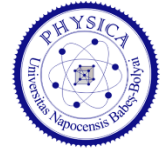




Universitatea Babeş-Bolyai, Facultatea De Fizică



Sintetizarea și caracterizarea unor sticle bioactive încărcate cu Acid Ascorbic

Teză de Doctorat

-rezumat

Student Doctorand: Emőke Lászlóffi

Conducător Științific: Prof. Dr. Viorica Simon

Cluj Napoca, 2013

Conținut

Introducere	3
2. Metode de experimentale	4
2.1. DTA (Analiza termică diferențială) și TGA (Analiza termogravimetrică)	4
2.2. Difracția de raze X	4
2.3. Spectroscopie în infraroșu.....	4
2.4. Analiza de suprafață specifică	4
2.5. Microscopul electronic de baleaj (SEM)	4
2.6. Spectrometria de fluorescență.....	4
3. Caracterizarea probelor Xerogel Și Aerogel încărcate cu vitamina C	5
3.1. Materialele folosite și metoda de preparare	5
3.2. Încorporarea acidului ascorbic	7
3.3. Rezultate experimentale.....	8
3.3.1. Analiza termica diferentiaa (DTA) și analiza termogravimetrică (TGA).....	8
3.3.2. Difracția de raze X	12
3.3.3. Spectroscopia în infrarosu.....	14
3.3.4. Măsurători de suprafață specifică și volum de pori	17
4. Studii in vitro de bioactivitate și atașare a proteinei	19
4.1. Bioactivitatea probelor Xerogel și Aerogel	19
4.2. Studiul atașării proteinelor pe suprafață	24
Concluzii	29
Referințe.....	30

Introducere

Scopul acestei teze este sintetizarea și caracterizarea unor noi materiale bioactive cu posibile aplicații, pe viitor, în ingineria țesuturilor și medicina regenerativă.

Unul dintre cele mai promițătoare biomateriale cu aplicații în ingineria țesutului osos sunt sticlele bioactive, bioceramicile, cum ar fi hidroxiapatita (HA), fosfatul de calciu, și materialele compozite[1-4]. În cazul biomaterialelor utilizate în aplicațiile osoase s-a demonstrat că prezența radicalilor liberi poate duce la o scădere treptată a formării stratului osos. Importanța introducerii antioxidantilor în aceste sisteme pentru a crea un suport adecvat, care favorizează creșterea osteoblastelor și diminuează activitatea osteoclastelor, arată o creștere semnificativă în ultimii ani [5,6,7].

Lucrarea se bazează pe sintetizarea probelor Xerogel (cu pH 2, 4.5, 7.5) și Aerogel prin metoda sol-gel în sistemul $56\text{SiO}_2\text{-}40\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$, noutatea fiind doparea acestora cu vitamina C. Încorporarea acidului ascorbic s-a realizat în trei moduri: în timpul sintetizei prin adăugare la soluția finală, al doilea mod prin imersarea probei uscate la 100°C și probele xerogel tratate termic în soluție de acid ascorbic, și al treilea mod prin imersarea probelor Xerogel (pH diferit) și Aerogel în soluție de vitamina C sub atmosferă de argon.

Teza este împărțită pe 5 capitole, primul capitol prezintă aspecte din literatura legate de definirea biomaterialelor și a biocompatibilității, cuprinde informații generale despre metoda sol-gel, obținerea materialelor Xerogel și Aerogel, axat pe interacțiunea dintre suprafață și proteină și pe importanța vitaminei C în formarea oaselor. Al doilea capitol prezintă tehnicile de caracterizare utilizate pentru analiza materialelor folosite în această lucrare, de asemenea descrie și protocoalele folosite pentru studiile in vitro. Al treilea capitol oferă o descriere detaliată a analizelor facute pe acid ascorbic folosit. În ultimele două capitole sunt prezentate procedurile experimentale atât prepararea și analiza probelor, precum și, rezultatele obținute. Fiecare capitol este urmat de referințe, iar la finalul capitolului 4 și 5 sunt prezentate și concluziile.

2. Metode de experimentale

2.1. DTA (Analiza termică diferențială) și TGA (Analiza termogravimetrică)

Analiza DTA și TGA au fost efectuate în aer cu analizorul Shimadzu DTG-60H în creuzete de alumină. Pentru a investiga comportamentul termic, probele uscate au fost încălzite cu viteza de încălzire de 10 °C/min, de la temperatura camerei până la 500°C pentru vitamina C și până la 1000 °C pentru celelalte probe.

2.2. Difracția de raze X

Structura probelor a fost analizată prin difracție de raze X, cu difractometru Shimadzu XRD-6000 folosind radiația Cu Ka ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), cu filtru de Ni. Spectrele au fost înregistrate între 10 ° și 80 ° în modul de scanare continuă 2θ , cu 2°/minut. Tensiunea și curentul au fost de 40 kV și respectiv 30 mA. Identificarea de fază a fost realizată prin compararea difractogramelor obținute cu datele standard pentru structura cristalină inorganică specifică unei faze, existente în baza de date (JCPDS).

2.3. Spectroscopie în infraroșu

Spectrele FT-IR au fost înregistrate cu un spectrometru JASCO FTIR 6200 în interval 4000-400 cm^{-1} . O cantitate mică din fiecare probă a fost amestecată cu pulbere de bromură de potasiu (KBr), presată sub formă de pastilă și analizată la o rezoluție de 4 cm^{-1} cu 256 scanari/probă.

2.4. Analiza de suprafață specifică

Suprafața specifică și volumul porilor au fost determinate cu un analizor Qsurf cu adsorbție-desorbție de N₂, care are la baza metoda Brunauer-Emmett-Teller (BET).

2.5. Microscopul electronic de baleaj (SEM)

Imaginile SEM au fost înregistrate cu un microscop FEI Quanta 3D FEG 200/600. În scopul de a amplifica semnalul electronilor secundari, probele au fost acoperite cu aur.

2.6. Spectrometria de fluorescență

Spectrele de fluorescență a proteinei (BSA) în reacție cu acid ascorbic au fost efectuate pe spectrofluorimetrul Jasco FP-6300. Lungimea de undă de excitație a fost de 295 nm și spectrele de fluorescență au fost înregistrate în intervalul 250-450 nm.

3. Caracterizarea probelor Xerogel Și Aerogel încărcate cu vitamina C

În scopul de a evalua influența acidului ascorbic de pe sticlele bioactive s-au preparat prin metoda sol - gel: o matrice simplă de siliciu și o proba cu compoziție de siliciu-calcium- fosfor acid ascorbic fiind încorporate în compozițiile lor în timpul fazei de sol. Comportamentele termice ale probelor au fost studiate cu DTA / TGA ,structura a fost analizată folosind XRD și FTIR . Sa observat că, după adăugarea de acid ascorbic soluțiile obținute sunt incolore și transparente, dar în timp, culoarea lor se schimbă în galben. După cum a fost raportată în și literatura de specialitate [13] ,densitatea culorii galbenă crește treptat, în timp ca urmare a oxidării. Rezultatele obținute pe SiO₂ și pe proba SiCaP încărcate cu acid ascorbic indică, de asemenea, faptul că acidul ascorbic nu are nici o influență negativă asupra formării gelului.

Pentru a îmbunătăți stabilitatea eșantioanelor după adăugarea AA, și în scopul de a preveni scaderea drastică a suprafeței specifice a după adăugare de AA, o altă metodă de încărcare a fost aplicată prin cufundarea pulberii uscate la 100 °C și celei tratate termic în soluție de AA. Conform rezultatelor obținute cea mai bună probă pentru alte investigații și pentru încărcare cu vitamina C pare a fi proba tratată termic. Rezultatele in-vitro confirmă faptul (menționat, de asemenea în literatura de specialitate), ca în prezența vitaminei C absorbția proteina este mai pronunțată pe suprafața probelor și în același timp, nu inhibă formarea stratului bioactiv de tip apatita.

Mai departe unul dintre obiectivele acestui studiu a fost încărcarea acidului ascorbic, sub atmosferă de argon, în probele Xerogel a căror pH a fost ajustat la trei valori diferite în timpul sintezei sol (2, 4.5 și 7.5) și în probele Aerogel uscate supercritic și tratate termic la temperatură ridicată, precum și caracterizarea schimbărilor structurale, morfologice și texturale induse după adăugare acidului ascorbic. De asemenea s-a urmărit cu o atenție specială modul în care acidul ascorbic introdus sub atmosfera de argon influențează bioactivitatea probelor investigate, precum și capacitatea de atașare a proteinelor pe suprafața probelor cu și fără vitamina C.

3.1. Materialele folosite și metoda de preparare

a) Sintetizarea probelor de tip Xerogel

Au fost preparate ,urmând tehnica sol-gel, probe Xerogel cu compoziția 56SiO₂-40CaO-4P₂O₅ (mol %) [8]. Pentru obținerea sticlelor s-au folosit următorii precursori: tetraetoxisilan SiC₈H₂₀O₄ (TEOS) ca precursor pentru dioxidul de siliciu, azotat de calciu tetrahidrat

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ ca precursor pentru oxidul de calciu, trietilphosphat (TEP) pentru obținerea pentaoxidului de fosfor.

S-a folosit ca și catalizator, acidul azotic (HNO_3). Precursorii TEOS și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ au fost amestecați separat cu apă distilată, TEOS:apă în raport molar 1:2, precursorul pentru Ca până la saturație, timp de 1/2h. Atât TEP-ul ca și precursorul pentru Ca au fost adăugați soluției cu TEOS și ținută apoi pe agitator timp de 1/2h. Timpul de așteptare între adăugarea componentelor a fost 1h. După omogenizare, soluția a fost împărțită în trei părți, iar pH-ul fiecărei cantități a fost setat la valori diferite (2, 4.5 respectiv 7.5). Probele au fost tratate termic la 700°C conform rezultatelor DTA .

b) Sintetizarea probelor de tip Aerogel

Pe baza unor studii anterioare[9] și luând în considerare faptul că procedura de uscare a probelor influențează încărcarea și absorbția acidului ascorbic precum și stabilitatea acestuia, a fost preparată proba Aerogel. (Aerogelurile descrise în acest studiu au fost preparate la Aerogel Lab, Departamentul de Chimie Anorganică și Analitică, Universitatea din Debrecen, folosind aceeași compoziție molară ca și în cazul xerogel 56% SiO_2 , 40% CaO , 4% P_2O_5).

Pașii următori pentru obținerea Aerogelului sunt:

1. prepararea gelurilor
2. schimbarea solventului (din apă și etanol în acetonă)
3. uscarea supracritică cu CO_2 .

După uscare supracritică (Figura 3.1), aerogelurile au fost tratate termic la 1050°C .

