



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI DIN CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
DEPARTAMENTUL DE INGINERIE CHIMICĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CERCETAREA ȘI DEZVOLTAREA UNOR
NANOSTRUCTURI DE INTERES BIOLOGIC ȘI
BIOMEDICAL

DOCTORAND:

CORINA-LĂCRĂMIOARA GÂRBO

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

PROF. UNIV. DR. MARIA TOMOAI-A-COTIȘEL

Cluj-Napoca, 2016



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI DIN CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
DEPARTAMENTUL DE INGINERIE CHIMICĂ

CORINA-LĂCRĂMIOARA GÂRBO

CERCETAREA ȘI DEZVOLTAREA UNOR NANOSTRUCTURI DE
INTERES BIOLOGIC ȘI BIOMEDICAL
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Comisie:

Președinte: Prof. Dr. Ing. Mircea Dărăbanțu – Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca

Conducător științific: Prof. Dr. Maria Tomoaia-Cotișel – Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj-Napoca

Membrii:

Prof. Dr. Ossi Horovitz – Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj

Prof. Dr. Elena Maria Pică – Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca

Prof. Dr. Ing. Francisc Peter – Universitatea Politehnică din Timișoara

Data susținerii: 16 Decembrie 2016

CUPRINS

INTRODUCERE.....	8
NANOSTRUCTURI DE INTERES BIOLOGIC ȘI BIOMEDICAL.	
Stadiul actual al cunoașterii.....	12
CERCETĂRI ORIGINALE	
1. NANOSTRUCTURI FORMATE DIN HIDROXIAPATITE.	
Efectele condițiilor de maturare.....	19
1.1. Introducere.....	19
1.2. Partea experimentală.....	21
1.3. Rezultate și discuție.....	23
1.4. Concluzii	32
1.5. Bibliografie	33
2. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITE DOPATE CU Si.	
Viabilitatea și proliferarea osteoblastelor in vitro	38
2.1. Introducere	38
2.2. Materiale și metode.....	39
2.3. Rezultate și discuție.....	41
2.4. Biocompatibilitate, proprietăți osteoconductive ale nanostructurilor de Si-HAP	49
2.5. Concluzii	61
2.6. Bibliografie.....	62
3. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITE DOPATE CU Zn.	
3.1. Introducere	68
3.2. Materiale și metode	69

3.3. Rezultate și discuție	71
3.4. Concluzii	78
3.5. Bibliografie	78
4. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITE DOPATE CU Sr.	82
4.1. Introducere	82
4.2. Rezultate și discuție.....	83
4.3. Partea experimentală	87
4.4. Metode de caracterizare.....	88
4.5. Concluzii	88
4.6. Bibliografie	89
5. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITĂ DOPATĂ CU Ag, Au, Zn ȘI NANOPARTICULE DE ARGINT.....	92
5.1. Introducere	93
5.2. Materiale și metode	94
5.3. Rezultate și discuție	97
5.4. Concluzii	106
5.5. Cercetări curente și cercetări de perspectivă	107
5.6. Bibliografie.....	108
6. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITE DOPATE CU Mg, Zn, Sr, Si	113
6.1. Introducere	113
6.2. Materiale, metode și discuții.....	115
6.3. Dizolvarea și eliberarea ionilor în diverse medii	132
6.4. Concluzii	135

6.5. Bibliografie	135
7. BIOCAMPATIBILITATE. Nanostructuri, hidroxiapatite dopate cu Mg, Zn, Sr, Si, în culturi de celule osteoblaste.....	142
7.1. Introducere.....	142
7.2. Celule osteoblaste umane.....	143
7.3. Studii de biocompatibilitate	143
7.4. Teste de biocompatibilitate.....	144
7.5. Colorare imunohistochimică.....	148
7.6. Concluzii.....	151
7.7. Bibliografie	153
8. NANOSTRUCTURI: HIDROXIAPATITĂ, AgNP ÎN MATRICE POLIMERICĂ. Cement de oase de interes biomedical	156
8.1. Introducere	156
8.2. Materiale și metode.....	157
8.3. Rezultate	160
8.4. Discuție	163
8.5. Concluzii.....	165
8.6. Bibliografie.....	165
9. CONCLUZII GENERALE	169
10. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	172
11. Articole publicate: Lucrări premiate UEFISCDI.....	179
12. Comunicări la Conferințe și Simpozioane: Postere premiate	180
13. Participare în cercetarea contractuală	181
14. Membră în Societăți de Chimie și Centre de Cercetare	181

INTRODUCERE

Prezenta Teză de Doctorat, **Cercetarea și dezvoltarea unor nanostructuri de interes biologic și biomedical**, se încadrează în domeniul de cercetare dinamic și multi-disciplinar. Obiectivul major al acestei teze este de a dezvolta și implementa diferite nanotehnologii pentru a obține noi nanostructuri și biomateriale nanostructurate alcătuite din nanoparticule de materiale anorganice, precum hidroxiapatită sintetică stoichiometrică pură și hidroxiapatite multi-substituite, dopate cu diferiți ioni și nanoparticule metalice bioactive, cum ar fi nanoparticulele de argint, pentru aplicații în biologie și în biomedicină [1-4]

Această teză prezintă rezultate originale recente legate de sinteza și caracterizarea unor structuri pe bază de nanoparticule, cu aplicații în domeniul nanomedicinii [5, 6]. Sinteza nanoparticulelor a fost condusă prin metode adaptate ale chimiei umede [5-12], iar caracterizarea lor s-a realizat prin metode avansate, precum: XRD, spectroscopie FTIR și Raman, tehnicile de imagistică TEM, SEM și AFM, prin determinări de potențial zeta și BET, ca și prin încercări biologice și biofizice, printre care: viabilitatea celulelor (de ex. testele Alamar Blue și diacetat de fluoresceină), adeziune și proliferare, tehnici de colorare imunocitochimică pentru expresia proteinei celulare (de ex. osteopontina, osteonectina, collagen tip 1, osteocalcina) și pentru proteina de adeziune (adică actina F) pentru determinarea adeziunii celulare.

Teza începe cu o **introducere** și o prezentare a **nivelului actual de cunoaștere** în privința nanostructurilor cu aplicații biologice și biomedicale.

Teza de față are **opt capitole**, dintre care cinci se bazează pe cele **8 articole publicate** și anume **6 articole ISI** [5-10] plus **2 articole** [11, 12]: unul publicat în volumul de Proceedings al *Granulation Conference* și altul publicat într-o *revistă științifică* aprobată de CNCSIS. Datorită faptului că în conținutul tuturor acestor opt capitole se găsesc fie articole publicate, fie deja pregătite în manuscris pentru a fi supuse publicării, conținutul fiecărui capitol urmărește secțiunile acestor articole sau manuscrise.

Capitolul 1 se centrează pe sinteza și procesele de maturare ale hidroxiapatitei pure stoichiometrice (HAP) cu diferite grade de cristalinitate, precum și pe caracterizarea structurilor și biomaterialelor nanometrice obținute.

Capitolul 2 descrie sinteza și caracterizarea fizico-chimică a HAP substituite cu siliciu (Si-HAP), ca și performanțele biologice ale osteoblastelor din culturi pe scaffolduri realizate din aceste nanoparticule și nanostructuri.

Capitolul 3 acoperă sinteza unor nanostructuri poroase, realizate din hidroxiapatite substituie cu zinc, Zn-HAP [7], iar **capitolul 4** se referă la nanostructuri Sr-HAP [8] și caracterizarea lor fizico-chimică, biomateriale nanostructurate, având un puternic impact în regenerarea osoasă și cu aplicații în tratamentul osteoporozei.

Capitolul 5 se ocupă cu sinteza și caracterizarea unei hidroxiapatite multi-substituie cu Au, Ag și Zn și nanocompozitele sale [6] cu conținut variat de nanoparticule de argint (AgNP) [5]. Capitolul 5 se referă la caracterizarea biologică *in vitro* a acestor nanocompozite, folosind metoda difuziei pentru a caracteriza efectul asupra diferitor specii patogene în mediul de cultură. În acest capitol, sunt prezentate și analizate efectele antimicrobiene ale acestor nanostructuri, sub formă de nanocompozite HAP-AgNP, împotriva a 5 patogeni. Capitolul 5 prezintă și cercetările recente privind nanostructurile create din hidroxiapatită, nitroxolină și ioni de Ag⁺ [9], ca și cele obținute din hidroxiapatită și nitro-hidroxi-chinolină în prezența ionilor de Zn²⁺ [12], și indică sensibilitatea diferitor micro-organisme *in vitro* față de aceste nanocompozite.

Capitolul 6 acoperă sinteza și caracterizarea fizico-chimică a HAP multi-substituie cu magneziu, zinc și siliciu, HAP-Mg-Zn-Si [11] și a hidroxiapatitei multi-substituie cu Mg, Zn, stronțiu și Si (HAP-Mg-Zn-Sr-Si), de interes biomedical pentru remodelarea și reconstrucția osoasă.

Capitolul 7 prezintă studii de biocompatibilitate a acestor nanostructuri construite din HAP-Mg-Zn-Sr-Si, folosind osteoblaste umane mature, derivate din creasta iliacă, cu aplicarea diferitelor încercări biologice cu privire la viabilitatea celulară, adeziunea și proliferarea celulelor și exprimarea proteinei celulare.

Capitolul 8 descrie rezultatele obținute pe nanostructuri realizate din hidroxiapatită și nano-argint, ca un nou cement de oase de interes biomedical în domeniul ortopedic și în stomatologie [10]. Aceste nanostructuri pot fi folosite pentru acoperirea metalelor în scopul îmbunătățirii bioactivității implanturilor *in vivo*.

Teza se încheie cu **concluzii generale** și cu o **listă a publicațiilor originale și a comunicărilor la conferințe și simpozioane** și o altă **listă a referințelor selectate, citate în teză**. Trebuie menționat că fiecare capitol cuprinde bibliografia sa citată.

Aceste **8** capitole prezintă peste **50** de nanostructuri bioactive, denumite și ceramici bioactive și biomateriale, alcătuite din nanoparticule, predominant din diferite hidroxiapatite, ca minerale ale osului, și nanoparticule de argint, ca agenți antimicrobieni. Aceste biomateriale pot fi folosite ca substitute osoase, sau ca minerale și nanocompozite modificate asemănătoare osului, pentru aplicații biologice și clinice, pentru ingineria

tisulară osoasă și pentru regenerarea osoasă. Aceste HAP nanostructurate și compozitele lor sunt cercetate în continuare la Centrul de Chimie Fizică de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, pentru realizarea de acoperiri la implanturi metalice cu aplicații biologice și biomedicale.

Rezultatele originale arată că nanostructurile bioactive dezvoltate în această Teză de Doctorat pot fi folosite pentru dezvoltarea în continuare a unor suprafețe multi-funcționale modificate, care pot duce la noi strategii de fabricare, testare și aplicații clinice pentru medicina regenerativă.

