOR

Lucrări științifice publicate / acceptate spre publicare în reviste cotate ISI

1. G. Ciobanu, **A. M. Bargan**, C. Luca, *Nystatin - Loaded cellulose acetate / hydroxyapatite*, Rev. Chimie (Bucharest), 64, No.12, 1426 - 1429, 2013 (IF: 0,538).
2. **A. M. Bargan**, G. Ciobanu, C. Luca, E. Horoba, *Influence of the citric acid on the substituted calcium phosphates morphology*, Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia, Volume 58 (LVIII), 137 - 145, 2013 (IF:0,089).
3. **A. M. Bargan**, G. Ciobanu, C. Luca, M. Diaconu, I. G. Sandu, *Cellulose acetate / hydroxyapatite / nystatin biocomposites with antifungal activity*, Materiale Plastice, 51, no.2, pp: 167-171, 2014 (IF:0,379).
4. G. Ciobanu, **A. M. Bargan**, C. Luca, *Preparation and characterization of cerium-substituted hydroxyapatite nanoparticles*, Korean Journal of Chemical Engineering, 2014 (IF:1,241), trimisă spre publicare.
5. G. Ciobanu, **A. M. Bargan**, C. Luca, *Preparation and characterization of bismuth-substituted hydroxyapatite nanoparticles*, Archive of Environmental Protection, 2014 (IF: 0,901), trimisă spre publicare.

Lucrări publicate în reviste de specialitate indexate în baze de date internaționale (BDI)

1. **A. M. Bargan**, S. Ilisei, G. Ciobanu, C. Luca, *Sinteza și caracterizarea pulberilor nanocristaline de hidroxiapatită* (engl., rez. rom.), Buletinul Institutului Politehnic din Iasi, Secția Chimie și Inginerie Chimică, publicat de "Gheorghe Asachi" Technical University of Iasi, Tomul LVIII (LXII), Fasc. 1, p. 229, 2012.
2. **A. M. Bargan**, S. Ilisei, G. Ciobanu, C. Luca, *Influence of different calcium and phosphorus sources in the synthesis of nanohydroxyapatite powder*, Buletinul Institutului Politehnic din Iași, Secția Chimie și Inginerie Chimică, Tomul LIX (LXIII), Fasc. 2, pp. 81 – 87, 2013.

Lucrări comunicate la simpozioane și manifestări științifice internaționale

1. G. Ciobanu, **A. M. Bargan**, C. Luca, *Synthesis and characterisation of hydroxyapatite doped with cerium ions*, International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering Sixth Edition - APRIL 24th –27th 2012, Bacău, România, (poster).
2. S. Ilisei, **A. M. Bargan**, G. Ciobanu , C. Luca, *Biocompozite 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).
3. **A. M. Bargan**, S. Ilisei, 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).

Lucrări comunicate la simpozioane și manifestări științifice naționale

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); lucrare publicată în volumul conferinței: pp 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 (poster); lucrare publicată în volumul conferinței: pp 23-27.

3. 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).

6. **A. M. Bargan**, G. Ciobanu, C. Luca, *Methods used for heavy metals removal from wastewater*, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, ediția a VIII-a, Iași, 17-18 noiembrie 2011, (poster).

BIBLIOGRAFIE (selecție)

Agarwal S., Thakur K., Kanga A., Singh G., Gupta P., *Catheter-related candidemia caused by Candida lipolytica in a child with tubercular meningitis*, Indian Journal of Pathology and Microbiology, 51, 298-300, 2008.

Alili L., Sack M., Karakoti A. S., Teuber S., Puschmann K., Hirst S. M., Reilly C. M., Zanger K., Stahl W., Das S., Seal S., Brenneisen P., *Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumorestroma interactions*, Biomaterials 32: 2918-2929, 2011.

Aulin C., Netrval J., Wagberg L., Lindstrom T., *Aerogels from nanofibrillated cellulose with tunable oleophobicity*, Soft. Matter., 6(14): 3298-3305, 2010.

Barbosa M. A., Granja P. L., Barrias C. C., Amaral I. F., *Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration*, ITBM-RBM, 26: 212-7, 2005.