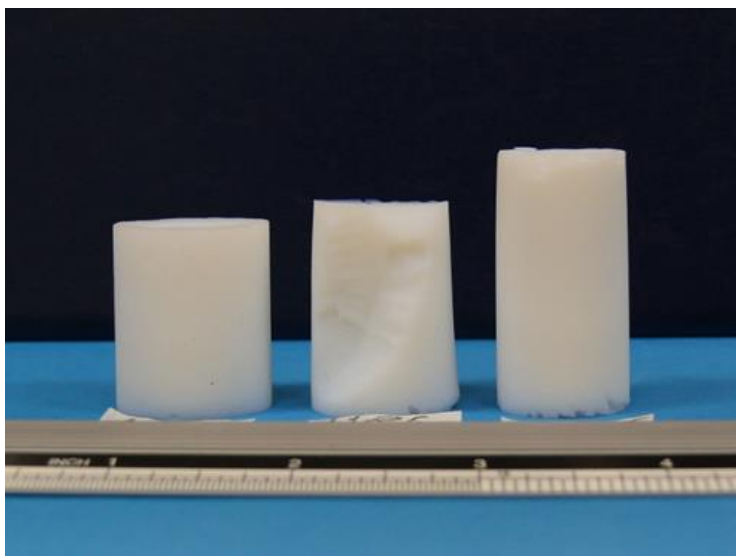
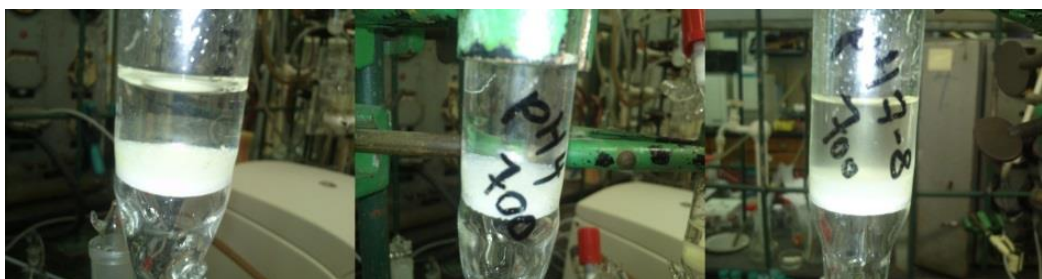


Figura 3.1 Probele Aerogel după uscare supracritică

3.2. Încorporarea acidului ascorbic

Încorporarea acidului ascorbic în probele Xerogel și Aerogel tratate a fost făcută sub atmosferă de argon, pentru a preveni descompunerea acidului ascorbic în dehidro acid ascorbic în contact cu aerul și apa. Această tehnică, este utilizată pentru a preveni reacția compușilor cu componentele din aer (apă sau oxigen), și se numește metoda “air-free”, iar această metodă funcționează cel mai bine cu argon, acesta fiind mai greu decât oxigenul.

Acidului ascorbic folosit s-a dizolvat în apă distilată deoxigenata sub atmosferă de argon, iar probele au fost spălate tot cu argon. Probele au fost ținute sub argon, în soluție de acid ascorbic, timp de 2 zile (Figura 3.2A și B), folosind metoda Schlenk, după care au fost uscate în vid, la temperatura camerei.



a) pH =2

b) pH=4.5

c) pH=7.5

Figura 3.2A Probele Xerogel în soluție cu vitamina C, sub atmosferă de argon

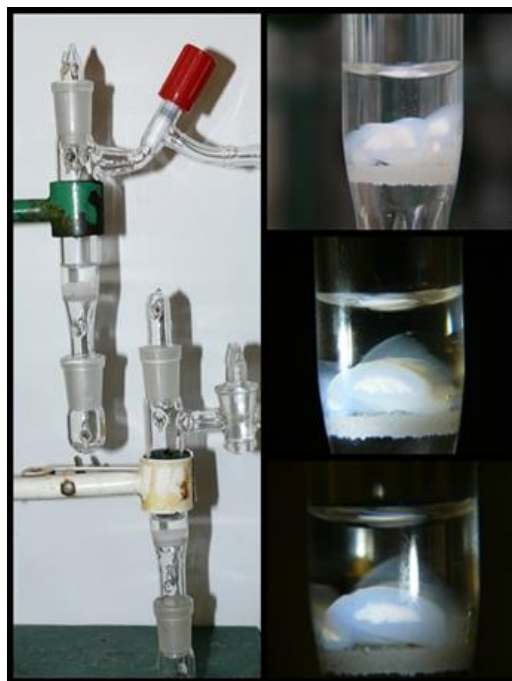


Figura 3.2B Probele Aerogel în soluție cu vitamina C, sub atmosferă de argon

3.3. Rezultate experimentale

3.3.1. Analiza termica diferentiala (DTA) și analiza termogravimetrică (TGA)

Descompunerea termică a acidului ascorbic și a celei recristalizate este prezentată în Figura 3.3. Rezultatele corelează cu datele din literatura de specialitate și arată că atât pe pulbere de acid ascorbic și cel recristalizat are o stabilitate până la temperatura de 200 °C. Acidul ascorbic începe să se descompună în jurul temperaturii de 197 °C cu o pierdere de masa de 36%.

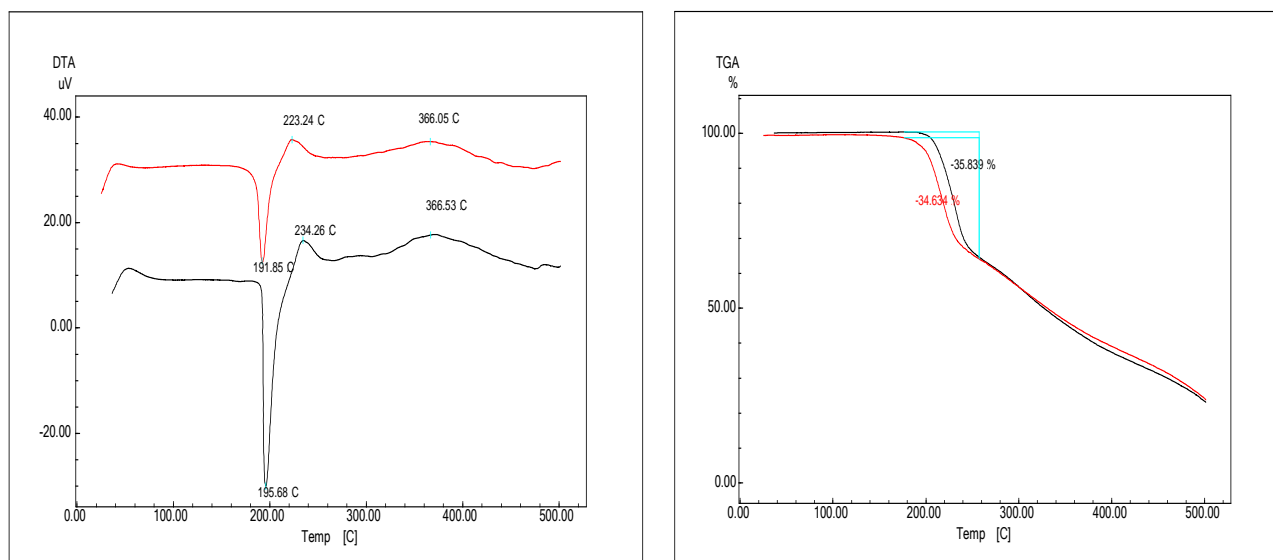


Figura 3.3 Rezultatele DTA și TG a vitaminei C , și a vitaminei C recristalizate

Rezultatele arată că, după recristalizare, descompunerea începe la temperatura mai joasă aproximativ 192 °C cu o pierdere de masă de 35% [9].

Curbele termogravimetrice pentru probele xerogel fără conținut de acid ascorbic înainte de tratament termic (Figura 3.4) prezintă mai multe regiuni cu pierdere de masă, prima dintre ele putând fi asociată cu eliminarea etanolului (între 50-60°C), iar a doua este asociată cu îndepărtarea moleculelor libere de apă (90-95°C). O a treia pierdere de masă poate fi observată până la 400°C și poate fi asociată cu descompunerea reziduurilor organice și eliminarea apei încapsulate în pori [10]. Alte pierderi de masă sunt observate până la 800°C și corespund procesului de dehidroxilare a sticlelor și eliminarea reziduurilor organice. Analiza termica indică, de asemenea, faptul ca temperatura de cristalizare a probelor se produce in jur de 700°C, fapt pentru care s-a ales tratamentul termic a Xerogelurilor la 700°C.

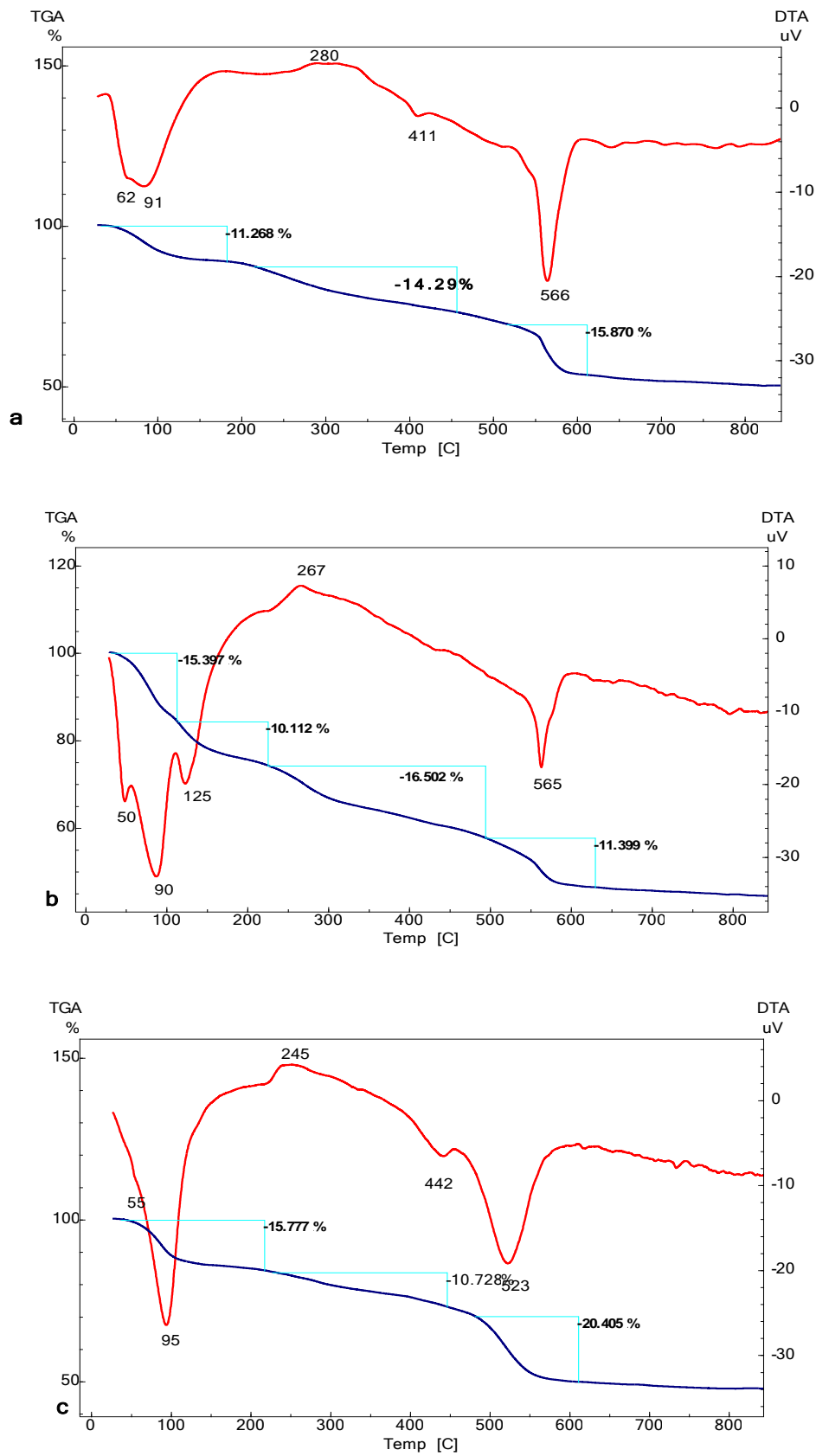


Figura 3.4 Rezultatele DTA si TG pentru probele Xerogel: pH= 2 (a), pH=4.5 (b), pH=7.5(c)

În cazul Aerogelului (Figura 3.5.), așa cum era de așteptat, nu se evidențiază evenimente semnificative, ceea ce înseamnă că rezidurile din preparare au fost eliminate în timpul schimbării solventului și a uscării supracritice. Din curba TG s-a calculat că pierderea de masă este de aproximativ 10%, ca urmare a schimbărilor induse în densitatea relativă a probelor prin tratament termic.