Aplicații ale nanostructurilor obținute pot include și folosirea lor pentru înlocuiri de șolduri, genunchi, dinți, tendoane și ligamente, ca și pentru restaurări în boala parodontală și defecte ale vertebrelor precum și pentru reconstrucție maxilo-facială și stabilizarea alveolei dentare, după extragerea dinților.

Alte aplicații s-ar putea concentra asupra scaffoldurilor, realizate prin acoperiri cu aceste nanostructuri și biomateriale din particule bioactive pe diferite suprafețe ale materialelor (de ex. suprafețe metalice sau de sticlă optică), folosind tehnici de asamblare strat cu strat, care să conducă la straturi subțiri bioactive, care se pot folosi în culturi de celule osteoblaste sau celule stem, pentru a investiga bioactivitatea celulară *in vitro* și *in vivo*.

HAP și HAP multi-substituită se pot de asemenea folosi ca purtători de nanoparticule de argint, cu efect anti-microbian contra diferitor patogeni (capitolul 5). Aceste biomateriale ceramice nanostructurate pot fi utilizate pentru aplicarea unor acoperiri în domeniul medical, la implanturi sau dispozitive implantate pentru livrarea de medicamente.

Bioceramicile obținute ar putea fi utilizate pentru reconstrucția unor părți îmbolnăvite sau deteriorate ale sistemului osos. Ele pot fi resorbabile (de ex. fosfat tricalcic) și bioactive (de ex. hidroxiapatită, hidroxiapatite multi-substituite), sau ceramici poroase pentru încorporarea țesuturilor (de ex. metale acoperite cu hidroxiapatita).

Bibliografie

1. Y. Pathak, Recent Developments in Nanoparticulate Drug Delivery Systems, Chapter 1, Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization, Edited by Y. Pathak and D. Thassu, Informa Healthcare USA, Inc., New York, (2009), pp. 1-15.
2. Z. Chen, J. Wu, Y. Pathak, Introduction to Analytical Scanning Transmission Electron Microscopy and Nanoparticle Characterization, Chapter 15, Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization, Edited by Y. Pathak and D. Thassu, Informa Healthcare USA, Inc., New York, (2009), pp. 252-269.

3. S. Venkatraman, X. Yun, H. Yingying, D. Mondal, L. K. Lin, Bioactive Coatings for Implanted Devices, Chapter 10, Biological and Biomedical Coatings Handbook Applications, Edited by S. Zhang, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, (2011), pp. 471- 489.
4. R. Z. LeGeros, P. G. Coelho, D. Holmes, F. Dimaano and J. P. LeGeros, Orthopedic and Dental Implant Surfaces and Coatings, Chapter 7, Biological and Biomedical Coatings Handbook Applications, Edited by S. Zhang, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, (2011), pp. 301-333.
5. A. Mocanu, R.D. Pasca, Gh. Tomoaia, C. Garbo, P. T. Frangopol, O. Horovitz and M. Tomoaia-Cotisel, “New procedure to synthesize silver nanoparticles and their interaction with local anesthetics”, International Journal of Nanomedicine, 8, (2013), pp. 3867-3874.
6. A. Mocanu, G. Furtos, S. Rapuntean, O. Horovitz, C. Flore, C. Garbo, A. Danisteanu, Gh. Rapuntean, C. Prejmerean, M. Tomoaia-Cotisel, “Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles”, Applied Surface Science, 298, (2014), pp. 225–235.
7. C. Garbo, M.Sindilaru, A. Carlea, Gh. Tomoaia, V. Almasan, I. Petean, A. Mocanu, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, “Synthesis and structural characterization of novel porous zinc substituted nanohydroxyapatite powders”, Particulate Science and Technology, DOI:10.1080/02726351.2015.1121180.
8. P.T. Frangopol, A. Mocanu, V. Almasan, C. Garbo, R. Balint, G. Borodi, I. Bratu, O. Horovitz and M. Tomoaia-Cotisel, “Synthesis and structural characterization of strontium substituted hydroxyapatites”, Revue Roumaine de Chimie, 61(4-5), (2016), pp. 339-346.
9. A. Danistean, M. Gorea, A. Avram, S. Rapuntean, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, C. Garbo, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, “Antimicrobial activity of ceramic disks loaded with silver ions and nitroxoline”, Studia Universitaria Babes-Bolyai, Chimia, 61 (3), Tom I, (2016), pp. 275-283.
10. G. Furtos, M. Tomoaia-Cotisel, C. Garbo, M. Şenilă, N. Jumate, I. Vida-Simiti, C. Prejmerean, “New composite bone cement based on

hydroxyapatite and nanosilver”, Particulate Science and Technology, 31 (4), (2013), pp. 392-398.

11. Gh. Tomoaia, O. Soritau, A. Mocanu, C. Garbo, M.Tomoaia-Cotisel, “Scaffolds made of nano hydroxyapatite, collagen and chitosan for improved adhesion and bioactivity of osteoblasts”, The 6th International Granulation Conference Proceedings, Sheffield, UK, June 26-28, (2013), pp. 1-13.

12. S. Rapuntean, A. Pop, V. Miclaus, C. Garbo, F. Chirila, Gh. Rapuntean, N. Fiț, H. Farcău, M. Tomoaia-Cotisel, “Research concerning in vitro sensitivity of some microorganisms at hydroxyquinoline and cupric derivatives, deposited onto hydroxyapatite”, Bulletin UASVM, Veterinary Medicine, 72(2), (2016), pISSN 1843-5270; eISSN 1843-5378.

Cuvinte cheie: HAP substituie, antimicrobial, ciment de oase, substitute de os.

NANOSTRUCTURI DE INTERES BIOLOGIC ȘI BIOMEDICAL.

Stadiul actual al cunoașterii

În zilele noastre, nanostructurile din nanoparticule și biomaterialele avansate nanostructurate pentru aplicații biologice și biomedicale au devenit o importantă platformă de cercetare. Ca urmare, se dezvoltă nanotehnologia și este implementată în acest domeniu, cu scopul major de a trata diferite boli și de a mări calitatea vieții. De aceea, dezvoltarea de noi nanostructuri și biomateriale nanostructurate este crucială pentru substitute de os, ingineria tisulară și regenerarea țesuturilor.

Nanostructurile pe bază de hidroxiapatită (HAP) sintetică au început să fie utilizate în mod curent ca implanturi poroase, ca pulberi sau filme pentru acoperirea protezelor metalice pentru a produce fixarea lor bioactivă și a fi clinic relevante.

Este timpul să luăm în considerare o strategie inovativă pe baze biologice pentru repararea țesuturilor, adică să dezvoltăm *noi nanostructuri*, capabile să activeze celule și gene din corpul uman, ajutând astfel la vindecarea acestuia.

Această Teză de Doctorat are ca obiectiv principal dezvoltarea de *nanostructuri (biomateriale) inovative*, destinate să stimuleze răspunsuri celulare specifice la nivel molecular. Rezultatele obținute arată că modificările în compoziția și structura hidroxiapatitei, care este mineralul

predominant în structura osoasă, induc interacțiuni specifice în proteinele celulare (de ex. integrina), și prin aceasta se activează și adeziunea celulară, proliferarea și diferențierea celulelor. Prin urmare producerea și organizarea matricii extracelulare poate duce la accelerarea formării și remodelării osului, cu potențiale aplicații în ingineria tisulară, ortopedie, stomatologie și în transportul diferitelor principii active.

CERCETAREA ORIGINALĂ

1. NANOSTRUCTURI FORMATE DIN HIDROXIAPATITE. Efectele condițiilor de maturare

S-au preparat hidroxiapatite prin metoda precipitării chimice din azotat de calciu și fosfat acid de diamoniu în mediu bazic. Dispersia obținută a fost supusă în continuare unor procese de maturare în condiții diferite (etape, durată, temperatură), obținând *șapte serii de nanostructuri* (Fig. 1.2) pe bază de hidroxiapatite, cu diverse grade de cristalinitate (Tab. 1.2), și diferite dimensiuni și forme de nanoparticule (Fig. 3). Biomaterialele obținute (suspensii, precipitate, pulberi liofilizate calcinate și necalcinate) au fost caracterizate prin difracție a razelor X (Tab. 1.2), imagistică TEM (Fig. 1.3) și AFM, spectroscopie FTIR (Fig. 1.5) și Raman, măsurători de potențial zeta și analiză BET.

Tab. 1.2. Dimensiunea cristalitelor și gradul de cristalinitate al probelor necalcinate (a) și calcinate (b) de pulberi liofilizate de hidroxiapatite

Proba	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b
Dimens. Crist. (nm)	13,8	15,1	23,3	27,8	31,8	34,5	32,7	35,1	44,0	47,6	39,5	43,2	43,3	45,2
Cristalinitate (%)	21,3	23,1	32,3	34,7	47,5	48,1	51,3	51,7	63,5	64,4	52,5	55,3	63,0	63,5

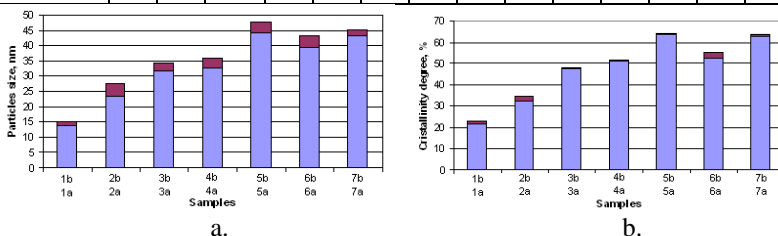


Fig. 1.2. Dimensiunea cristalitelor (a) și gradul de cristalinitate (b) pentru probe necalcinate (albastru) și calcinate (roșu) de HAP.