Bargan A. M., Ilisei S., Ciobanu G., Luca C., *Influence of different calcium and phosphorus sources in the synthesis of nanohydroxyapatite powder*, Buletinul Institutului Politehnic din Iași, Secția Chimie și Inginerie Chimică, Tomul LIX (LXIII), Fasc. 2, pp. 81 – 87, 2013.

Bargan A. M., Ciobanu G., Luca C., Diaconu M., Sandu I. G., *Cellulose acetate / hydroxyapatite / nystatin biocomposites with antifungal activity*, Materiale Plastice, 51, 2: 167-171, 2014.

Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Truck M., *Antibiotic susceptibility testing by a standardize disc method*. Am J Clin Pathol; 45: 493-495, 1966.

Baumer A., **Caruba R.**, Bizouard H., Peckett A., *Synthetic chlorapatite: substitution and inclusion of trace quantities of manganese, cerium, uranium and thorium*, Can. Mineral. 21: 567-573, 1983.

Beche E., Charvin P., Perarnau D., Abanades S., Flamant G., *Ce 3d XPS investigation of cerium oxides and mixed cerium oxide ($Ce_xTi_yO_2$)*, Surf. Interface Anal., 40: 264-267, 2008.

Bindu H., Vidyavathi M., Kavitha K., Sastry T. P., *Preparation and evaluation of ciprofloxacin loaded chitosan-gelatin composite films for wound healing activity*, International Journal of Drug delivery, 2: 173-182, 2010.

Chen F., Liu C., Mao Y., *Bismuth-doped injectable calcium phosphate cement with improved radiopacity and potent antimicrobial activity for root canal filling*, Acta Biomater., 6(8):3199-207, 2010.

Ciobanu G., Carja G., Ciobanu O., *Structural characterization of hydroxyapatite layer coatings on titanium supports*, Surf. Coat. Tech. 202: 2467-2470, 2008.

- Ciobanu G.**, Ignat D., Carja G., Luca C., *Hydroxyapatite/polyurethane composite membranes for lead ions removal*, Environ. Eng. Manage. J., 8: 1347-1350, 2009.
- Ciobanu M. G.**, Carja G., *Biomateriale anorganice. Fundamente și aplicații*, Performantica Iași, 1, 2010.
- Ciobanu G.**, Ilisei S., Luca C., Carja G., Ciobanu O., *The effect of vitamins to hydroxyapatite growth on porous polyurethane substrate*, Prog. Org. Coat., 74: 648-653, 2012.
- Ciobanu G.**, **Bargan A. M.**, Luca C., *Nystatin-loaded Cellulose Acetate / Hydroxyapatite Biocomposites*, Rev. Chim. (Bucharest), **64**, No.12, p. 1426, 2013.
- Cotton T. P.**, Geisler T. M., Holden D. T., Schwartz S. A., Schindler W. G., *Endodontic applications of cone beam volumetric tomography*, J. Endod., 33, 1121-1132, 2007.
- Cox S.**, Jamshidi P., Grover L., Mallick K., *Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation*, Mater. Sci. Eng. C, 35: 106-114, 2014.
- Dietrich E.**, Oudadesse H., Lucas-Girot A., Le Gal Y., Jeanne G. S., *Effects of Mg and Zn on the surface of doped melt-derived glass for biomaterials applications*, Applied Surface Science, 255:391-395, 2008.
- Dorozhkin S. V.**, *Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine*, Materials, 2, 2009.
- Eichert D.**, Drouet C., Sfihia H., Rey C., Combes C., *Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization*, in: J.B. Kendall (Ed.), Biomaterials Research Advances, Nova Science Publishers, New York, pp. 93-143, 2010.
- Feng Z.**, Liao Y., Meng Y., *Synthesis and structure of cerium-substituted hydroxyapatite*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 16:417-421, 2005.
- Getman E. I.**, Ignatov A. V., Loboda S. N., Abdul Jabar M. A. B., Zhegailo A. O., Gluhova A. S., *Substitution of samarium for strontium in the structure of hydroxyapatite*, Funct. Mater. 18: 293-297, 2011.
- Goldschmidt V.**, *The principles of distribution of chemical elements in minerals and rocks*, Journal of the Chemical Society, 655-673, 1937.
- Gonzales F. P.**, Maisch T., *XF Drugs: A New Family of Antibacterials*, Drug News Perspect., 23: 167-174, 2010.
- Greenhalgh D.**, *Topical antimicrobial agents for burn wounds*, Clin. Plastic. Surg., 36: 597-606, 2009.
- Guo D. G.**, Wang A. H., Han Y., Xu K. W., *Characterization, physicochemical properties and biocompatibility of La-incorporated apatites*, Acta Biomater., 5: 3512-3523, 2009.
- Habibi Y.**, Lucia L. A., Rojas O. J., *Cellulose nanocrystals: Chemistry, selfassembly, and applications*, Chemical Reviews, 110(6):3479-3500, 2010.
- Hainze T. J.**, Glasser W. G., *Cellulose derivatives, modification, characterization and nanostructures*, ACS Symp. Ser., Am. Chem. Soc., Washington DC., 688, 1996.
- Hassfjell S.**, Kongshaug K. O., Rømming C., *Synthesis, crystal structure and chemical stability of bismuth(III) complexed with 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetramethylene phosphonic acid (H-8DOTMP)*, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 14: 33, 2003.
- Hoffman A. S.**, *The origins and evolution of controlled drug delivery systems*, Journal of Controlled Release, 132, 153, 2008.
- Huang R.**, Wallqvist A., Covell D. G., *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action*, Biochem. Pharmacol., 69: 1009, 2005.
- Karakoti A. S.**, Monteiro-Riviere N. A., Aggarwal R., Davis J. P., Narayan R. J., Self W. T., McGinnis J., Seal S., *Nanoceria as antioxidant: synthesis and biomedical applications*, JOM, 60: 33-37, 2008.
- Kato K.**, Eika Y., Ikada Y., *In situ hydroxyapatite crystallization for the formation of hydroxyapatite / polymer composite*, J. Mater. Sci., Med., 32 (20): 5533-43, 1997.