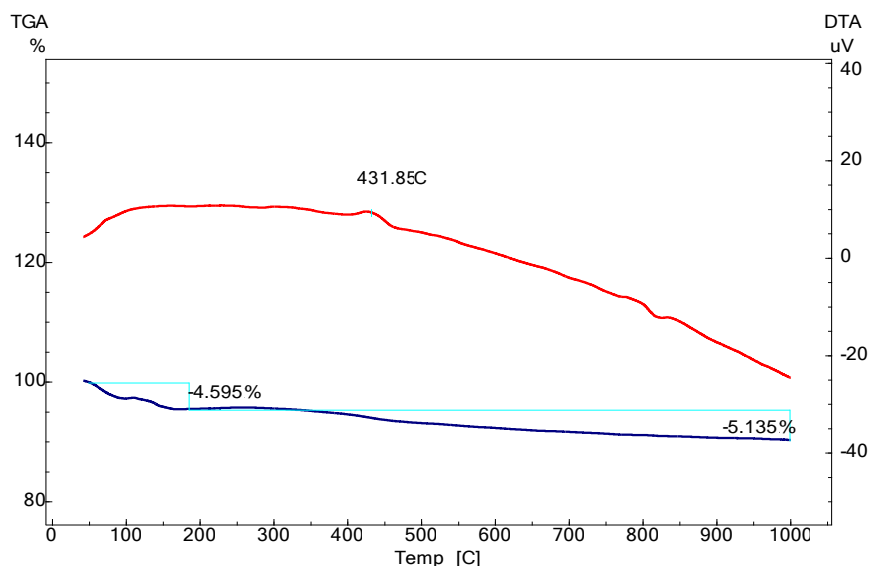


Figura 3.5 Rezultatele DTA și TG pentru proba aerogel

Rezultatele obținute pe probele cu conținut de acid ascorbic (Figura 3.6) arată prezența a două evenimente termice importante însoțite de pierdere de masă, în curba TG. În cazul Xerogelurilor cu pH diferit, primul eveniment endoterm din intervalul 60-70°C, poate fi asociat cu eliminarea apei folosite la introducerea vitaminei C. Al doilea eveniment endoterm, situat la 190 °C în cazul probelor cu pH =2 și 4.5 și în intervalul 220-345 °C în cazul probei cu pH=7.5, corespunde descompunerii vitaminei C.

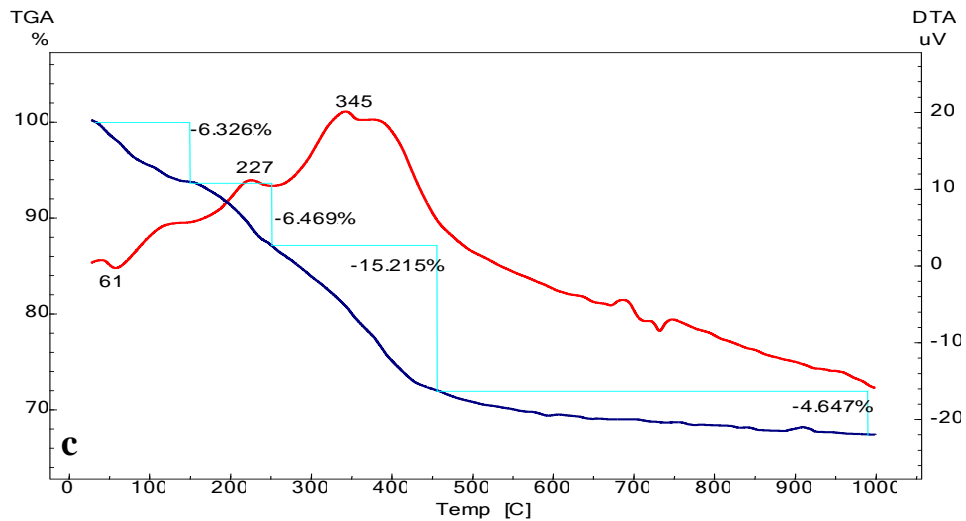
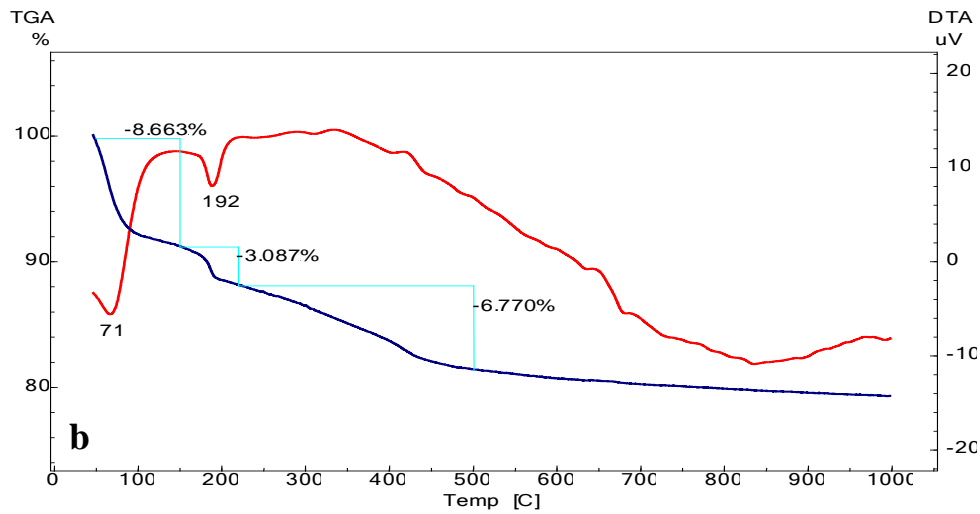
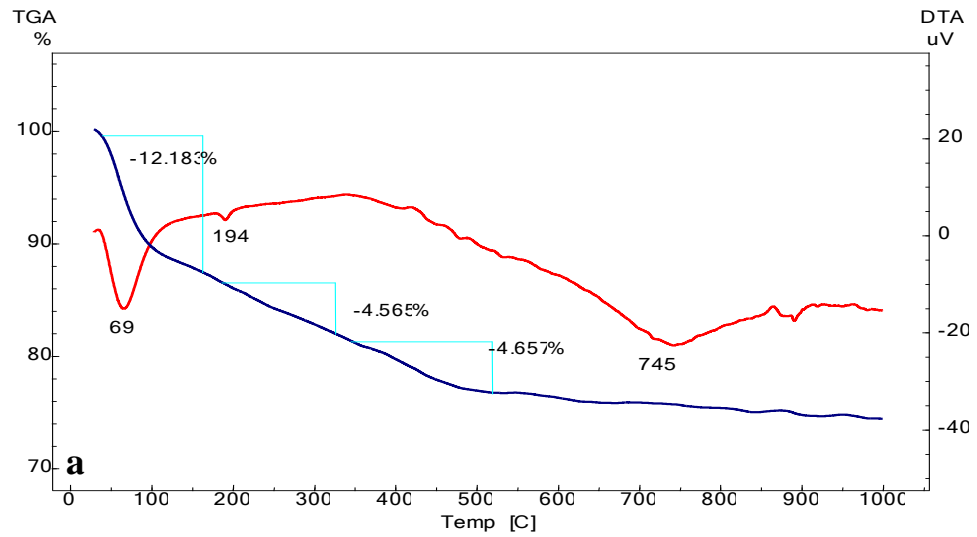


Figura 3.6. Rezultatele DTA și TG pentru probele xerogel cu conținut de acid ascorbic;
pH=2(a), pH=4.5 (b), pH=7.5 (c)

Rezultatul obținut pe proba Aerogel cu conținut de vitamina C (Figura 3.7) prezintă un eveniment exoterm la 180 °C și unul endoterm la 346 °C, ambele putând fi atribuite descompunerii mai lente a vitaminei C, careia îi corespunde în curba TG o pierdere de masă de 30%, apropiată celei obținute pe vitamina C .

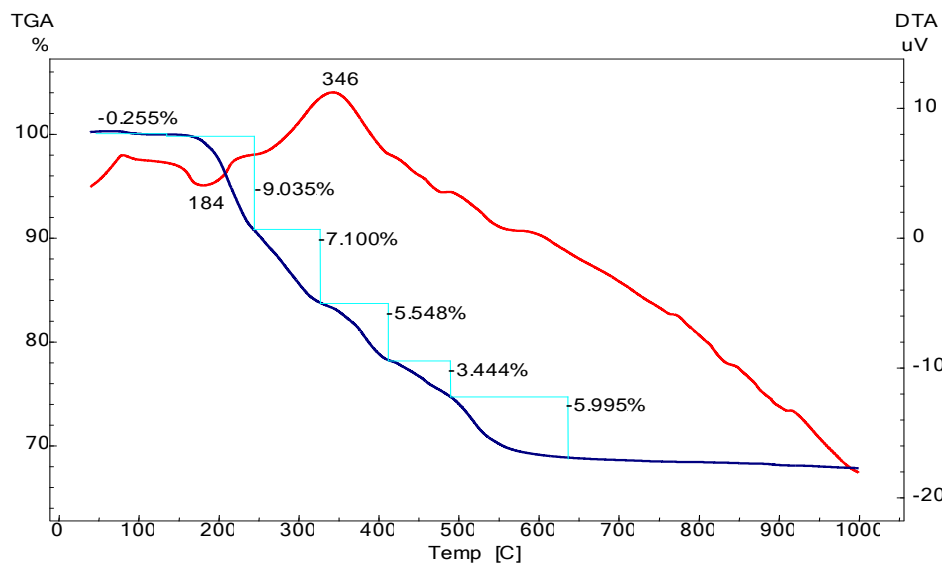


Figura 3.7. rezultatele DTA și TG pentru proba aerogel cu conținut de acid ascorbic

3.3.2. Difrakția de raze X

Difractogramele obținute pe vitamina C (figura3.8) arată prezența a multiple peak-uri cristaline în intervalul $2\theta = 5-80^\circ$. Difractograma acidului ascorbic recristalizat este comparat cu rezultatul obținut înainte de recristalizare și corelat cu datele din literatura de specialitate. Diferențe majore se pot observa în cazul peak-urilor caracteristice situate la $2\theta = 10.04, 24.92, 27, 28.20$ and 30.10° , peak-urile localizate la $2\theta = 10.04, 39.46, 40^\circ$ sunt mai puțin vizibile după recristalizare. Aceste diferențe se datorează reacției solvent-vitamina C și a re poziționării legăturilor C=O și HO din molecula de vitamina [11].