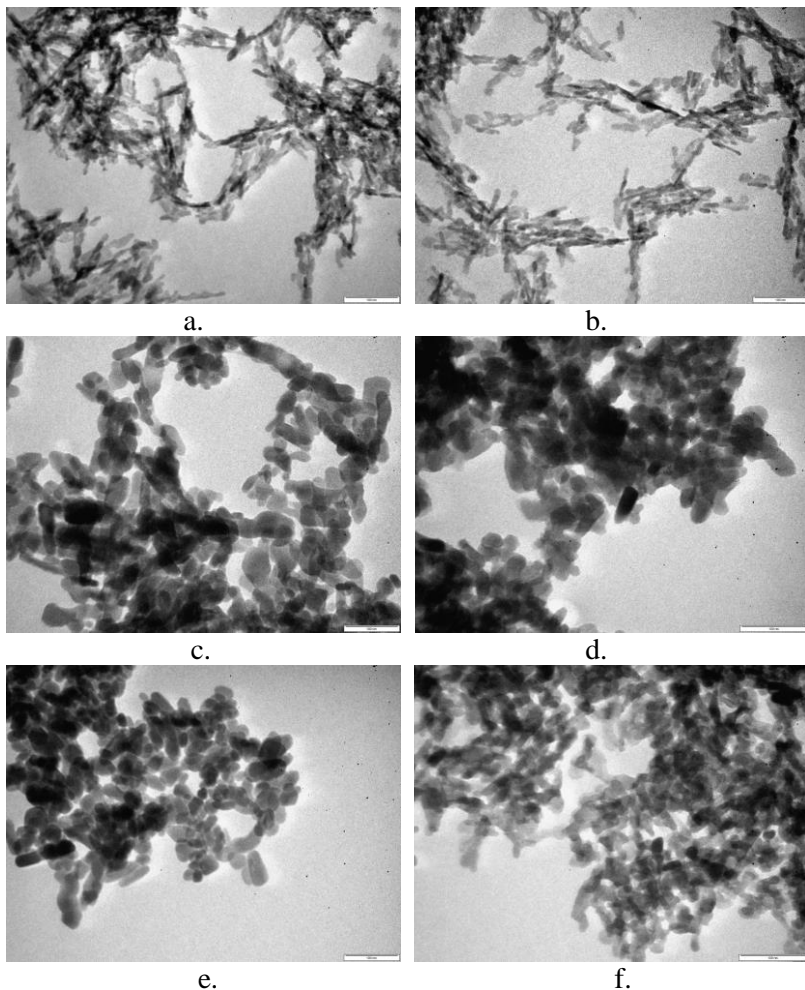


Fig. 1.3. Imagini TEM pentru hidroxiapatite, precipitat (pastă), dispersate în apă: proba 1 (a), proba 2 (b); proba 3 (c), proba 4 (d), proba 5 (e), proba 7 (f); barele din imagini sunt de 100 nm

Din Tab. 1.2 și Fig. 1.2 se observă o tendință generală, atât pentru etape mai lungi de maturare, cât și pentru o temperatură mai ridicată a maturării, de a mări dimensiunea cristalitelor și gradul de cristalinitate. Efectul calcinării duce la o creștere a dimensiunilor cristalitelor, dar gradul de cristalinitate este doar puțin afectat, în special pentru probele care au fost

supuse la un stadiu de maturare la temperatură ridicată, 60-80°C (probele 4-7).

Spectrele FTIR sunt comparate pentru probe liofilizate fără calcinare (Fig. 1.5a) și după calcinare la 300°C, 1 h (Fig. 1.5b). Spectrele au fost normalizate la 1 pentru cel mai înalt pic de absorbție și deplasate de-a lungul axei y pentru comparare.

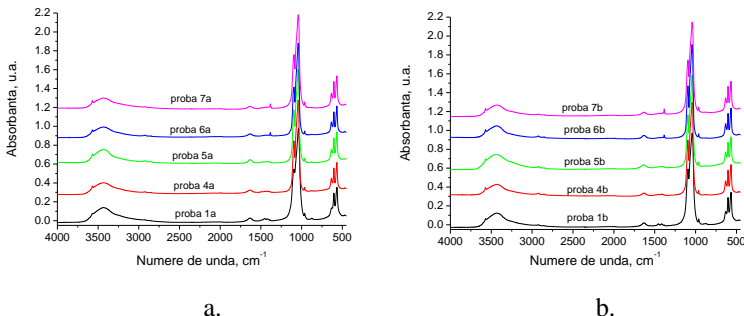


Fig. 1.5. Spectre FTIR ale probelor liofilizate (1, 4, 5, 6, 7) fără calcinare (a) și după calcinare (b); spectrele sunt normalizate

Rezultatele *BET*, date ca suprafețe specifice, volume specifice ale porilor și razele cele mai probabile ale porilor sunt prezentate în Tab. 1.5. Toate probele prezintă o suprafață specifică ridicată, datorată atât gradului ridicat de dispersie al pulberilor, cât și porozității lor. Prin calcinare, suprafața specifică se micșorează ca urmare a sinterizării nanoparticulelor, pe când volumul specific al porilor rămâne aproape neschimbat. Aceste proprietăți fizico-chimice, la rândul lor, sunt hotărâtoare pentru activitatea biologică a bionanomaterialelor obținute, în vederea folosirii lor în scopuri biologice și medicale

Tab. 1. 5. Caracteristici deduse din analiza BET pentru probe de HAP

Proba	Suprafața specifică, m ² /g		Volum specific al porilor, cm ³ /g		Raza cea mai probabilă a porilor, nm	
	necalc.	calcin.	necalcin	calcin.	necalc..	calcinat
1a, 1b	144.2	90.9	0.332	0.361	7.7	7.7
4a, 4b	106.5	96.3	0.358	0.384	7.7	8.6
5a, 5b	99.9	90.2	0.355	0.378	9.6	8.6
6a, 6b	95.6	86.3	0.358	0.354	7.7	7.7
7a, 7b	78.8	73.6	0.324	0.344	7.7 (11.9)	7.7 (13.3)

2. NANOSTRUCTURI DE HIDROXIAPATITE DOPATE CU Si. Viabilitatea și proliferarea osteoblastelor in vitro

Obiectivul acestei cercetări a fost de a investiga efectele substituiri cu silicat în rețeaua HAP, asupra proprietăților sale chimice și fizice și a răspunsului biologic al osteoblastelor in vitro. S-a folosit o metodă chimică umedă pentru sinteza a **patru** pulberi de HAP substituite cu silicat (Si-HAP), cu 0,47; 2,34; 4,67 și 9,34 % g Si, liofilizate și apoi calcinate la 650 °C, 1h. Biomaterialele au fost cercetate cu XRD (Fig. 2.1), spectroscopie FTIR și Raman și prin imagistică TEM, SEM și AFM (Fig. 2.9).

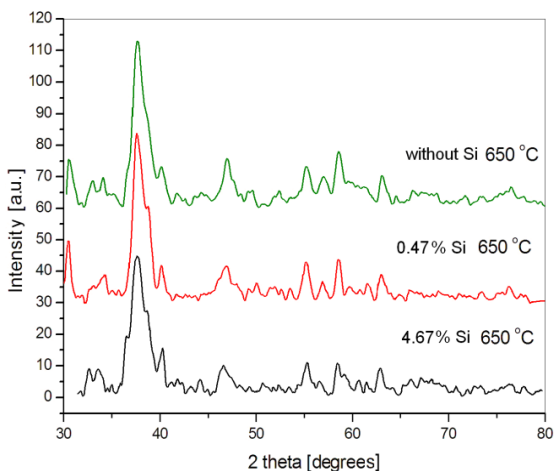


Fig. 2.1. Spectre de raze X pentru pulbere de HAP fără Si, HAP cu 1% SiO₂ [0,47% Si-HAP] și HAP cu 10% SiO₂ [4,67% Si-HAP], calcinate la 650°C timp de 1h

La concentrații mici, sub 4,67% Si, se obține o fază unică de HAP substituit cu Si. La concentrații mai mari de Si, acesta promovează formarea a două faze, HAP și TCP, fiecare parțial substituită cu Si. Dimensiunea cristalitelor de HAP și TCP este în domeniul nanocristalin, după cum se arată și în Fig. 2.9.

Spectrele FTIR și Raman indică prezența predominantă a HAP substituit cu siliciu, cel puțin până la 4,67 % g Si. Pentru un conținut mai ridicat de siliciu, acesta se regăsește și ca SiO₂ amorf.

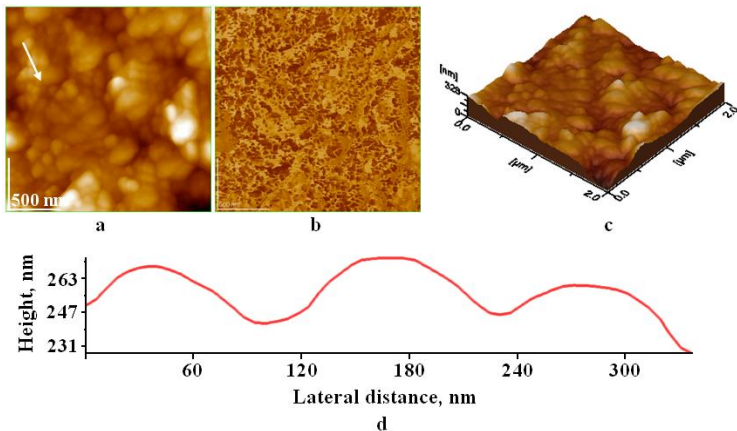


Fig. 2.9. Imagini AFM ale Si-HAP cu 4,67% Si, calcinată la 650°C; aria scanată: 2 μm x 2 μm; imagine: a) topografică, b) de fază, c) 3D a topografiei, d) secțiune transversală de-a lungul săgeții din fig. a; Diametru mediu al nanoparticulelor: 72 ± 9 nm; RMS pe suprafețe: 37,7 nm, RMS pe profilul transversal: 9,12 nm.

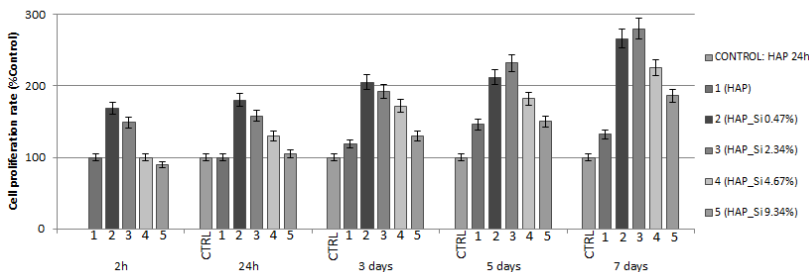


Fig. 2.13. Reprezentare grafică a testului de viabilitate Alamar blue pentru osteoblaste cultivate pe nanostructuri Si-HAP drept scaffolduri: HAP pură (1), Si(0,47%)-HAP (2), Si(2,34%)-HAP (3), Si(4,67 %)-HAP (4) și Si(9,34%)-HAP (5). Nanostructura HAP la 24h a fost considerată drept control (CTRL) pentru 1, 3, 5 și 7 zile de cultură a osteoblastelor pe scaffolduri.

Aceste biomateriale Si-HAP sunt cercetate în privința influenței lor asupra adeziunii și proliferației celulelor (Fig. 2.13), ca și a expresiei

proteinei celulare (Fig. 2.16), în culturi de osteoblaste umane în vederea potențialei lor utilizări în repararea și regenerarea osoasă.