- Keblinski P.**, Wolf D., Cleri F., Phillpot S. R., Gleiter H., *On the nature of grain boundaries in nanocrystalline diamond*, MRS Bull, 36, 1998.
- Keblinski P.**, Phillpot S. R., Wolf D., Gleiter H., *Amorphous structure of grain boundaries and grain junctions in nanocrystalline silicon by molecular-dynamics simulation*, Acta Mater, 45:987, 1997.
- Kikuchi M.**, Itoh S., Tanaka J., *Self organization mechanism in a bone like hydroxyapatite/collagen nanoconposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo*, Biomaterials, 22:1705-1711, July 2001.
- Kim H. W.**, Knowles J. C., Kim H. E., *Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds*, J. Biomed. Mater. Res., 72A:136-45, 2005a.
- Kotani T.**, Nagai D., Asahi K., Suzuki H., Yamao F., Kataoka N., Yagura T., *Antibacterial Properties of Some Cyclic Organobismuth(III) Compounds*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(7): 2729-2734, July 2005.
- Lavoine N.**, Desloges I., Dufresne A., Bras J., *Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review*, Carbohydrate Polymers, 90, 735-764, 2012.
- Leonelli C.**, Lusvardi G., Malavasi G., Menabue L., Tonelli M., *Synthesis and characterization of cerium-doped glasses and in vitro evaluation of bioactivity*, J Non-CrystSolids, 316:198-216, 2003.
- Levason W.**, Reid G., *Comprehensive Coordination Chemistry II: Coordination Chemistry of the S, P, and F Metals*, Elsevier Pergamon, Amsterdam, 3, 465, 2004.
- Lin Y. G.**, Yang Z. R., Cheng J., *Preparation, characterization and antibacterial property of cerium substituted hydroxyapatite nanoparticles*, J Rare Earths, 25: 452-456, 2007.
- Lode H. M.**, *Clinical Impact of Antibiotic-Resistant Gram-Positive Pathogens*, Clin. Microbiol. Infect., 15: 212-217, 2009.
- Marshall B. J.**, *The use of bismuth in gastroenterology*, Am. J. Gastroenterol., 86(1):16-25, 1991.
- Meyers M. A.**, Chen P.-Y., Lin A. Y.-M., Seki Y., *Biological materials: structure and mechanical properties*, Progress in Materials Science, 53:1-206, 2008.
- Mizushima Y.**, Ikoma T., Tanaka J., Hoshi K., Ishihara T., Ogawa Y., Ueno A., *Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs*, J. Control. Release, 110:260-265, 2006.
- Monographs** on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Geneva: *World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, 1972 - PRESENT.(Multivolumework). Available at: <http://monographs.iarc.fr/index.php>, 87:241-2, ChemIDplus, 2006,
- Moritz M.**, Geszke-Moritz M., *The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles*, Chemical Engineering Journal, 228:596-613, 2013.
- Nayak A. K.**, *Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview*, International Journal of ChemTech Research, 2 (2): 903-907, 2010.
- NCCLS**, *Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts*, Approved Standard M44-A2, 2008.
- Neișescu C. D.**, Chimie Generală, Editura Tehnică, București, 1963.
- Neves das J.**, Pinto E., Teixeira B., Dias G., Rocha P., Cunha T., Santos B., Amaral Maria H., Bahia maria F., *Local treatment of vulvovaginal candidosis:general and practical considerations*, Drugs, 68, 1787-1802, 2008.