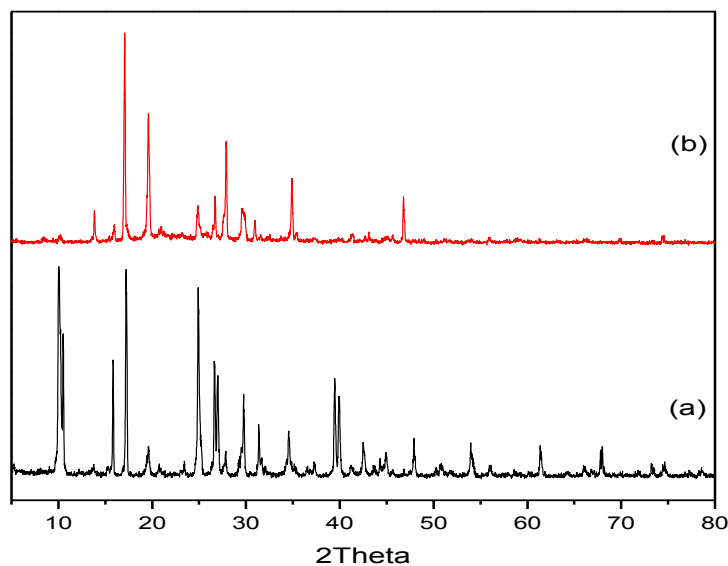


Figura 3.8 Difractograma acidului ascorbic înainte (a) și după recristalizare(b)

Difractogramele probelor Xerogel prezentate în Figura 3.9, arată că după tratament termic acestea sunt predominant amorse (faza corespunzătoare sticlelor), cu o fază incipientă de cristalizare a fosfatului de calciu la $2\theta = 32^\circ$ în formă de apatită carbonată ($\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6\text{CO}_3$) atribuită unui proces de carbonizare a materialului, din cauza tratamentului la temperatură înaltă, a CO_2 prezent în atmosferă, precum și a conținutului ridicat de calciu [12,13].

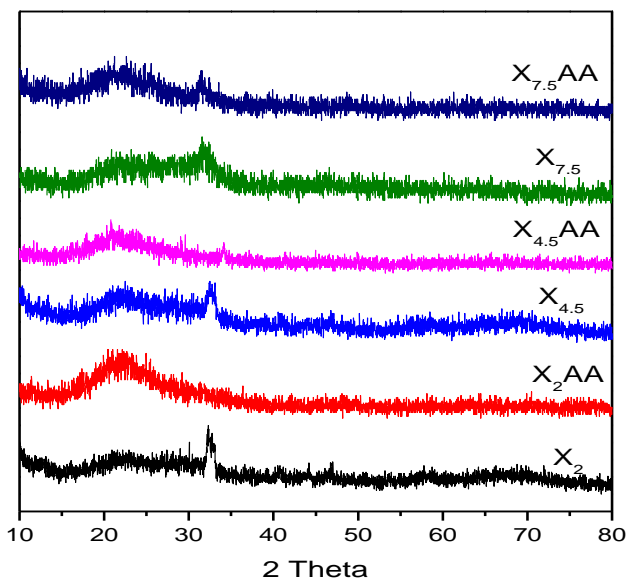


Figura 3.9 Difractograma probelor Xerogel cu și fără conținut de Acid Ascorbic (AA)

Analizând rezultatele obținute pe probele cu conținut de vitamina C, acestea nu prezintă peak-urile caracteristice acidului ascorbic, de asemenea dispar și fazele incipiente ale fosfatului de calciu, excepție făcând proba cu pH=7,5, la care se poate identifica și după imersare în soluție cu acid ascorbic.

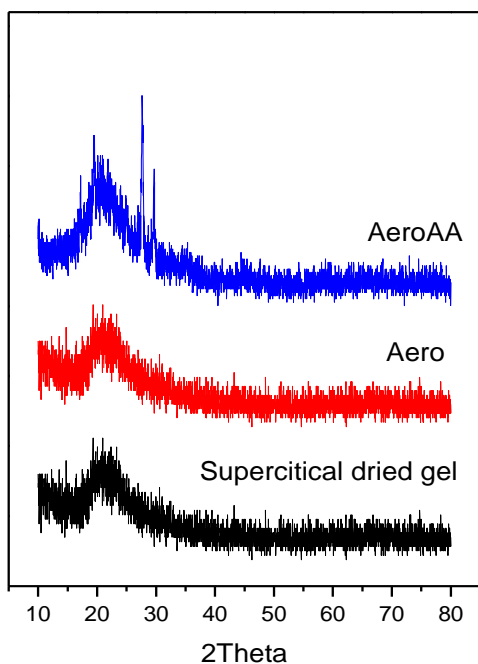


Figura 3.10. Difractograma probei Aerogel cu și fără conținut de acid ascorbic

Difractogramele probei Aerogel (Figura 3.10) arată că aceasta este complet amorfă chiar și după tratament termic la temperatura înaltă. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate, unde este precizat faptul că aerogelurile obținute prin uscare corectă sunt tot timpul amorfe. După încărcarea Aerogelului cu vitamina C, apar patru peak-uri cristaline specifice acidului ascorbic.

3.3.3. Spectroscopia în infrarosu

Spectrele FTIR ale acidului ascorbic (Figura 3.11) prezintă următoarele vibrații caracteristice: 3527 cm^{-1} , 3412 cm^{-1} , 1755 cm^{-1} , 1669 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} , 1195 cm^{-1} , 1121 cm^{-1} și 1024 cm^{-1} . Peak-urile aflate la 1195 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} și 1755 cm^{-1} sunt atribuite vibrațiilor de alungire și întindere a grupărilor C=O și CH prezente în acidul ascorbic [14], în timp ce vibrația de la 1669 cm^{-1} este asociată cu cea a legăturilor C=C din vitamina C [13,15]

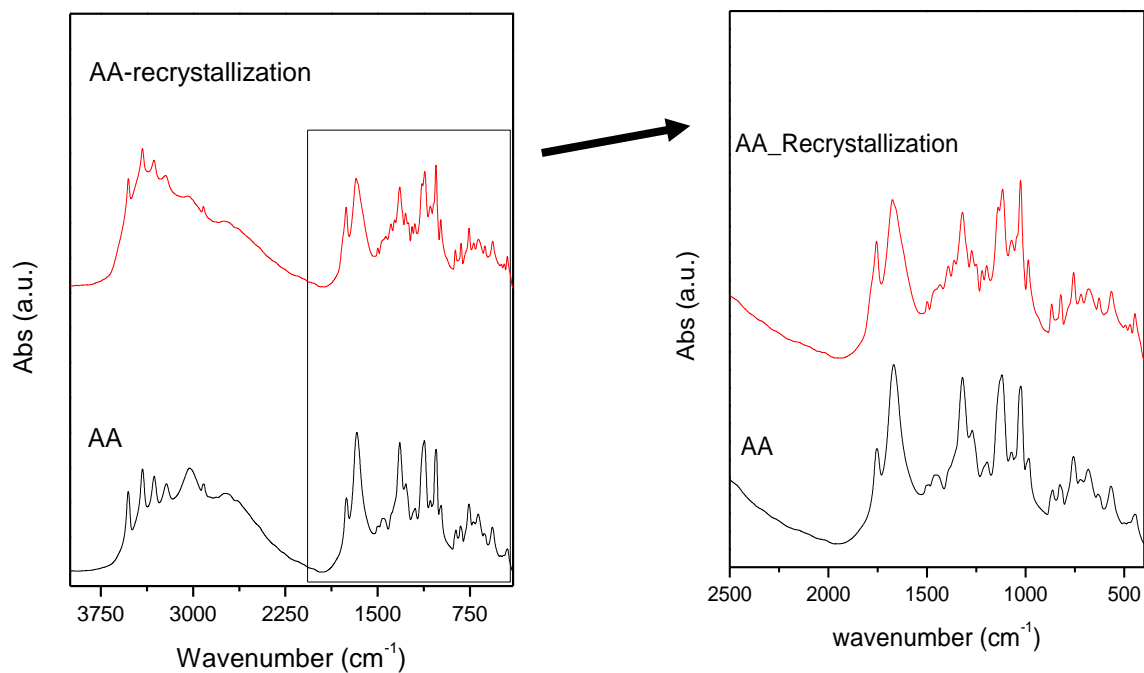


Figura 3.11 Spectrele FTIR al acidului ascorbic înainte și după recristalizare

Comparand spectrele FTIR ale acidului ascorbic recristalizat cu cele înainte de recristalizare se observă o mică deplasare catre valori mai mari a benzii situate la 1755 cm^{-1} corespunzatoare vibrației de legatură C=O, deplasare care este vizibilă, de asemenea, în cazul grupărilor OH și CH.

Spectrele FTIR a Xerogelurilor cu și fără vitamina C sunt prezentate în Figura 4.12. Rezultatele arată că pe lângă vibrațiile caracteristice materialelor cu conținut ridicat de SiO_2 și vibrațiile legăturilor PO specifice pentru conținutul de fosfor [16], după imersare în vitamina C, apare legatura C=C respectiv C=O. În plus, se poate observa odată cu, creșterea pH -lui în timpul preparării și o deplasare a benzilor aflate între $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ catre valori mai mici [11, 17-19].

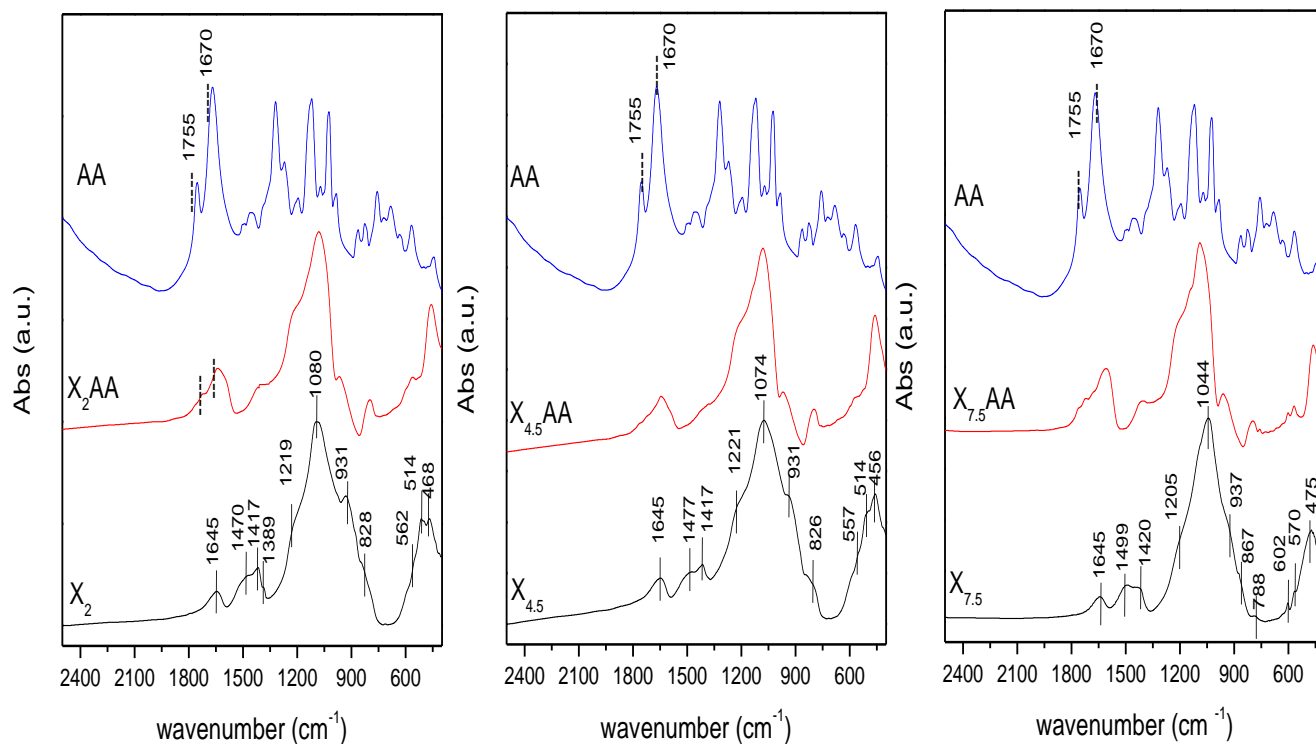


Figure 3.12 Spectrele FTIR a probelo Xerogel cu și fără conținut de Acid Ascorbic

În cazul Aerogelului, înainte și după imersare în soluție cu acid ascorbic, pe lângă vibrațiile caracteristice pentru legăturile Si-O-Si și O-Si-O în intervalul $1100 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ și pe lângă benzile aflate la 807 cm^{-1} și 467 cm^{-1} asociate cu vibrațiile unităților Si-O, după încărcare cu acid ascorbic apar vibrațiile caracteristice acestuia. În intervalul $550-750 \text{ cm}^{-1}$ se poate observa apariția unor peak-uri slab dezvoltate, acestea nefiind vizibile înainte de imersare [20,21].