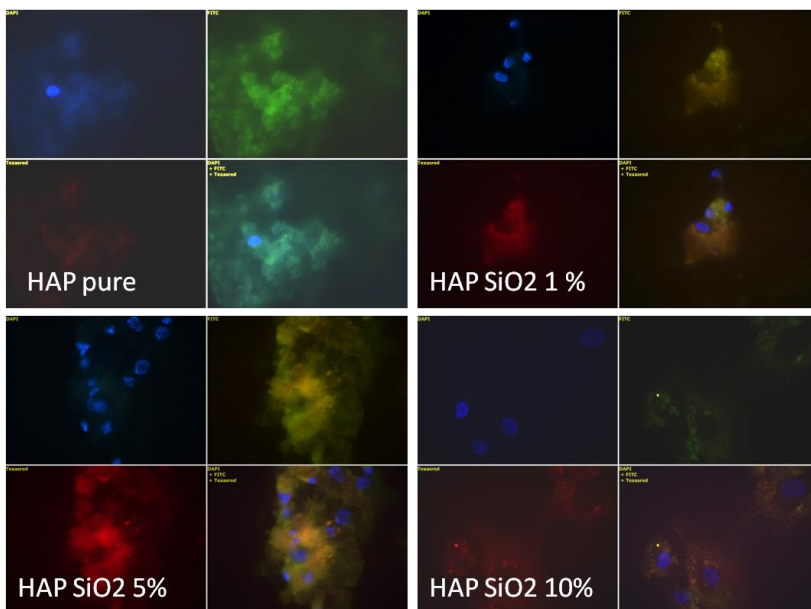


Fig. 2.16. Colorarea imunocitochimică a osteoblastelor: colagen-1, verde cu FITC, osteocalcina, roșu cu Texas red și nucleii celulari, albastru cu DAPI.

Imagini după 7 zile pe scaffolduri, din HAP pură și trei biomateriale Si-HAP, cu conținut de Si de 0,47% (HAP SiO₂ 1%), 2,34% (HAP SiO₂ 5%) și 4,67 % (HAP SiO₂ 10%).

Scaffoldurile din nanostructuri Si-HAP au mărit mai bine activitatea osteoblastelor decât HAP pură (Fig. 2.13) după o zi. Ele prezintă o comportare mai bună a osteoblastelor decât controlul (nano HAP pură). Scaffoldurile din HAP-Si(0,47%) și HAP-Si(2,34%) se pare că dețin cea mai bună activitate dintre cele patru nanomateriale Si-HAP îmbogățite în Si, pentru proliferarea osteoblastelor (Fig. 2.13).

Adeziunea mai ridicată a osteoblastelor pe Si(0,47wt%)-HAP concordă cu studiile noastre anterioare unde am demonstrat o adeziune mai ridicată la interval de timp mai scurt (până la 3 zile), față de HAP pură [7], ca și cu rezultatele comunicate pentru HAP cu Si 0,8 [18], care indicau o activitate metabolică mai intensă a osteoblastelor pe aceste scaffolduri de Si-

HAP. La concentrații mai ridicate de Si în HAP, cum este cazul Si(2,34%)-HAP, la timpuri mai îndelungate (după 5 zile), efectul stimulator al Si este mai ridicat față de celelalte structuri investigate (Fig. 2.13).

Efectul dependent de doză al biomaterialelor asupra celulelor osoase s-a observat și la alte elemente în urme. Desigur, există o concentrație optimă de siliciu pentru stimularea adeziunii, proliferării și diferențierii osteoblastelor. Prin urmare, ambele biomateriale: HAP-Si(2,34%) și HAP-Si(0,47%) pot fi utilizate pentru a stimula celulele osteoblaste în procesul de formare a osului nou.

Analiza imaginilor din Fig. 2.16 indică o organizare avansată a colagenului de tip I (colagen-1) și a osteocalcinei în jurul multor nuclee celulare, arătând un stadiu avansat de proliferare celulară, indusă în special de scaffoldul Si(2,34%)-HAP (notat: HAP SiO₂ 5%), în comparație cu toate celelalte scaffolduri de Si-HAP și de HAP pură. Aceste date sunt în deplin acord cu activitatea fosfatazei alcaline și cu producția de osteopontină și osteonectină, care sunt cel mai bine evidențiate în osteoblaste pe scaffoldul Si(2,34%)-HAP. Aceste rezultate au arătat că Si-HAP cu 2,34% Si a mărit semnificativ proliferarea, ca și expresia proteinei precum osteocalcina, osteopontina, osteonectina, colagenul-I și fosfataza alcalină (ALP) specifice osteoblastelor.

Aceste rezultate sugerează că biomaterialele Si-HAP joacă un rol important în reglarea proliferării și diferențierii osteogenice a osteoblastelor la osteocite, ca și în formarea osului.

Cu siguranță, conținutul de siliciu din rețeaua HAP poate fi corelat cu efectul său asupra structurii chimice, compoziției și proprietăților, ca și asupra morfologiei și rugozității superficiale a acestor biomateriale (bioceramici). Aceste nanobiomateriale sunt folosite curent în laboratoarele noastre pentru a fabrica scaffolduri utilizate în culturi de osteoblaste, spre a le evalua performanța in vitro, ca prim pas pentru viitoare studii in vivo.

3. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITE DOPATE CU Zn

Capitolul 3 prezintă sinteza de noi nano-hidroxiapatite (HAP) poroase, substituite cu diferite cantități de Zn (HAP-Zn) de la 0.2 la 10% g, în prezența unui surfactant, L-asparagina, pentru a controla distribuția dimensiunilor porilor și morfologia nanopulberilor obținute, utilizând un procedeu de co-precipitare. Astfel s-a dezvoltat o nouă abordare pentru prepararea de nanopulberi de HAP-Zn cu nucleație și capacitate de cristalizare îmbunătățită. [C. Garbo, M. Sindilaru, A. Carlea, Gh. Tomoaia, V. Almasan, I. Petean, A. Mocanu, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, Synthesis and structural characterization of novel porous zinc substituted

nanohydroxyapatite powders, *Particulate Science and Technology*, DOI:10.1080/02726351.2015.1121180].

Măsurătorile XRD (Fig. 3.1) au indicat HAP drept unica fază prezentă și au evidențiat natura nanostructurată a HAP obținute (Fig. 3.6). Spectrele FTIR au confirmat de asemenea prezența structurii de HAP. Imaginile TEM, SEM și AFM au arătat morfologia nanostructurilor HAP-Zn. Analiza BET a permis caracterizarea suprafeței specifice și porozității probelor. Noile nanopulberi sunt proiectate pentru a fi folosite în chirurgia ortopedică, în special pentru tratamentul osteoporozei și ca substitute de os, și în stomatologie pentru remineralizarea smalțului

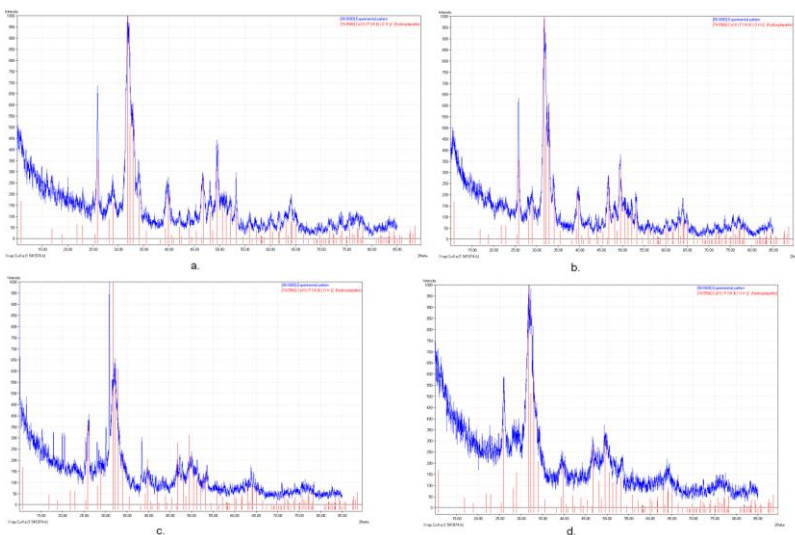


Fig. 3.1. Spectre XRD pentru proba de HAP-0,2%Zn necalcinată (a) și calcinată (b) și ale probei de HAP-10%Zn necalcinată (c) și calcinată (d), comparate cu PDF 74-0566 pentru hidroxiapatita stoichiometrică

Observăm o tendință generală de scădere a dimensiunii medii a cristalitelor cu creșterea conținutului de Zn care înlocuiește Ca. O tendință similară se manifestă și pentru gradul de cristalinitate al nano pulberilor HAP-Zn.

În general, nanopulberile de HAP-Zn sunt compuse din nanoparticule sferice, quasi-sferice sau elipsoidale, cu dimensiuni între 34 nm și 47 nm (Fig. 3.6). Nu se observă schimbări semnificative în structura

și morfologia straturilor subțiri de pulberi de HAP-Zn, calcinate sau necalcinate în bună concordanță cu imaginile TEM. Aceste rezultate sunt în acord cu datele obținute pentru dimensiunea cristalitelor din spectre XRD.

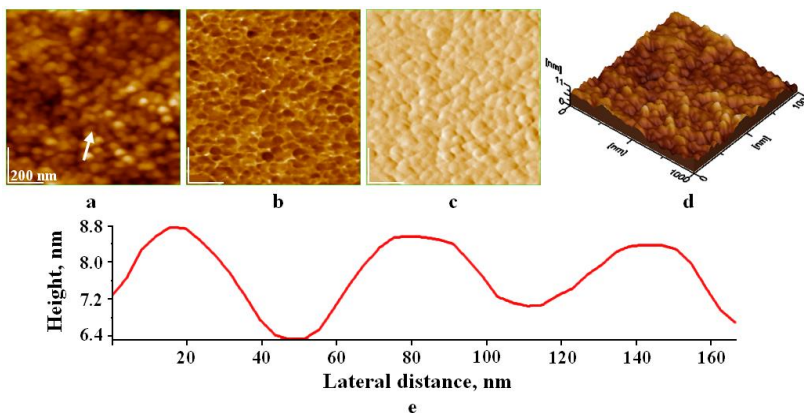


Fig. 3.6. Imagini AFM pentru nanoparticule de HAP-10 % Zn, adsorbite pe sticlă, din dispersii apoase: a) topografie 2D; b) imagine de faze; c) imagine de amplitudine; d) topografie 3D; e) profil al secțiunii transversale; arie scanată 1000 nm × 1000 nm.

4. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITE DOPATE CU Sr

S-au preparat noi hidroxiapatite substituie cu stronțiu, HAP-Sr, cu grad ridicat de cristalinitate, printr-un procedeu nou de sinteză chimică umedă asistată de substanțe șablon (*templates*) (etilendiamină și o-toluidină), pornind de la azotați de calciu și de stronțiu și fosfat acid de diamoniu în raport stoichiometric, procesați în mediu bazic (amoniac).

[P.T. Frangopol, A. Mocanu, V. Almasan, **C. Garbo**, R. Balint, G. Borodi, I. Bratu, O. Horovitz and M. Tomoaia-Cotisel, Synthesis and structural characterization of strontium substituted hydroxyapatites, *Rev. Roum. Chim.*, 61(4-5), 339-346 (2016)].