- Offner F.**, Krcmery V., Boogaerts M., Doyen C., Engelhard D., P. Ribaud, Cordonnier C., Pauw de B., Durrant S., Marie J.-P., Moreau P., Guiot H., Samonis G., Sylvester R., Herbrecht R., *Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, 4808-4812, 2004.
- Pasteris J. D.**, Wopenka B., Valsami-Jones E., *Bone and tooth mineralization: why apatite?*, Elements, 4:97-104, 2008.
- Pistofidis N.**, Vourlias G., Konidaris S., Pavlidou El., Stergiou A., Stergioudis G., *The effect of bismuth on the structure of zinc hot-dip galvanized coatings*, Materials Letters, 61(4-5): 994, 2007.
- Puppi D.**, Chiellini F., Piras A. M., Chiellini E., *Polymeric materials for bone and cartilage repair*, Progress in Polymer Science 35: 403-440, 2010.
- Ramesh S.**, Tan C. Y., Yeo W. H., Tolouei R., Amiryan M., Sopyan I., Teng W. D., *Effects of bismuth oxide on the sinterability of hydroxyapatite*, Ceramics International 37: 599-606, 2011.
- Resende N. S.**, Nele M., Salim V. M. M., *Effects of anion substitution on the acid properties of hydroxyapatite*, Thermochimica Acta, 451: 16-21, 2006.
- Richardson W. H.**, Wiberg K. B., *Ceric Ion Oxidation of Organic Compounds*, Academic Press, New York, p. 243, 1965.
- Sadat-Shojai M.**, *Preparation of hydroxyapatite nanoparticles: Comparison between hydrothermal and treatment processes and colloidal stability of produced nanoparticles in a dilute experimental dental adhesives*, J. Iranian Chem. Soc., 6 (2):386-392, 2009.
- Santos M. H.**, Oliveira de M., Freitas de S. P., Mansur H. S., Vasconcelos W. L., *Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process*, Mater. Res., 7 (4): 625-630, 2004.
- Sato M.**, Kondoh M., *Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals*, Tohoku J. Exp. Med., 196, 9-22, 2002.
- Schaffner C. P.**, *Polyene macrolides in clinical practice: Pharmacology and other adverse effects*, In S. Omura (Ed.), Macrolide antibiotics: Chemistry, biology and practice, New York: Academic Press, 457-507, 2002.
- Serret A.**, Cabanas M. V., Vallet-Regi M., *Stabilization of calcium oxyapatites with lanthanum(III)-created anionic vacancies*, Chem. Mater. 12: 3836-3841, 2000.
- Shanmugam S.**, Gopal B., *Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of aliovalent substituted hydroxyapatite*, Appl. Surf. Sci., 303: 277-281, 2014.
- Shimoda S.**, Aoba T., Morenoe E., Miake Y., *Effect of solution composition on morphological and structural features of carbonated calcium apatites*, J. Dent. Res., 69:1731, 1990.
- Simon J.**, Muller H. P., Koch R., Muller V., *Thermoplastic and biodegradable polymers of cellulose*, Polymer Degradation and Stability, 59, 107-115, 1998.
- Siqueira G.**, Bras J., Dufresne A., *Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications*, Polymer, 2, 4, 728-765, 2010a.
- Smith G. F.**, *Cerate Oxidimetry*, G. Frederick Smith Chemical Co., Columbus, Ohio, 1964.
- Son J. S.**, Appleford M., Ong J. L., Wenke J. C., Kim J. M., Choi S. H., Oh D. S., *Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres*, Journal of Controlled Release, 153:133-140, 2011.
- Stoltenberg M.**, Juhl S., Danscher G., *Bismuth ions are metabolized into autometallographic traceable bismuth-sulphur quantum dots*, Eur. J. Histochem., 51(1):53-7, 2007.
- Suchanek W.**, Yoshimura M., *Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants*, Journal of Materials Research, 13:94-117, 1998.