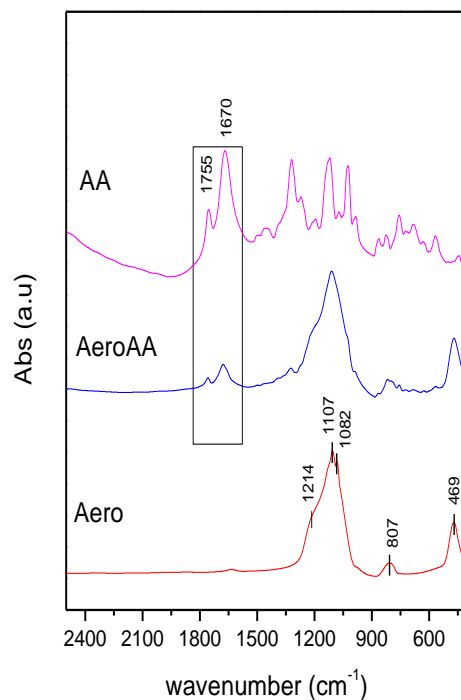


Figure 3.13 Spectrele FT-IR a probei Aerogel cu și fără conținut de acid ascorbic

3.3.4. Măsurători de suprafață specifică și volum de pori

Măsurătorile de porozimetrie au fost facute cu analizorul Qsurf, care este bazat pe metoda BET, folosind adsorbție-desorbție de N₂. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 3.1:

Tabel 3.1. Aria suprafețelor specifice și volumul de pori ale probelor Xerogel și Aerogel

Sample code	Specific surface area (m ² /g)	Pore volume (ml/g)
X2	153.82	0.33
X2AA	253.28	0.43
X4.5	164.30	0.32
X4.5AA	271.54	0.43
X7.5	89.09	0.4
X7.5AA	113.00	0.48
Aero	121.56	0.34
AeroAA	70.40	0.29

Se observă că suprafața specifică a probelor Xerogel tratate termic variază odata cu schimbarea pH-ului în faza de sol. Valorile sunt apropiate în cazul probelor cu pH 2 (153 m²/g) și pH 4.5 (164 m²/g), dar prin creșterea pH-ului la 7.5 valoarea scade la 89 m²/g. În cazul volumului

de pori are loc o creștere a acestuia odata cu creșterea pH-lui. După imersarea Xerogelurilor în soluție cu acid ascorbic, atât volumul de pori cât și suprafața specifică crește datorită reacției între acid ascorbic și suprafața probelor [22]. În cazul Aerogelului se observă o situație diferită după încărcare cu vitamina C, având loc o scădere a suprafeței specifice și a volumului de pori. Explicația acestui fenomen este legată de natura deschisă a porilor și aspectul interconectivității Aerogelurilor. Soluția de acid ascorbic pătrunde în pori umplând canalele, apoi în momentul uscării se recristalizează în aceștia [23].

4. Studii in vitro de bioactivitate și atașare a proteinei

Proprietățile de bioactivitate ale probelor Xerogel și Aerogel incubate în SBF au fost investigate prin XRD și SEM, iar pentru a identifica prezența grupărilor funcționale specifice a fost utilizată FT-IR. Atașarea de proteine a fost studiată cu ajutorul FT-IR și SEM.

4.1. Bioactivitatea probelor Xerogel și Aerogel

Studiul bioactivității probelor Xerogel și Aerogel a fost făcut *in vitro* prin imersare în fluid biologic simulat (SBF) pe diferite intervale de timp (3, 4 și 14 zile) la o temperatură de 36.5°C . După imersare probele au fost spălate cu apă distilată și uscate la temperatura camerei. Difractogramele obținute după 14 zile de imersare sunt prezentate în Figura 4.1. Se poate observa că după 3 și respectiv 7 zile de imersare probele sunt încă amorfe fără a se evidenția prezența fazei de tip apatitic. După 14 zile de imersare, difractogramele probelor fără conținut de vitamina C arată prezența fazei incipiente a fosfatului de calciu.

Din rezultatele XRD a probelor cu conținut de vitamina C, doar în cazul Xerogelului cu pH=7.5 se poate identifica faza cristalină de tip apatitic.

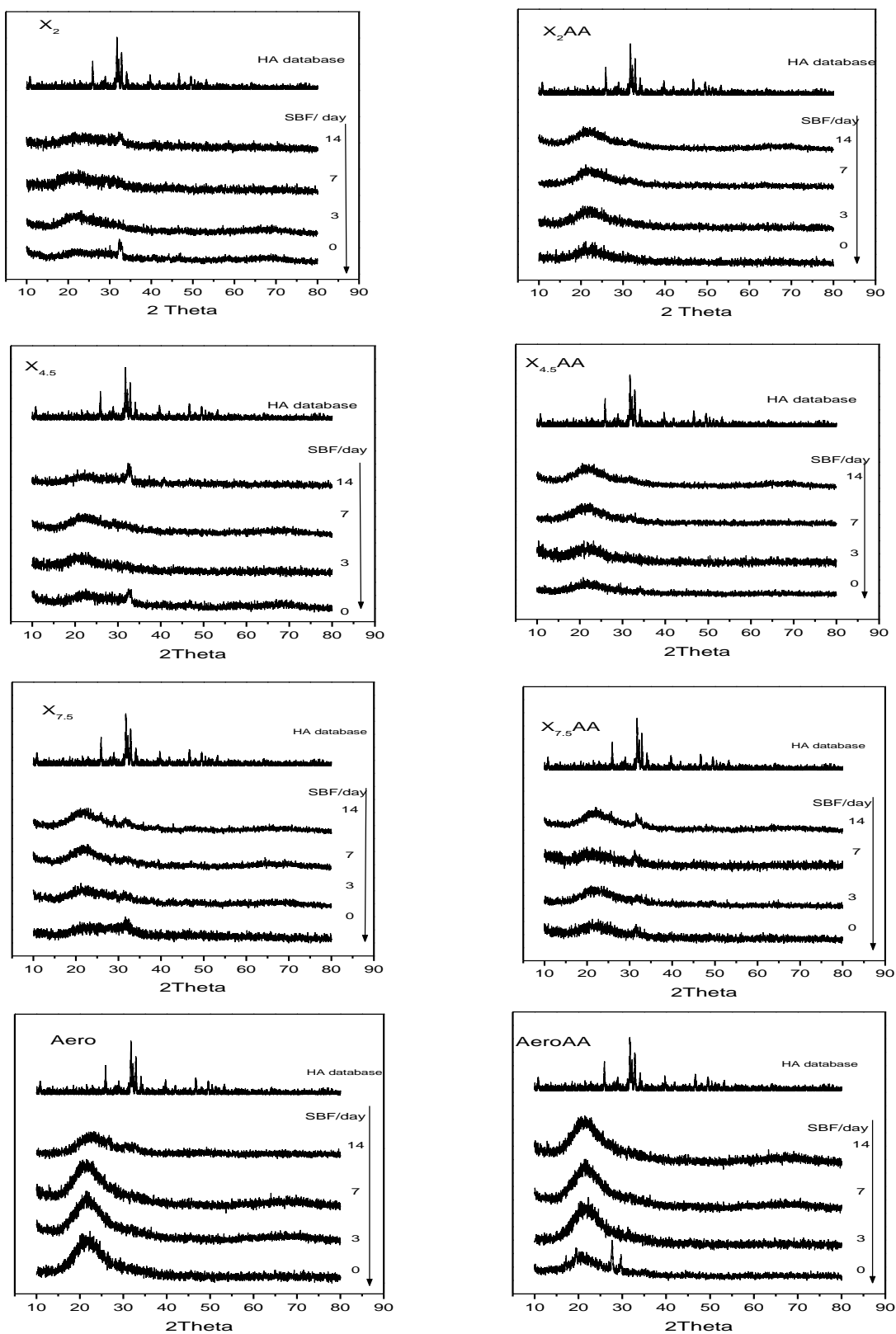


Figura 4.1 Difractogramele probelor Xerogel și Aerogel dupa 14 de imersare in SBF, cu și fără conținut de acid ascorbic (AA)

Difracția de raze X este utilizată pe scară largă pentru caracterizarea fazei de tip apatitic pentru că furnizează date despre structura cristalină a materialelor și a compoziției, însă prin această metodă nu se poate determina prezența grupurilor [OH] și [CO₃] din apatită, în schimb spectroscopia FT-IR poate fi folosită pentru identificarea legăturilor chimice caracteristice pentru hidroxiapatită [11].