Hidroxiapatitele sintetizate corespund formulei $\text{Ca}_{10-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, unde $x = 0$ (hidroxiapatită pură, HAP), 0,59; 1,21 și 1,87 (HAP-Sr), precum și 10, corespunzând la substituția totală a calciului cu stronțiu (SrHAP). Ele au fost caracterizate prin XRD (Fig. 4.1), FTIR și spectroscopie Raman (Fig. 4.2), precum și TEM și AFM

S-au găsit corelații strânse între conținutul de Sr, dimensiunea cristalelor și cristalinitate pentru nanopulberile obținute. Aceste

nanomateriale au demonstrat o morfologie controlată și pot fi utilizate în ortopedie ca substitute pentru remodelare osoasă, precum și în stomatologie ca agenți de desensibilizare și pentru remineralizarea smalțului.

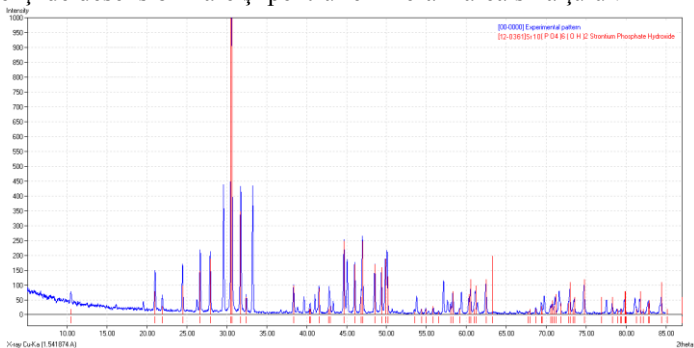


Fig. 4.1. Spectru XRD pentru nanopulberea de SrHAP, comparat cu PDF pentru $Sr_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

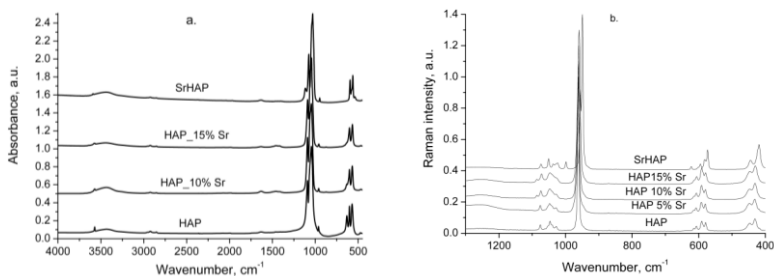


Fig. 4.2. Spectre normalizate FTIR (a) și Raman (b) ale HAP și HAP substituite cu Sr

Metodologia chimică umedă mediată cu substanțe-șablon, descrisă în acest capitol duce la produși bine cristalizați, cu nanostructură și morfologie controlată. Aceste noi nanomateriale HAP-Sr au aplicații potențiale în ingineria biomedicală, în special în domeniul ortopedic, stomatologic și maxilofacial.

5. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITĂ DOPATĂ CU Ag, Au, Zn și NANOPARTICULE DE ARGINT

S-a preparat în premieră nanohidroxiapatită dopată cu Ag (0.25 % g), Au (0.025 %) și Zn (0.2 %), (HAP-Ag-Au-Zn), printr-un procedeu

inovativ pe cale umedă, cuplat cu un proces de reducere pentru argint și aur: [A. Mocanu, G. Furtos, S. Rapuntean, O. Horovitz, C. Flore, **C. Garbo**, A. Danisteanu, Gh. Rapuntean, C. Prejmerean, M. Tomoaia-Cotisel, Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles, *Applied Surface Science*, **298**, 225–235 (2014)]. Produsul sintetizat, nanoHAP multisubstituit, a fost uscat prin liofilizare și s-a calcinat la 650°C. NanoHAP a fost caracterizată prin difracție de raze X, spectroscopie FTIR și tehnici imagistice: TEM, SEM și AFM.

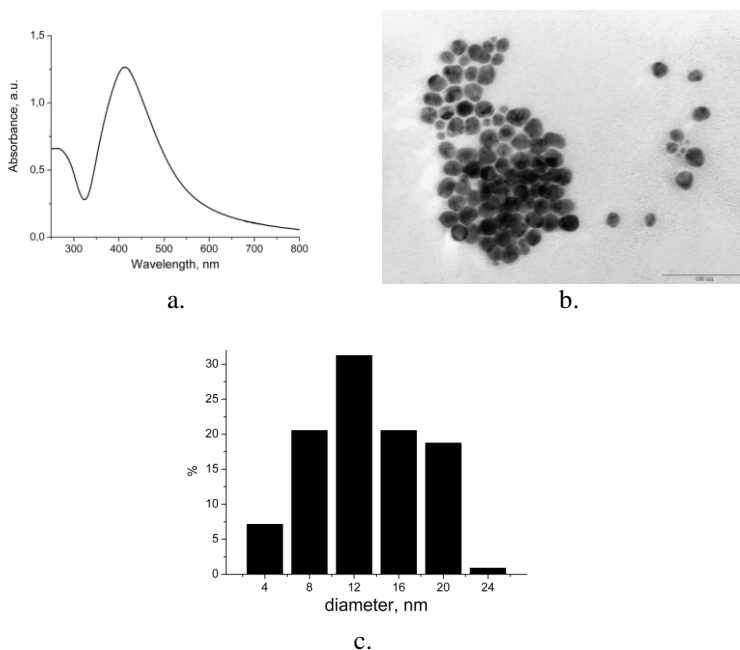


Fig. 5.1. Caracterizarea AgNP: (a) spectru UV-Vis; (b) imagine TEM; bara din imagine: 100 nm; (c) histograma distribuției dimensiunilor AgNP.

Nano HAP-Ag-Au-Zn s-a amestecat cu nanoparticule de argint (AgNP), sintetizate în prealabil în concentrație de 9 %, obținând un nou material: HAP-Ag-Au-Zn cu AgNP, notat HAP-Ag. AgNP s-au preparat prin reducerea azotatului de argint cu glucoză în mediu alcalin. Analizele TEM și UV-Vis au confirmat formarea de AgNP cu diametrul mediu de 12 nm (Fig. 5.1): [A. Mocanu, R.D. Pasca, G. Tomoaia, **C. Garbo**, P.T. Frangopol, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, New procedure to synthesize

silver nanoparticles and their interaction with local anesthetics, Int. J Nanomedicine, 8 (2013) 3867-3874]. Prezența AgNP a fost demonstrată și de spectrele XRD (Fig. 5.9).

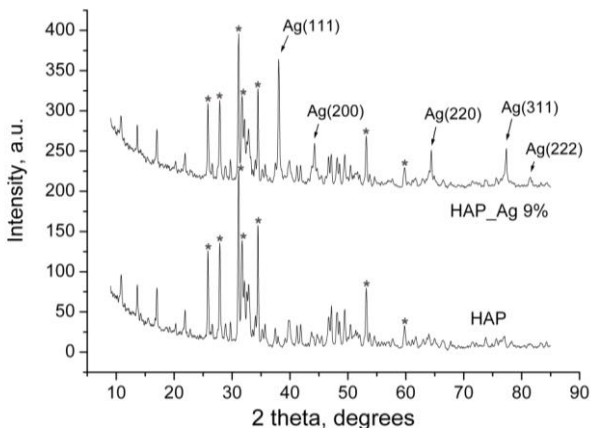


Fig. 5.9. Spectre XRD pentru HAP și HAP cu 9% AgNP (picurile caracteristice pentru HAP sunt marcate cu *)

În continuare, s-au obținut compozite cu matrice organică, având ca umplutură HAP și/sau HAP-Ag (Fig. 5.9), dintr-un amestec de monomeri (bis-GMA, 60% și TEGDMA, 40%), care au fost polimerizați pentru diferite concentrații de AgNP, până la 5.4 %. Noul material HAP-Ag conține AgNP adsorbite omogen pe suprafața particulelor de nano-HAP, triplu substituita cu Ag, Au, Zn. Aceste compozite sunt cercetate amănunțit în privința structurii lor și a proprietăților antimicrobiene.

S-au cercetat activitățile antibacteriene ale acestor compozite față de diferite specii patogene: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus cereus* și *Candida albicans*, folosind metoda difuziei pe disc Kirby–Bauer. Activitățile antibacteriene sunt intensificate cu creșterea conținutul de argint din compozite (Fig. 5.10, Tab. 3.5).

Efectul inhibitor s-a observat pentru toate cele 5 specii microbiene testate. Diametrul zonei de inhibiție a crescut odată cu creșterea conținutului de AgNP al probelor. Cel mai bun efect a fost atins pentru cele mai ridicate concentrații în AgNP, 4.5% și 5.4 %. Nu au existat diferențe semnificative între citirile după 24 și 48 ore de incubație. Datele arată un efect

antimicrobian semnificativ al eliberării lente de ioni Ag^+ *in vitro* față de cinci specii patologice.

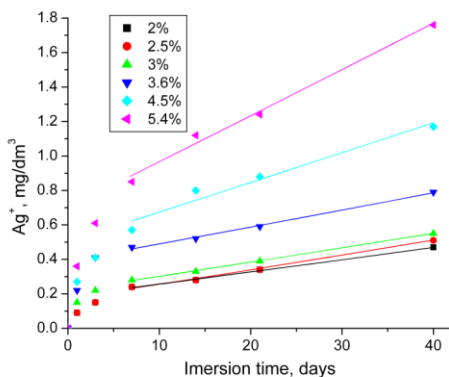


Fig. 5.10. Eliberarea argintului în timp din compozitele cu matrice organică

Tab. 5.3. Conținutul în argint al probelor-disc și diametrul zonelor de inhibiție la 48 h

Tulpini testate	Conținut în AgNP (% g) și diametrul zonelor de inhibiție (mm)						
	2	2.5	3	3.6	4.5	5.4	0
<i>Escherichia coli</i>	10	12	12	12	14	15	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	12	13	13	15	16	0
<i>Staphylococcus spp.</i>	0	8	10	10	12	14	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	10	11	11	12	14	0
<i>Candida albicans</i>	10	11	12	12	15	15	0

Aceste efecte relevă clar faptul că AgNP pot fi utilizate eficient în combinație cu HAP multi-substituite și matrice polimerică, ambele cu rol de purtători, pentru a îmbunătăți eficacitatea lor contra diferitelor specii patologice. Aceste compozite pot fi considerate ca fiind un material antimicrobian promițător pentru acoperirea implanturilor ortopedice și stomatologice sau pentru cimenturi osoase în aplicații chirurgicale

Viteza de eliberare a ionilor de argint din aceste compozite în fluid corporal simulat este mare în prima zi, descrește apoi și devine practic constantă după 7 zile. Testele de eficiență antibacteriană ale compozitelor conținând AgNP efectuate pe cinci specii patologice diferite, au arătat un efect inhibitor clar pentru toate speciile microbiene testate.