- Suchanek W. L., Riman R. E.,** *Hydrothermal synthesis of advanced ceramic powders*, Adv. Sci. Technol., 45: 184-193, 2006.
- Summers S. P., Abboud K. A., Farrah S. R., Palenik G. J.,** *Syntheses and structures of bismuth(III) complexes with nitrilotriacetic acid, ethylenediaminetetraacetic acid, and diethylenetriaminepentaacetic acid*, Inorg. Chem., 33: 88-92, 1994.
- Suzuki T., Hatsushika T., Yasumasa H.,** *Synthetic hydroxyapatites employed as inorganic cation-exchangers*. J. Chem. Soc., Faraday, 78: 3605-3611, 1982.
- Toxicological review** of Cerium Oxide and Cerium Compounds, EPA/635/R-08/002F, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC, September 2009.
- Vallet-Regí M., Ruiz-Hernández E.,** *Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine*, Adv. Mater, 23:5177-5218, 2011.
- Vereștiuc L.,** *Biomateriale și biocompatibilitatea acestora cu organismul uman- curs*, Universitatea de Medicină și Farmacie “ Gr. T. Popa” , Facultatea de Bioinginerie Medicală, Iași, 2010.
- Wang H. X., Guan S. K., Wang X., Ren C. X., Wang L. G.,** *In vitro degradation and mechanical integrity of Mg–Zn–Ca alloy coated with Ca-deficient hydroxyapatite by the pulse electrodeposition process*, Acta Biomaterialia, 6:1743-1748, 2010.
- Waters N. E.,** *Some mechanical and physical properties of teeth*, Symposia of the Society for Experimental Biology, 34:99-135, 1980.
- Webster T. J., Massa-Schlueter E. A., Smith J. L., Slamovich E. B.,** *Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations*, Biomaterials, 25(11): 2111-21, 2004.
- Yang N., Sun H.,** *Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances*, Coordination Chemistry Reviews, 251: 2354-2366, 2007.
- Yang N., Sun H.,** *Application of Arsenic, Antimony and Bismuth in Medicine*, Progress in Chemistry, 21(05): 856-865, 2009.
- Yasukawa A., Gotoh K., Tanaka H., Kandori K.,** *Preparation and structure of calcium hydroxyapatite substituted with light rare earth ions*, Colloid Surface, 393: 53-59, 2012.
- Yu D .G., Chatterton N. P., Yang J. H., Wang X., Liao Y. Z.,** *Coaxial electrospinning with triton X-100 solutions as sheath fluids for preparing PAN nanofibers*, Macromol. Mater. Eng., **297**, 395-401, 2012a.
- Zhou G., Li Y., Zheng B., Wang W., Gao J., Wei H., Li S., Wang S., Zhang J.,** *Cerium oxide nanoparticles protect primary osteoblasts against hydrogen peroxide induced oxidative damage*, Micro Nano Letters 9: 91-96, 2014.
- Zhou S. F., Lei W. Q., Jiang, Hao J. H., Wu E., Zeng H. P., Qiu J. R.,** *Space-selective control of luminescence inside the Bi-doped mesoporous silica glass by a femtosecond laser*, J. Mater. Chem. 19, 4603, 2009.