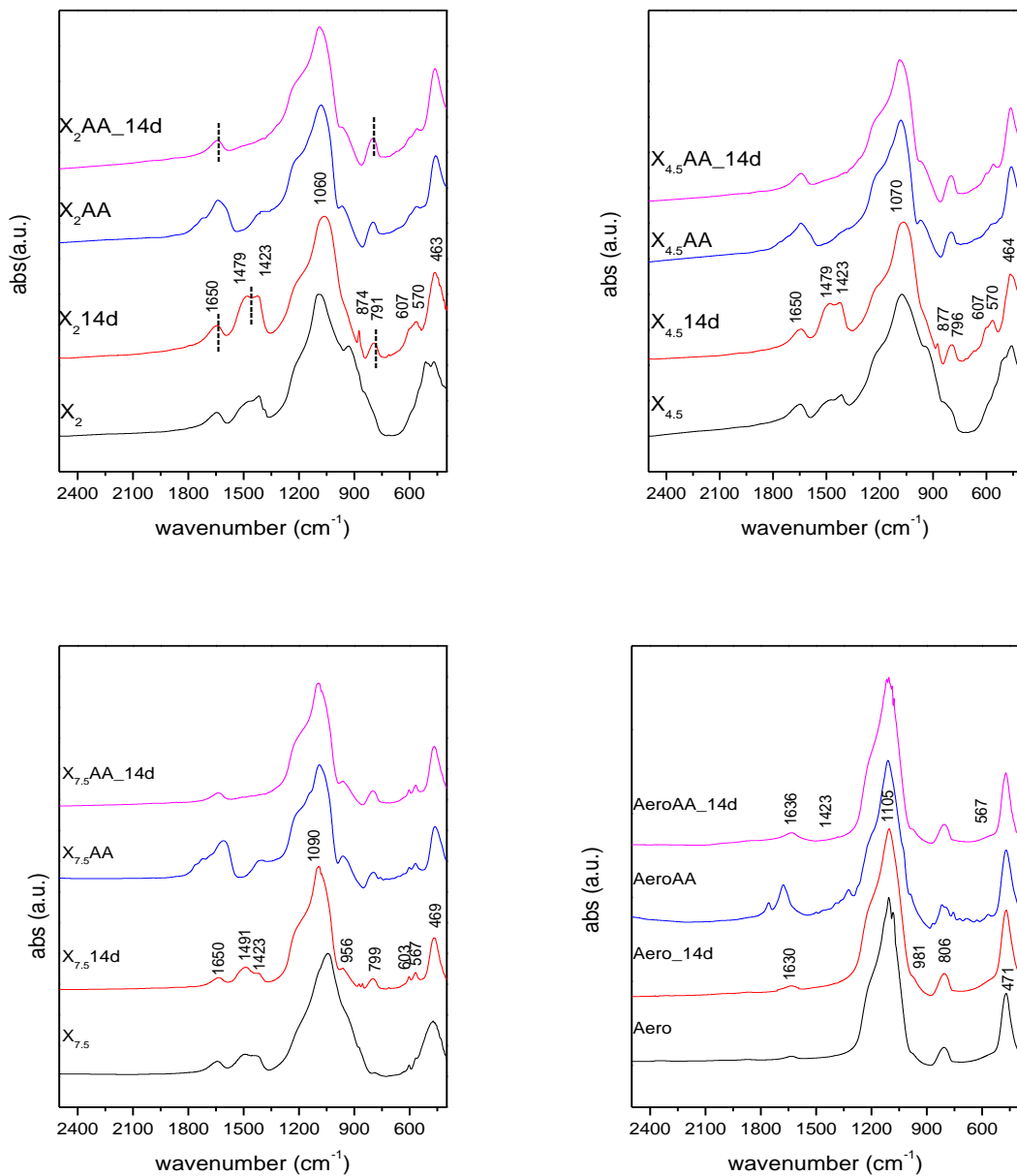


Figure 4.2. Rezultatele FT-IR a probelor Xerogel și Aerogel cu și fără conținut de AA după 14 zile de imersie în SBF

Spectrele obținute pe probele cu și fără conținut de vitamina C, după 14 zile de imersie în SBF, sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate. Banda dubla de absorbție specifică legăturii P-O este identificată atât în cazul Xerogelurilor fără vitamina C cât și în prezența acesteia, fiind mai pronunțată în ambele cazuri la pH 7.5. Benzile localizate la 791 cm^{-1} și respectiv în intervalul $1420\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ corespund vibrațiilor CO_3^{2-} (banda dublă situată la 1420 și 1479 cm^{-1}) indicând formarea unei faze amorfe de Ca-P, iar vibrația de la 1650 cm^{-1} este la fel alocată grupării CO_3^{2-} , caracteristică fazei de tip apatitic [18]. Benzile de absorbție situate în intervalul $1060\text{--}1090\text{ cm}^{-1}$ (X2, X4.5, X7.5) și în intervalul $1080\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ (X2AA, X4.5AA, X7.5AA) corespunzătoare vibrației Si-O-Si sunt deplasate spre valori mai mari. În cazul probei aerogel benzile de absorbție înregistrate înainte și după imersare în SBF, cu și fără conținut de AA prezintă aceleași vibrații caracteristice. O bandă mai puțin intens situată la 566 cm^{-1} este identificată ca vibrația unității PO_4^{3-} , iar banda la 1632 cm^{-1} este alocată vibrației unității CO_3^{2-} [24].

Imaginile SEM (Figura 4.3) înregistrate după 14 zile de imersare în SBF pe probele Xerogel preparate cu și fără conținut de acid ascorbic relevă pe suprafața probelor prezența a unor forme aglomerate, fiind o dovadă bună de auto-asamblare pentru fazele de tip apatitic în SBF [25]. Se observă că acidul ascorbic nu are un efect negativ asupra formării fazei de tip apatită. Pe de altă parte, se observă că creșterea pH-ului, în timpul sintezei probelor, favorizează formarea stratului de apatită pe suprafața acestora, rezultatele fiind în concordanță cu cele obținute prin XRD. După 14 zile de imersare în SBF, pe suprafața probei X7.5AA se observă clusteri de tip “conopidă” [24].

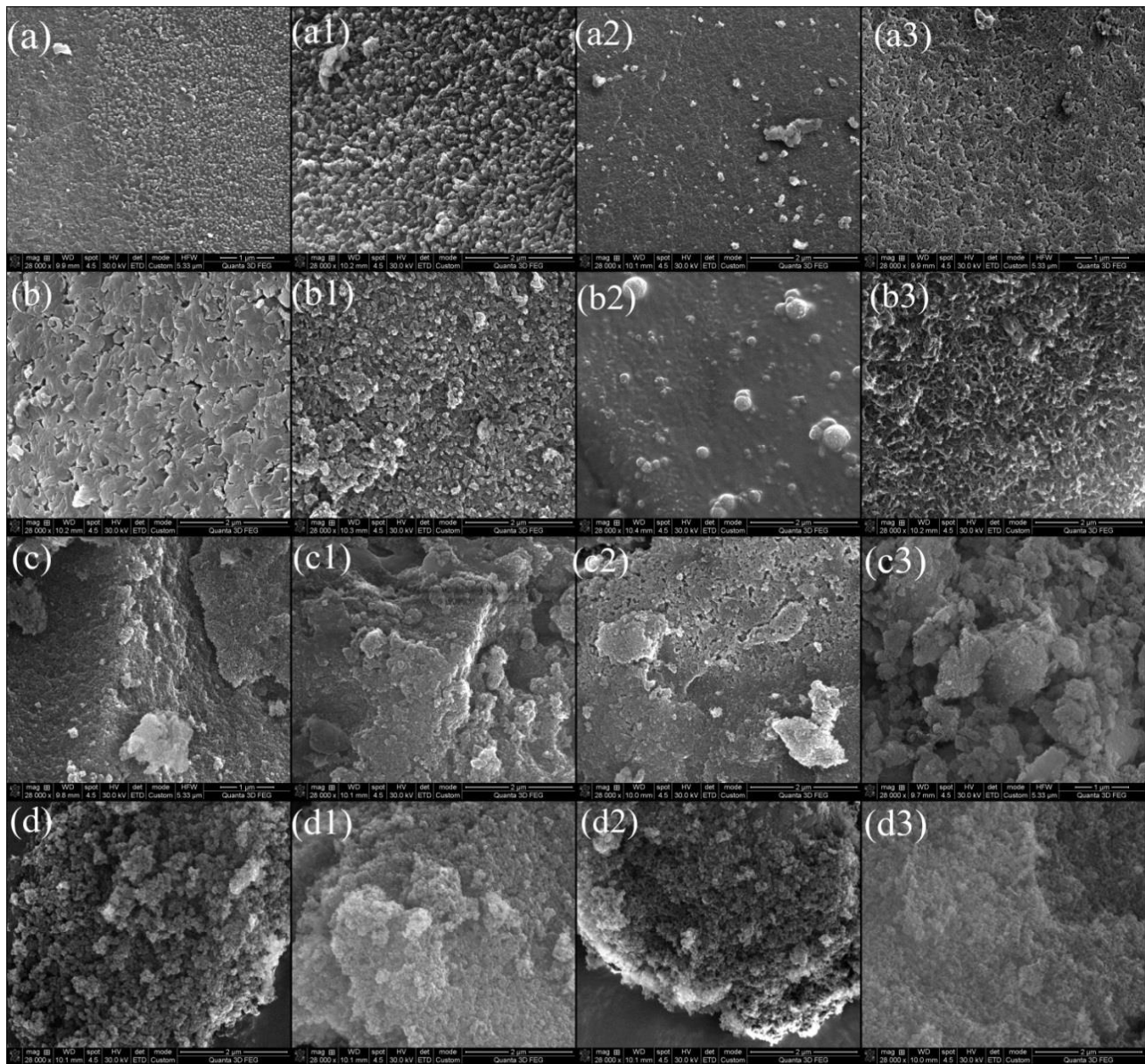


Figure 4.3 Imagini SEM pentru probele Xerogel și Aerogel cu și fără conținut de AA, după 14 zile de imersare în SBF (Unde (a) proba cu $pH=2$; (a₁) X₂ după 14 zile de SBF; (a₂) X₂_AA and (a₃) X₂AA după 14 zile de SBF; (b) proba $pH=4.5$ (b₁) X_{4.5} după 14 zile de SBF; (b₂) X_{4.5} AA; (b₃) X_{4.5}AA după 14 zile de SBF; (c) X_{7.5}; (c₁) X_{7.5} SBF; (c₂) X_{7.5}AA; (c₃) X_{7.5}AA SBF (d) Aero; (d₁) Aero SBF; (d₂) Aero AA; (d₃) Aero AA SBF)

4.2. Studiul atașării proteinelor pe suprafață

Capacitatea de adsorbție a proteinei a fost studiată atât pe probele fără cât și pe probele cu conținut de vitamina C folosind Serum Albumina Bovina(BSA). O cantitate de 0.04 g din fiecare probă a fost imesata în 2 ml de PBS în care anterior s-a dizolvat 0.1g de BSA, totul a fost incubat la temperatura de 36.5 °C.

Având în vedere faptul că ascorbatul are o afinitate foarte mare pentru BSA [26], de asemenea s-a studiat interacțiunea dintre acidul ascorbic și BSA. Pentru acest studiu trei cantități diferite (1, 0,5, 0,25 g) de vitamina C au fost dizolvate în apă distilata (5ml), după care s-a adaugat BSA la soluție, într-o concentrație apropiata (0.0033mg/dl) de cea a albuminei regăsite în sânge (3.5-5.0 g/dl) [27].

Spectrul de fluorescență a proteinei cu și fără acid ascorbic a fost înregistrat între 275-500 nm, rezultatele fiind prezentate în Figura 4.4. Stiind că albumina umană și albumina bovină excitate la 290 nm emit semnal de fluorescență datorită în principal rezidului de triptofan, pentru măsurători a fost aleasa această lungime de undă de excitație.