Acest efect antimicrobian crește cu creșterea conținutului de AgNP din compozite. Mai mult, mediul a rămas steril chiar și după îndepărtarea discurilor de compozit conținând argint, ceea ce sugerează că efectul antimicrobian al compuşilor realizați este de natură bactericidă.

Prin urmare, aceste compozite au o activitate puternică asupra celor 5 tulpini bacteriene. Pe de altă parte, HAP multisubstituită cu Zn (0.200%), Ag (0.250%) și Au (0.025 %), dar fără nanoparticule de argint, nu a prezentat nici un efect antibacterian la aceste concentrații. Rezultatele sugerează faptul că aceste compozite obținute ar trebui considerate materiale antibacteriene și ar putea fi folosite în implanturi pentru aplicații stomatologice și în chirurgia ortopedică. Ionii de Ag⁺ eliberați au reacționat cu cei cinci patogeni inactivându-le metabolismul, inhibându-le creșterea și în final determinând activitatea bacteriană a acestor compozite cu HAP și AgNP.

Sunt planificate experimente viitoare pentru evaluarea *in vivo* a acestor nanocompozite HAP/ AgNP / matrice organică ca potențiali agenți pentru acoperirea implanturilor în scopul evitării sau controlării infecțiilor bacteriene în chirurgia ortopedică și stomatologică.

Recent am demonstrat că discurile formate din nanoparticule de HAP, conținând nitroxolina (5-nitro, 8-hidroxichinolina, NHQ) și ioni Ag⁺ au condus la o activitate antimicrobiană sporită asupra culturilor de *Staphylococcus aureus* față de activitatea compusului NHQ: [A. Danistean, M. Gorea, A. Avram, S. Rapuntean, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **C. Garbo**, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, Antimicrobial activity of ceramic disks loaded with silver ions and nitroxoline, *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Chimia*, **61** (3), Tom I, (2016) 275-283].

În cadrul cercetărilor interdisciplinare recente, privind sensibilitatea *in vitro* a unor micro-organisme la nanostructuri multifuncționale pe bază de hidroxiapatită: HAP, hidroxichinolină: HQ sau nitrohidroxichinolină: NHQ, în prezența ionilor de Zn²⁺, am evidențiat faptul că aceste nanostructuri au efecte biologice, antimicrobiene, remarcabile asupra următoarelor tulpini: *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Candida* și *Prototheca*: [S. Rapuntean, A. Pop, V. Miclaus, **C. Garbo**, F. Chirila, Gh. Rapuntean, N. Fiț, H. Farcău, M. Tomoaia-Cotisel, "Research concerning *in vitro* sensitivity of some microorganisms at hydroxyquinoline and cupric derivatives, deposited onto hydroxyapatite", *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 72(2)/2016; pISSN 1843-5270; eISSN 1843-5378.]

6. NANOSTRUCTURI DIN HIDROXIAPATITE DOPATE CU Mg, Zn, Sr, Si

S-au preparat nanopulberi sintetice de hidroxiapatite multi-substituite conținând Mg, Zn, Sr și Si în rețeaua hidroxiapatitei (HAP), printr-o metodă chimică umedă. Parametrii procesului sunt stabiliți pentru a permite substituirea simultană cu acești ioni în locul calciului, ca și al grupelor fosfat și OH⁻. Cele 4 noi hidroxiapatite sintetizate în premieră, au fost: HAP complex (HAPc): HAP-1,5%Mg-0,2%Zn-0,2%Si; HAPc cu 5%Sr, (HAPc_5%Sr); și HAPc cu 10%Sr, (HAPc_10%Sr), alături de HAP pură, obținută în aceleași condiții (Tab. 6.1).

Tab. 6. 1. Compoziția hidroxiapatitelor preparate

Nr*	Proba	Compoziție (% g)						Formula teoretică
		Ca	Mg	Zn	Sr	P	Si	
1,2	HAP	38,89	0	0	0	18,50	0	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
3,4	HAPc	37,71	1,5	0,2	0	18,47	0,2	Ca _{9,36} Mg _{0,61} Zn _{0,03} (PO ₄) _{5,93} (SiO ₄) _{0,07} (OH) _{1,93}
5,6	HAPc_5%Sr	34,34	1,5	0,2	5	17,97	0,2	Ca _{8,76} Mg _{0,63} Zn _{0,03} Sr _{0,58} (PO ₄) _{5,93} (SiO ₄) _{0,07} (OH) _{1,93}
7,8	HAPc_10%Sr	30,98	1,5	0,2	10	17,46	0,2	Ca _{8,12} Mg _{0,65} Zn _{0,03} Sr _{1,20} (PO ₄) _{5,93} (SiO ₄) _{0,07} (OH) _{1,93}

* Probele Nr. 1, 3, 5, 7 sunt necalcinate, iar probele Nr. 2, 4, 6, 8 sunt probe calcinate (300°C, 1h)

Structura chimică și caracterizarea morfologică a pulberilor preparate s-a realizat prin XRD (Fig. 6.2), spectroscopie FTIR și Raman (Fig. 6.3 și 6.4), TEM, HR-TEM, SEM (Fig. 6.11) și AFM, precum și măsurători BET (Fig. 6.23 și Tab. 6.6). Rezultatele arată că substituirea ionilor în rețeaua HAP produce o schimbare distinctă în forma și dimensiunile nanoparticulelor sau în gradul de cristalizare al produselor: precipitate sau pulberi liofilizate, necalcinate sau calcinate.

Gradul de eliberare a ionilor din aceste nanopulberi a fost determinat în apă pură și în lichid corporal simulat. HAP multi-substituită (msHAP) cu conținutul cel mai ridicat de Sr a prezentat cea mai mare solubilitate, cu o viteză mai ridicată de eliberare a ionilor față de pulberea de HAP pură, ceea ce se corelează cu activitatea lor biologică mărită.

HAP multi-substituite preparate prezintă avantajul de a moșteni efectul *in vivo* al elementelor substituente, dar și structura și proprietățile HAP pure. Și ele sunt biocompatibile, netoxice, osteoconductive, ne-

imunogenetice, ne-inflamatoare și bioactive, având capacitatea de a se integra în țesutul viu. Astfel, aceste biomateriale prezintă similitudini chimice și structurale cu mineralele osului, fiind candidați promițători pentru substitute de os, ca și pentru vindecarea și remodelarea osului osteoporotic.

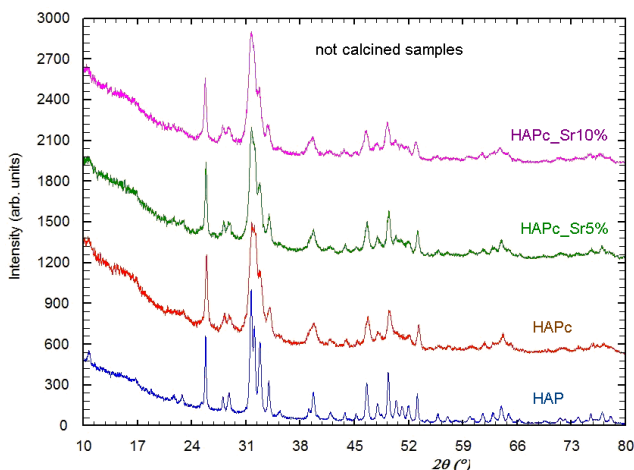


Fig. 6.2a. Comparație între spectrele XRD - probe necalcinate (1, 3, 5, 7)

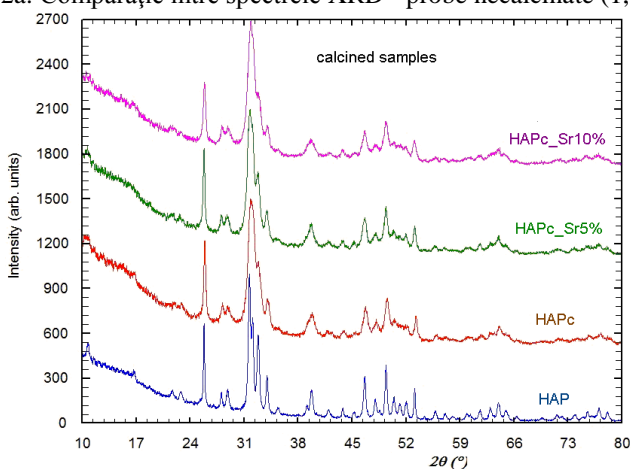


Fig. 6.2b. Comparație între spectrele XRD - probe calcinate (2, 4, 6, 8)

Spectrele FTIR sunt comparate în Fig. 6.3a pentru probele necalcinate și în Fig. 6.3b pentru cele calcinate. Toate spectrele sunt normalizate la 1 pentru cel mai înalt maxim de absorbție.

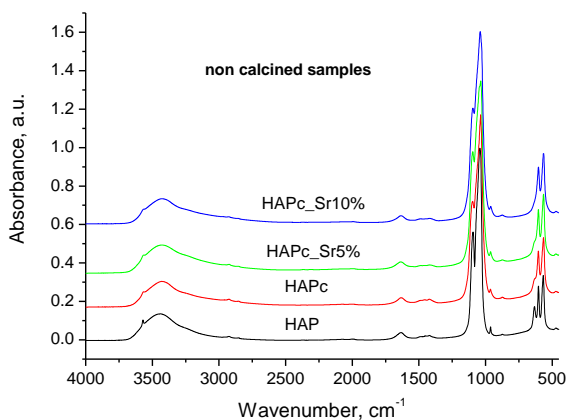


Fig. 6.3a. Spectre FTIR al probelor necalcinate spectra (1, 3, 5, 7); spectrele sunt normalizate

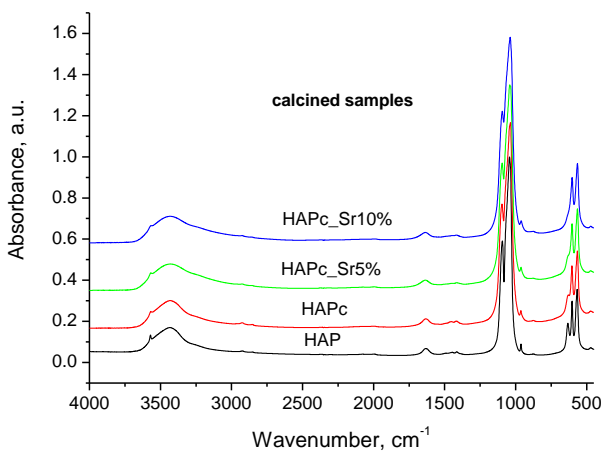


Fig. 6.3b. Spectre FTIR ale probelor calcinate (2, 4, 6, 8); spectrele sunt normalizate

Spectrele sunt asemănătoare, prezentând toate picurile de absorbție pentru gruparea PO_4 din hidroxiapatite: vibrația de valență asimetrică ν_3 (cea mai intensă bandă, dublet), de valență simetrică ν_1 (de joasă intensitate, fiind interzisă în IR) și cele două moduri de deformare: asimetrică ν_4 (dublet) și simetrică ν_1 . Picul caracteristic grupărilor OH structurale din HAP este și el prezent la $3430\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$, în timp ce picul de librare de la cca 630 cm^{-1} este vizibil doar ca un umăr în majoritatea probelor.

Vibrațiile caracteristice ale grupării PO_4 apar în toate spectrele Raman (Fig. 6.4). Cea mai intensă este vibrația de valență simetrică ν_1 , de la $960\text{-}962\text{ cm}^{-1}$, interzisă în IR

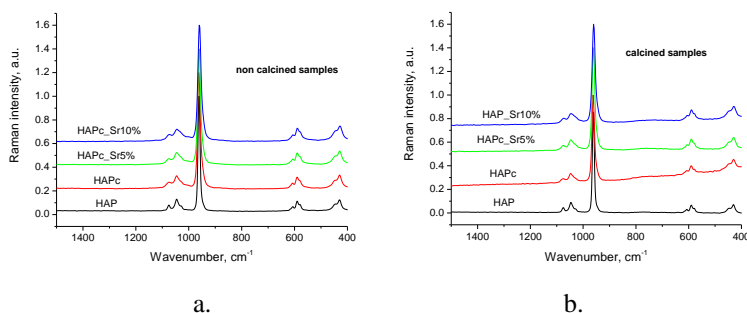
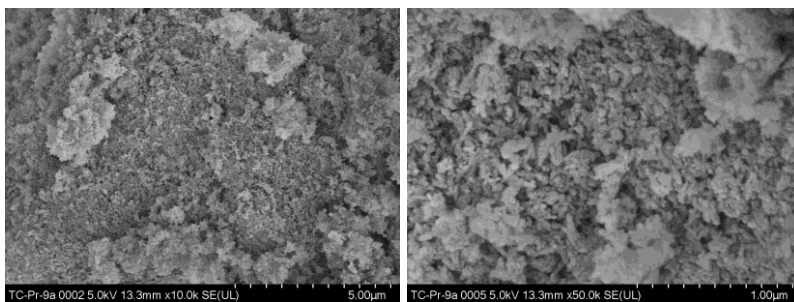


Fig. 6. 4. Spectre Raman ale probelor (a) necalcinate (1, 3, 5, 7); (b) calcinate (2, 4, 6, 8); spectrele sunt normalizate

Imaginile TEM oferă detalii asupra morfologiei particulelor. În imaginile TEM apar în general particule alungite, cu lungimea de 40-50 nm și diametre de 20-30 nm. Aceste particule alungite constau din șiruri unidimensionale de domenii cu simetrie în general sferică.



a.

b.;

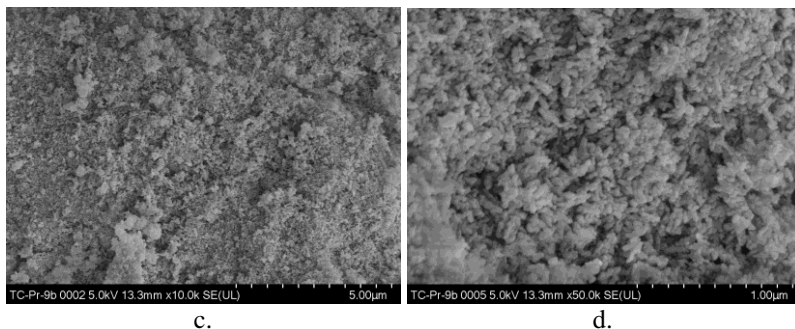


Fig. 6. 11. Imagini SEM pentru proba HAP necalcinată 1 (a, b) și cea calcinată 2 (c, d); barele sunt de 5 μm (a, c), respectiv 1 μm (b, d).

Câteva imagini SEM sunt exemplificate în Fig. 6. 11. Imaginile SEM arată că probele conțin blocuri foarte poroase de particule, de dimensiuni micrometrice. La mărimi mai mari se pot observa și nanoparticulele componente.

În cazul rezultatelor analizei BET, suprafață specifică, volum specific al porilor și raza cea mai probabilă a porilor, sunt prezentate în Tab. 6. 6. În Fig. 6. 22. este redată atât izoterma reprezentativă de adsorbție-desorbție cât și distribuția dimensiunii porilor pentru proba de HAP calcinată.

Toate probele prezintă o suprafață specifică mare, datorită atât gradului ridicat de dispersie al pulberilor, cât și porozității lor. Prin calcinare, suprafața specifică se micșorează ca urmare a sinterizării nanoparticulelor, în timp ce volumul specific al porilor este în mare neschimbat. Pulberile HAP nesubstituite, atât calcinate, cât și necalcinate, prezintă o distribuție mai îngustă a dimensiunilor porilor (diametru cca 8 nm), decât cele substituite, unde majoritatea porilor prezintă diametre între 10 și 25 nm.

Tab. 6.6. Caracteristici deduse din analiza BET a probelor de HAP

Proba	Suprafață specifică, m^2/g		Volum specific al porilor, cm^3/g		Raza cea mai probabilă, nm	
	necalc.	calc.	necalc.	calc.	necalc.	calc.
HAP	95,6	86,3	0,358	0,344	7,7	7,7
HAPc	135,1	107,4	0,376	0,383	11,3	9,5; 14,5
HAPc_5%Sr	106,1	99,9	0,229	0,237	20,2	14,5
HAPc_10%Sr	125,8	114,4	0,333	0,302	13,3	14,5

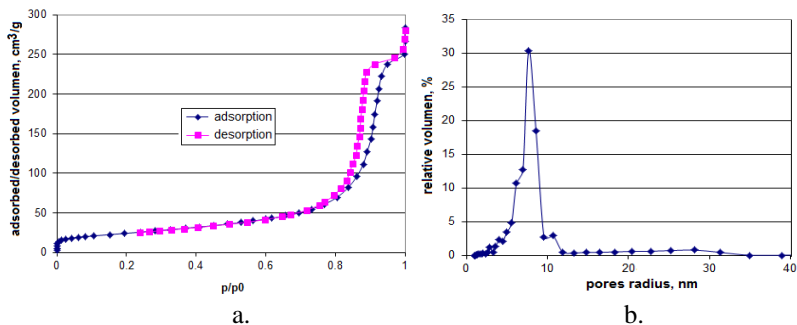


Fig. 6.22. Izoterme de adsorbție-desorbție (a) și distribuții ale dimensiunilor porilor (b) pentru proba 2 (HAP calcinată).

S-a cercetat efectul elementelor substituente Sr, Mg, Zn și Si asupra structurii și morfologiei HAP, folosind diferite tehnici de investigare: XRD, spectroscopie FTIR și Raman, imagistică TEM, SEM și AFM, măsurători de potențial zeta și BET, precum și studiul solubilității în diverse medii apoase: apă ultrapură și SBF. Hidroxiapatitele substituie eliberează în cantitate mai mare Ca și P decât HAP pură, deci prezența elementelor substituente mărește solubilitatea hidroxiapatitei. Cantitatea de P eliberată este mai ridicată decât cea care ar corespunde raportului stoichiometric P/Ca, deci are loc o dizolvare incongruentă. Cantitățile de Mg și Sr eliberate sunt de asemenea mai mari decât cele care ar corespunde conținutului lor în proba solidă; magneziul pare a fi eliberat cel mai ușor. Valoarea pH-ul mediului a prezentat unele mici variații, între 6 și 7.

7. BIOCUMPATIBILITATE. Nanostructuri, hidroxiapatite dopate cu Mg, Zn, Sr, Si în culturi de celule osteoblaste

S-a determinat răspunsul celular al osteoblastelor in vitro la nanostructuri din HAP dopate cu Mg (1,5 %), Zn (0,2 %), Sr (5 % și 10%) și Si (0,2%), auto-asamblate în 4 scaffolduri poroase realizate din HAP stoichiometric, HAP-Mg-Zn-Si (notat HAP complex: HAPc), HAPc-5%Sr și HAPc-10% Sr, în mediul de cultură, timp de 1, 3, 7, 21, 28 de zile. Testele de viabilitate, incluzând adeziunea și proliferarea, MTT, Alamar blue și diacetatul de fluoresceină, ca și expresia proteinei celulare pentru markerii osteoblastelor: colagen-1, fosfataza alcalină, osteopontina, osteocalcina și osteonectina din teste celulare adecvate, au demonstrat beneficiile la momente timpurii (<1 săptămână) pentru formarea osului aduse de încorporarea Mg, Zn și Si în rețeaua hidroxiapatitelor poroase

(HAP-Mg-Zn-Si), ca și pentru HAP-Mg-Zn-Si-Sr, în cazul ambelor nivele de Sr (5% și 10%), față de HAP stoichiometrică. Nanostructurile cu 5 sau 10 % g Sr au sprijinit semnificativ o creștere a răspunsului celular în comparație cu toate celelalte grupe de HAP și HAPc la toate momentele de timp, după cum arată analiza statistică ($P < 0,05$). Aceste rezultate evidențiază răspunsul celular la nivelele de Sr și sugerează că se ajunge la un efect optim cu HAP substituit cu 1,5% Mg, 0,2% Zn, 0,2% Si și 10% Sr, prin efectul tuturor elementelor folosite în doparea HAP, asupra activității osteoblastelor, în special la timpi mai îndelungați (> 1 săptămână). Fără îndoială, pe lângă compoziția chimică a acestor biomateriale, un rol important îl joacă structura și proprietățile superficiale, precum rugozitatea suprafeței scaffoldurilor asupra interacțiunii biomaterialelor și celulelor la interfața scaffoldurilor cu mediul de cultură. Fiind recunoscut rolul Sr în procesul de resorbție a celulelor osoase așa cum sunt osteoclastele, se poate avea în vedere un alt beneficiu: descreșterea proceselor de resorbție osoasă. În consecință, sugerăm o potențială aplicare a acestor biomateriale în tratamentul osteoporozei, când s-ar putea atinge un echilibru favorabil între formarea și resorbția osului.

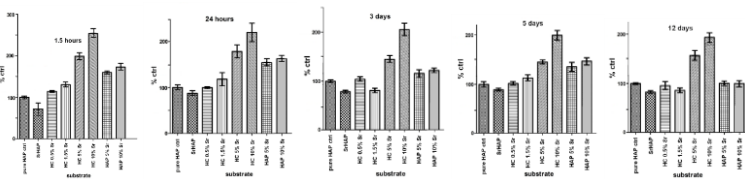


Fig. 7.4. Aspect grafic al testului de viabilitate cu Alamar blue la diferite momente de timp, folosind scaffoldurile din **HAP**: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ utilizat drept control; **SrHAP**: $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; **HC**: HAPcomplex [HAP-Mg(1,5%g)-Zn(0,2%g)-Si(0,2%g)]; **HC-0,5%g Sr**, **HC-1,5%g Sr**, **HC-5%g Sr**, **HC-10%g Sr**; HAP-5%g Sr; HAP-10%g Sr, dezvoltate în această cercetare științifică și tehnologică și testate în culturile celulare.