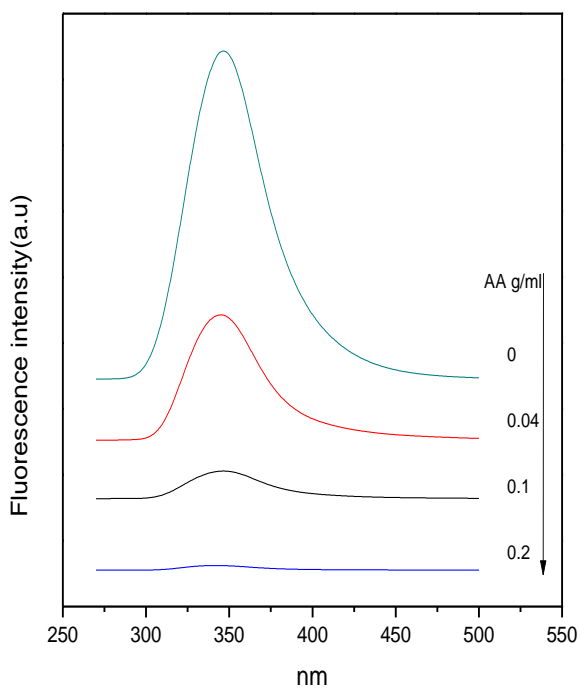
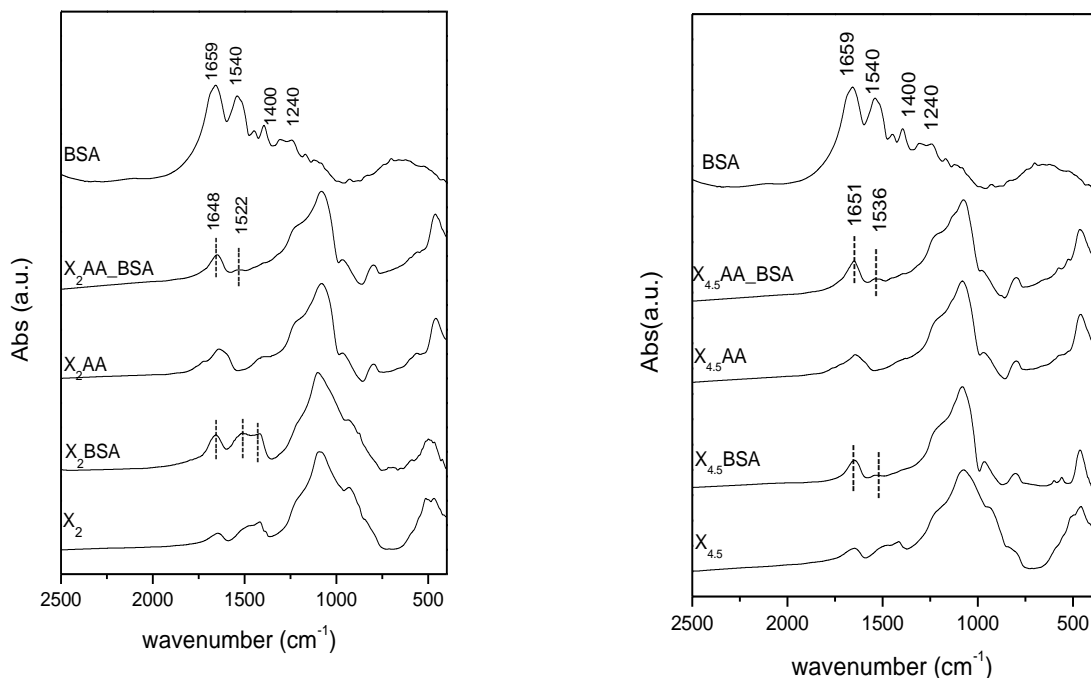


Figura 4.4 Spectrul de fluorescență a proteinei BSA cu diferite cantități de AA

Rezultatele indică faptul că intensitatea fluorescenței pentru BSA scade odată cu creșterea concentrației de acid ascorbic, dar fără deplasări semnificative, evidențiind faptul că acidul ascorbic interacționează cu BSA, ducând la reducerea fluorescenței sale intrinsece [27].

Acidul ascorbic este un compus care are două grupări -OH ionizabile, care apar de obicei sub formă de anion de ascorbat, și datorită prezenței grupărilor carbonil prezintă o reacție puternică cu grupările amino și prin urmare reacționează puternic cu grupările amino din proteine [28].

Spectrul de absorbție FT-IR al albuminei (BSA) este în concordanță cu literatura de specialitate și prezintă vibrațiile caracteristice acestora. Banda situată la 1659 cm^{-1} (Figura 4.5) este identificată ca și amida I, fiind componenta cea mai dominantă a benzii, atribuită de obicei elicei de tip α , rezultând de la vibrațiile de întindere C=O a legăturii peptidice. În mod similar, banda la 1540 cm^{-1} este atribuită vibrației de îndoire în plan N-H și vibrației de întindere C=N cu o mică contribuție de la vibrația de îndoire în plan C=O și întinderea NC, este identificată ca Amida II [29,30]. Banda situată la 1400 cm^{-1} ca rezultat al vibrației lanțului lateral de COO- și cea de la 1240 cm^{-1} (vibrația de întindere C-N și cea de îndoire N-H) sunt benzi corespunzătoare Amidei III.



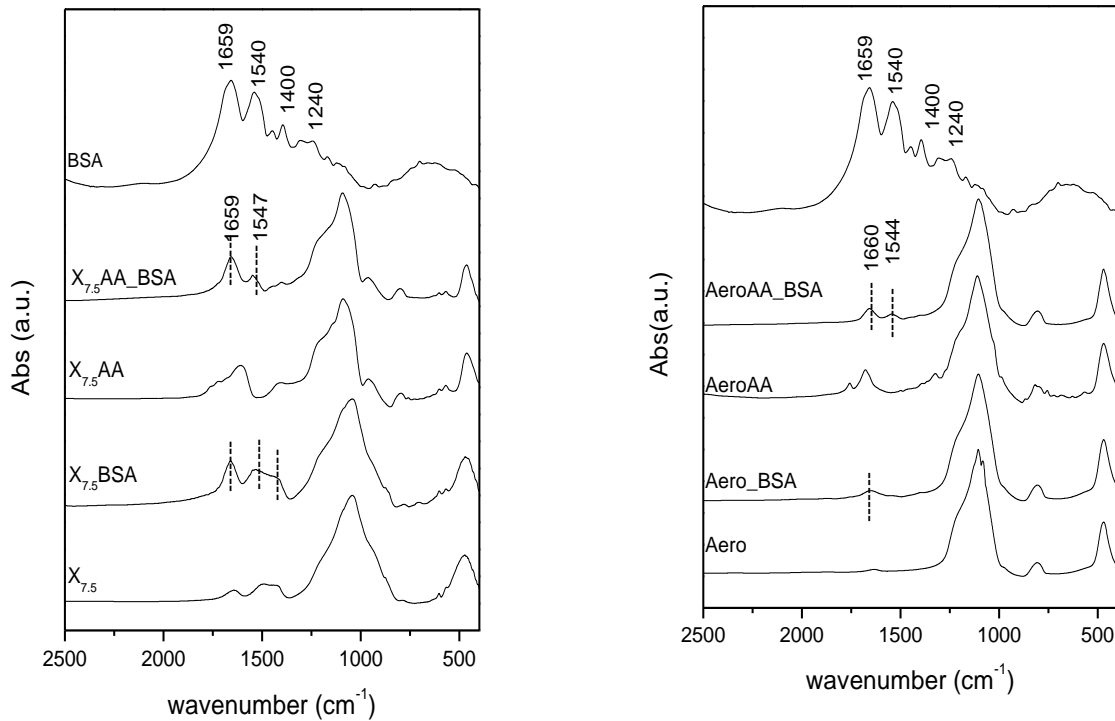


Figura 4.5 Spectrele FT-IR ale probelor Xerogel și Aerogel cu și fără AA, după atașarea de BSA

Pe baza unor studii anterioare [31] se știe ca adsorbție/desorbție de proteine pe suprafața materialelor bioactive depinde de mărimea și forma proteinei, concentrația, microstructura substratului, comportamentul hidrofob, pH-ul, temperatura, adsorbția competitivă cu alte proteine și ioni, precum și de natura solventului.

Spectrele FT-IR ale probelor Xerogel (pH diferit) și ale probelor Aerogel înainte și după adsorbție de BSA sunt prezentate în Figura 4.5. Rezultatele obținute arată că benzile CO_3^{2-} din intervalul spectral $1400\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ dispar după adsorbția de proteine. Diferențe se observa între probele X2BSA și X4.5BSA la benzile vibraționale situate la 1540 cm^{-1} și la 1400 cm^{-1} , acestea nefiind pronunțate pentru proba cu $\text{pH} = 4,5$. Conform literaturii [32,33] acest lucru este posibil, deoarece BSA are o conformație izomeră dependentă de pH, iar schimbările observate reflectă structura sa multidomeniu a proteinei.

Rezultatele obținute pe probele cu conținut de acid ascorbic indică prezența clară a benzii de vibrație a Amidei I la 1648 cm^{-1} (X2), 1651 cm^{-1} (X4.5) și respectiv, la 1659 cm^{-1} (x7.5). De asemenea pot fi identificate, benzile vibraționale de la Amida II, la 1522 cm^{-1} (X2), 1536

cm⁻¹ (X4.5), respectiv la 1547 cm⁻¹ (x7.5). În cazul probei aerogel fără AA după adsorbția de BSA, doar banda situată la 1660 cm⁻¹ de la Amida I poate fi identificată, în schimb la proba cu conținut de AA este vizibilă și banda de la Amida II aflată în regiune spectrală de la 1544 cm⁻¹. Rezultatele obținute pe probele cu conținut de AA prin deplasarea benzilor specifice pentru BSA (cu creșterea pH-ului) confirmă faptul că prezența acidului ascorbic nu are o influență negativă asupra atașării de proteine, și ca acestea sunt legate de suprafață.

Prezența proteinei (BSA) pe suprafața probelor Xerogel și Aerogel este confirmată și de imaginile SEM, care sunt prezentate în Figura 4.6. Rezultatele relevă faptul că atașarea proteinei pe suprafața probelor cu și fără AA are structuri distincte [34], pe probele de tip Xerogel fără conținut de acid ascorbic se observă o structură globulară, iar pe cele cu AA poate fi identificată în schimb, prezența unei structuri cu tendința de polimerizare. Această structură este prezentă și în cazul probelor Aerogel. Diferențele dintre probele cu și fără vitamina C sunt puse pe seama caracterului important de antioxidant al acidului ascorbic, acesta păstrând majoritatea cofactorilor metalici în stare reducătoare. În condiții fiziologice ea apare sub formă de acid dehidroascorbic, reacționează cu grupările amino și formează baze de tip Schiff.

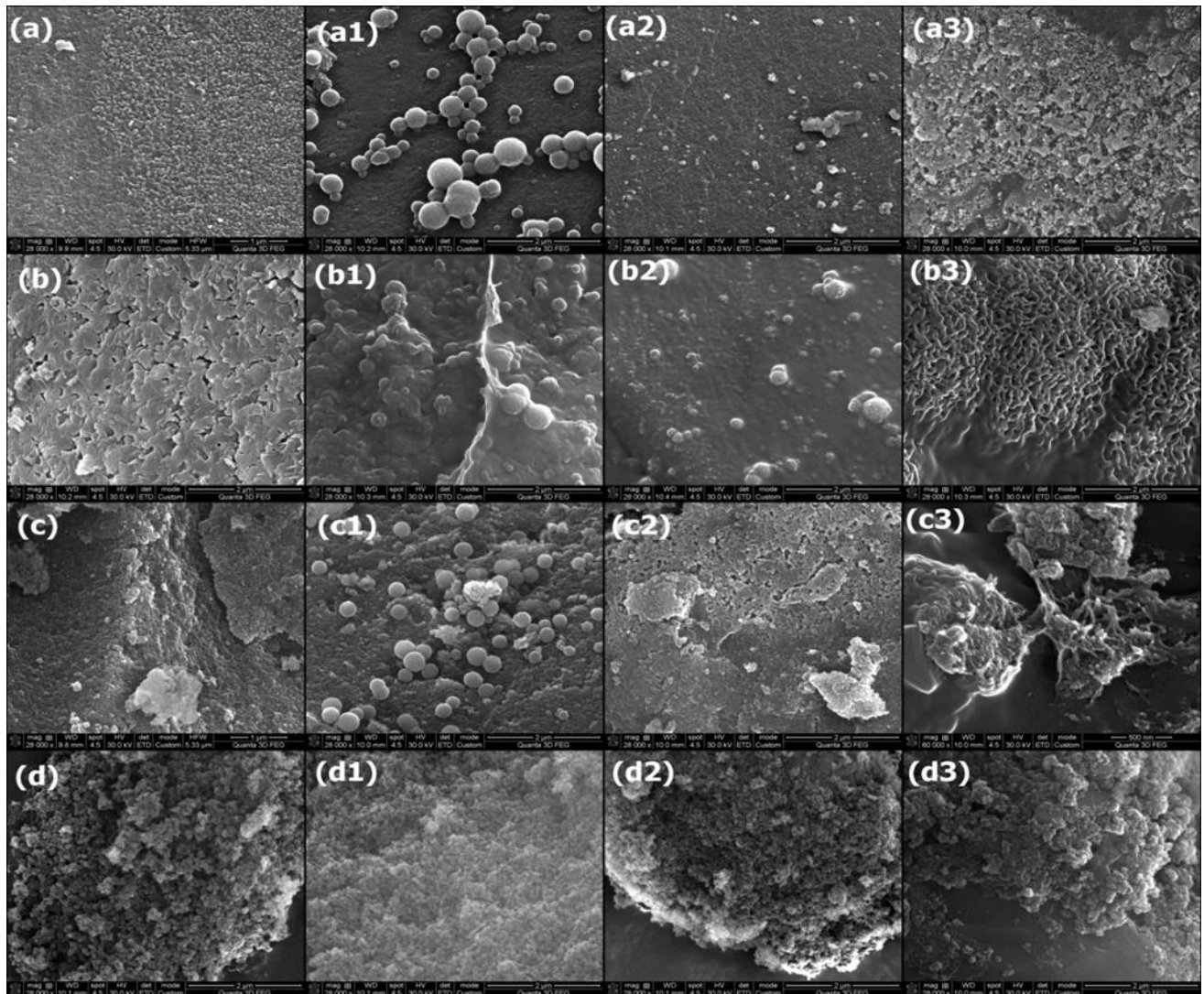


Figura 4.6. Imagini SEM ale probelor Xerogel și Aerogel cu și fără conținut de AA, înainte și după atașare de BSA (Unde: (a) proba cu $pH=2$; (a₁) X₂ cu BSA; (a₂) X₂ AA (a₃) X₂AA cu BSA (b) proba cu $pH=4.5$ (b₁) X_{4.5} cu BSA; (b₂) X_{4.5}AA; (b₃) X_{4.5}AA cu BSA; (c) X_{7.5}; (c₁) X_{7.5} BSA; (c₂) X_{7.5}AA; (c₃) X_{7.5}AA BSA; (d) Aero; (d₁) Aero BSA; (d₂) Aero BSA; (d₃) Aero AA BSA)

Concluzii

- S-au obținut prin metoda sol-gel probe de tip Xerogel și Aerogel cu compoziția chimică $56\text{SiO}_2\text{-}40\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$ (mole %). Probele Xerogel au fost preparate la pH-uri diferite (2, 4.5 and 7.5), iar proba Aerogel a fost uscată în condiții supracritice folosind CO_2 .

- Dupa tratament termic, rezultatele XRD arată că Aerogelurile își pastrează structura amorfă (1050 °C), iar în cazul Xerogelurilor pe lângă structura predominant amorfă apare și un început de cristalizare a fosfatului de calciu la $2\theta = 32^\circ$.

- Dupa imersie în soluție cu acid ascorbic, difractogramele arată dispariția peak-urilor apatitice, excepție făcând proba cu pH=7.5. Aceste modificari sunt puse pe seama reacției dintre acidul ascorbic și suprafața probelor. Rezultatele XRD, obținute doar pe proba AA, indică prezența fazelor cristaline specifice vitaminei C.

- Rezultatele DTA și TG pe probele Xerogel uscate la 100°C arată o pierdere de masa în intervalul 50-250 °C, asociată cu eliminarea reziduurilor de etanol și apă provenite din preparare, respectiv pana la 400°C eliminarea apei încapsulate în pori, sugerând faptul că aceste materiale sunt poroase așa cum se confirmă și de rezultatele BET. Probele Aerogel nu prezintă modificări semnificative în curba DTA, indicând faptul că reziduurile sunt eliminate încă în timpul uscării supracritice. Rezultatele DTA confirmă prezența acidului ascorbic după imersie pe probele tratate termic.

- Testele de bioactivitate a probelor Aerogel și Xerogel efectuate în vitro, indică faptul că după 14 zile de imersie în SBF apare faza de tip apatitic, vizibilă în FTIR și confirmată cu imaginile SEM, în special pe proba Aerogel și Xerogel cu pH=7.5.

- Studiul de atașare a proteinei indică faptul ca prezența vitaminei C are o influența benefică pentru atașarea BSA-lui pe suprafața probelor, având o structura polimerizată. Rezultatele indică faptul că vitamina C are o afinitate mai bună pentru BSA.

Referinte

1. F. Berthiaume, T. J. Maguire, M. L. Yarmush. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, 2, 403-430.
2. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine 2nd Edition*, 2007. Elsevier
3. Q. J. Chen, A. Roether, A. R. Boccaccini, Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials, *Topics Tissue Eng*, 2008, 4, 1-27.
4. L.C. Gerhardt, A. R. Boccaccini, Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Materials* 3, no. 7 ,2010, pp: 3867-3910.
5. I.R. Garrett, B.F. Boyce, R.O. Oreffo, L. Bonewald, J. Poser, G.R. Mundy, Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1990 Mar;85 (3) :632-9
6. S. K. Misra, S. E. Philip, W. Chrzanowski, S. N. Nazhat, I. Roy, J. C. Knowles, V. Salih, A. R. Boccaccini, Incorporation of vitamin E in poly(3hydroxybutyrate)/Bioglass composite films: effect on surface properties and cell attachment, *J R Soc Interface*. 2009 April 6; 6(33): 401–409
7. S. K. Misra, T. Ansari, D. Mohn, S. P. Valappil, T. J. Brunner, W.J. Stark, I. Roy, J.C. Knowles, P.D. Sibbons, E.V. Jones, A. R. Boccaccini, V. Salih, Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites *J. R. Soc. Interface* (2010) 7, 453–465
8. A. Vulpoi, L. Baia, S. Simon, V. Simon, Silver Effect on the Structure of SiO₂-CaO-P₂O₅ ternary system, *Materials Science and Engineering C* 32 (2012) 178–183
9. E. Laszloffi, A. Vulpoi, V. Simon, Investigation of sol-gel derived silicate glasses loaded with vitamin C, *Journal of Optoelectronics And Advanced Materials* Vol.15, ISS.7-8, 883-887, 2013
10. M. Mami, A. Lucas-Girot, H. Oudadesse, R. Dorbez-Sridi, F. Mezahi, E. Dietrich, *Appl. Surf. Sci.* 254, 7386 (2008)
11. L. Berzina-Cimdina, N. Borodajenko, Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Infrared Spectroscopy Materials Science, Engineering and Technology*, Edited by Theophile Theophanides (2012): 123-149
12. M. Juhász, Y. Kitahara, S. Takahashi, T. Fujii, Thermal stability of vitamin C: Thermogravimetric analysis and use of total ion monitoring chromatograms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 59 ,190– 193, 2012
13. K. Srinivasan, K. Vanita Devi, Characterization of L-ascorbic acid single crystal grown from solution with different solvents, *Wiley, Cryst. Res. Technol.* 45, No.9, 946-952, 2010

14. N. Devi, D. K. Kakati, Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex, *Journal of Food Engineering* 117, 193–204, 2013
15. C. Yohannan Panicker, Hema Tresa Varghese, Daizy Philip; FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of Vitamin C *J Spectrochimica Acta Part A* 65, 802–804, 2006
16. J. Simitzis, D. E. Baciú. In Vitro Bioactivity Investigation of Porous Calcium Silicate Bioactive Glasses Prepared By Sol-Gel Using Peg Beads As Template, *Digest Journal Of Nanomaterials and Biostructures* 7, no. 4, 1719-1725, 2012
17. O. Peitl Filho, G. P. LaTorre, L. L. Hench, Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5, *Journal of biomedical materials research* 30, no. 4 (1996): 509.
18. G. Theodorou, O. M. Goudouri, E. Kontonasaki, X. Chatzistavrou, L. Papadopoulou, N. Kantiranis, and K. M. Paraskevopoulos, Comparative Bioactivity Study of 45S5 and 58S Bioglasses in Organic and Inorganic Environment. In *22nd International Symposium of Ceramics in Medicine, Bioceramics*, vol. 22.
19. L. Radev, V. Hristov, I. Michailova, H. Maria V. Fernandes, M. I. M. Salvado, In vitro bioactivity of biphasic calcium phosphate silicate glass-ceramic in CaO-SiO₂-P₂O₅ system, *Processing and Application of Ceramics* 4, no. 1, 15-24, 2010
20. L. Radev, V. Hristov, I. Michailova, B. Samuneva, Sol-gel bioactive glass-ceramics Part II: Glass-ceramics in the CaO-SiO₂-P₂O₅-MgO system, *Central European Journal of Chemistry* 7, no. 3, 322-327, 2009
21. R. Al-Oweini, H. El-Rassy, Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several Si (OR)₄ and R₀₀Si(OR)₃ precursors, *Journal of Molecular Structure* 919, 140-145, 2009
22. K. Hemmati, S. Hesarki, A. Nemati, Evaluation of ascorbic acid –loaded calcium phosphate bone cements: Physical Properties and invitro release behaviour, *Ceramics International* (2013). In Press
23. A. Hunt, M. Ayers. "A brief history of silica aerogels." Berkeley National Laboratory (2000)
24. J. P. Nayak, Preparation and Characterization of Bioactive Silica-Based Ceramics Derived from Rice Husk Ash, PhD diss., 2010
25. E. Laszloffi, A. Vulpoi, V. Simon, Studies on bioactive glasses loaded with vitamin C, In *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, S1.Vol. 6, pp. 211-211, Wiley-Blackwell, 2012.
26. E. Lozinsky, A. Novoselsky, A. I. Shames, O. Saphier, G. I. Likhtenshtein, D. Meyerstein. Effect of albumin on the kinetics of ascorbate oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1526, no. 1, 53-60, 2001

27. H. Xu, Q. Liu, Y. Zuo, Y. Bi, S. Gao, Spectroscopic studies on the interaction of vitamin C with bovine serum albumin, *Journal of Solution Chemistry* 38, no. 1, 15-25, 2009
28. M. R. Safari, Inhibitory Activity Of Vitamin C On The Susceptibility Of Albumin To Glycation Reaction, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2007, no. 01, 13-17, 2007
29. J. A Grdadolnik, FTIR investigation of protein conformation, *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia* 21, no. 1 (2002): 23-34
30. J. A. Grdadolnik, Saturation effects in FTIR spectroscopy: intensity of amide I and amide II bands in protein spectra, *Acta Chimica Slovenica* 50, no. 4 (2003): 777-788.
31. E. Laszloffi, A. Vulpoi, V. Simon, Protein Adhesion To Bioactive Microspheres Investigated By Fluorescence Spectroscopy, *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* 56, no. 3 (2011): 89-96
32. S. D. Stroupe, J. F. Foster. Sulfhydryl-catalyzed isomerization of bovine mercaptalbumin, *Biochemistry* 12, no. 20 (1973): 3824-3830
33. D. C. Carter, J. X. Ho, Structure Of Serum Albumin, *Advances In Protein Chemistry* 45 (1994): 153-203
34. T. Kongraksawech, Characterization by optical methods of the heat denaturation of bovine serum albumin (BSA) as affected by protein concentration, pH, ionic strength and sugar concentration, (2007) Available form: <http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/4100/MS%20Thesis-Teepakorn%20Kongraksawech.pdf?sequence=1>