Testele de viabilitate Alamar Blue au fost realizate pentru a studia adeziunea celulelor (în primele ore după însămânțare) și proliferarea celulelor la diferite momente de timp, folosind drept control celulele crescute pe suprafețe de nano HAP pur (Fig. 7.4). După 1,5h de la însămânțarea celulelor pe suprafața scaffoldurilor, se observa că **HAPc**: HC (HAP-Mg-Zn-Si) dopate cu 5% Sr și 10% Sr au fost cele mai favorabile scaffolduri pentru adeziunea mărită a celulelor, după cum a arătat și colorarea cu FDA (diacetatul de fluoresceină). Aceasta situație se regăsește și la alți timpi de până la 12 zile. În continuare am studiat

biocompatibilitatea și capacitatea osteoinductivă a diferitor scaffolduri realizate din HAP cu diferite concentrații de Mg, Zn, Sr, Si asupra comportării osteoblastelor în privința diferențierii finale la osteocite.

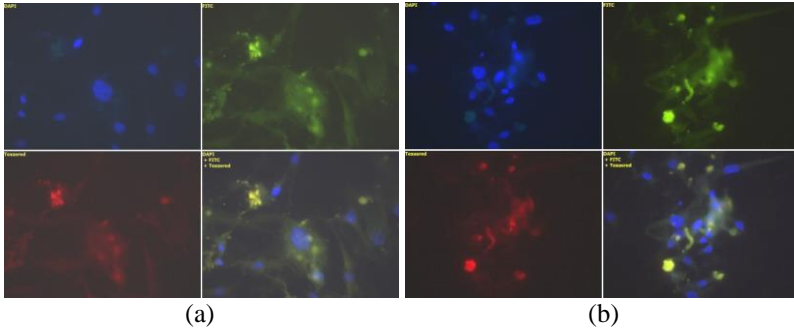


Fig. 7.5. Imuno-colorarea osteoblastelor: pentru collagen, în verde cu FITC, osteocalcina, roșu cu Texas red, nucleele celulare, în albastru, colorate cu DAPI. Imaginile au fost luate după 7 zile de cultivare a osteoblastelor pe scaffolduri, realizate din HAP pur (a) și HAPcomplex: HC (b): HAP-Mg(1,5%)-Zn(0,2%)-Si(0,2%)-Sr(1,5%).

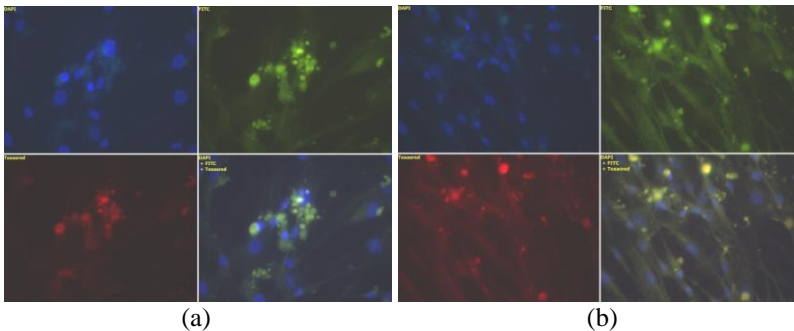


Fig. 7. 6. Imuno-colorarea osteoblastelor: pentru collagen, în verde cu FITC, osteocalcina, roșu cu Texas red, nucleele celulare, albastru, colorate cu DAPI. Imaginile au fost luate după 7 zile de cultivare a osteoblastelor pe scaffolduri, realizate (a) din HAP-Mg(1,5%)-Zn(0,2%)-Si(0,2%)-Sr(5%) și (b) din HAP-Mg(1,5%)-Zn(0,2%)-Si(0,2%)-Sr(10%).

Inițierea procesului de mineralizare după 7 zile de cultivare s-a studiat prin colorarea imunocitochimică pentru exprimarea proteinei osoase precum osteocalcina și osteopontina și pentru sinteza de novo a collagenului. Toate aceste proteine sunt secretate de osteoblaste și sunt componente ale

matricii osoase extracelulare. Osteocalcina se evidențiază în culoare roșie (Texas red), collagen-1A în verde (FITC) și nucleele celulare, în albastru (DAPI).

În urma interacțiunii dintre HAP și osteoblaste s-a dezvoltat o matrice (Fig.7.5.a) conținând collagen (verde) care poate fi observat atât ca fibrile cât și ca aglutinate globulare, și osteocalcina (roșu). Din contră, scaffoldurile de HC cu 1,5% Sr (Fig. 7.5.b) prezintă o matrice mai puțin organizată, dar susține proliferarea (densitate mare de nuclee celulare, colorate în albastru).

Scaffoldurile HAP-Mg(1,5%)-Zn(0,2%)-Si(0,2%)-Sr(5%) au susținut chiar și după 7 zile proliferarea celulelor (Fig. 7.6.a), cu dezvoltarea unei matrici osoase cu cristale mai definite și fibrile de collagen. Un aspect asemănător s-a observat pentru scaffolduri de HC-10% Sr [HAP-Mg(1,5%)-Zn(0,2%)-Si(0,2%)-Sr(10%)], imagini date în Fig. 7. 6.b, unde se observă o organizare sporită în fibre de collagen. S-a observat de asemenea o exprimare puternică pentru osteocalcină și collagen 1A.

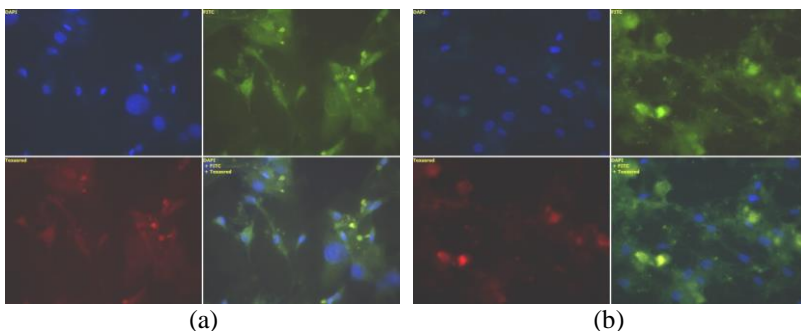


Fig. 7. 7. Imuno-colorarea osteoblastelor: pentru collagen, în verde cu FITC, osteocalcina, roșu cu Texas red, nucleele celulare, albastru, colorate cu DAPI. Imaginile au fost luate după 7 zile de cultivare a osteoblastelor pe scaffolduri, realizate (a) din HAP-Sr(5%) și (b) din HAP-Sr(10%).

Scaffoldurile din HAP cu 5% Sr și HAP-10% Sr s-au dovedit a fi favorabile pentru proliferarea celulelor. S-a observat o exprimare mai puternică pentru osteocalcină pe scaffold de HAP-5% Sr (Fig. 7.7.a) și o organizare mai avansată a fibrelor collagen 1A, pe suport de HAP-10% Sr (Fig. 7. 7.b).

Rezultatele obținute demonstrează rolul stimulator al biomaterialelor dezvoltate pe bază de hidroxiapatite dopate (multi-substituite) cu Mg, Zn, Sr, Si (HAP-Mg-Zn-Sr-Si) asupra viabilității, proliferării și diferențierii celulare în mediu de cultură.

Această nouă generație de materiale bioactive, HAP-Mg-Zn-Sr-Si, sunt intens cercetate în privința inducerii unei osteointegrări rapide cu osul gazdă, prin promovarea proliferării și diferențierii celulelor, ca și prin activarea căilor specifice de semnalizare celulară și îmbunătățirea expresiei genelor. Încorporarea anumitor elemente precum stronțiu, zinc, magneziu și siliciu în grefele osoase prezintă un deosebit interes, datorită rolului lor de cofactori în procesele metabolice ale osului și cartilajelor și de asemenea pentru producția de dizolvare ionică, care pot stimula proliferarea celulelor și producerea de factori de creștere și de matrice extracelulară.

Rezultatele obținute sugerează că aceste biomateriale, HAP-Mg-Zn-Sr-Si, dețin potențiale aplicații în repararea defectelor osoase și în tratarea fracturilor de os osteoporotic.

8. NANOSTRUCTURI: HIDROXIAPATITĂ, AgNP ÎN MATRICE POLIMERICĂ. Nou cement de oase de interes biomedical

Deși ingineria de înlocuire totală a articulațiilor a devenit obișnuită în ultimii ani, problemele din cauza infecției bacteriene rămân o complicație semnificativă în urma acestui procedeu. Obiectivul acestui studiu a fost de a obține o serie de cimente de oase (Tabel 8.1) cu auto-întărire pe bază de hidroxiapatită (HAP) cu nanoparticule de argint (AgNP), notat HAP-Ag (caracterizat prin XRD, Fig. 8.3), și ZrO_2 , încorporate într-o matrice polimerică pe bază de 2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacrilil-oxi-propoxi)-fenil]propan/dimetacrilat de trietilenglicol. [G. Furtos, M. Tomoaia-Cotisel, C. Garbo, M. Șenilă, N. Jumate, I. Vida-Simiti, C. Prejmorean, New composite bone cement based on hydroxyapatite and nanosilver, *Particulate Science and Technology*, **31** (4), 392-398 (2013)]. Interacțiunea dintre pulberea anorganică și apă depinde de tipul, conținutul și dimensiunea umpluturii, ca și de caracteristicile matricii polimerice: polaritate (hidrofilă sau hidrofobă) și grad de conversie.

Noile biomateriale nanostructurate de tip compozit obținute au fost testate pentru eliberarea ionilor de Ag^+ , care cresc în timp și a depins de conținutul de argint din cement. Cea mai ridicată eliberare de argint s-a înregistrat la cementul cu 1,26 %g argint.

Aceste biomateriale nanostructurate au fost testate și pentru proprietățile mecanice: rezistența la compresie (CS) și modulul de compresie (CM), precum și pentru radioopacitate.

Rezistența la compresie (CS) s-a determinat într-o mașină universală de testare (Lloyd LR5Kplus, UK) la o viteză de încărcare de 0,75 mm/min până la rupere. Curbele de deflecție a sarcinii au fost înregistrate

cu ajutorul software-ului specific instalației (Nexygen; Lloyd Instruments). Valoarea CS în MPa s-a calculat cu următoarea ecuație 3:

$$CS = \frac{F}{\pi \cdot r^2}, \quad (3)$$

unde F este sarcina aplicată (N), iar r este raza probei cilindrice, măsurată înaintea încercării (2mm).

Valoarea CM (GPa) s-a determinat din panta porțiunii elastice a curbei solicitare-deformare ($d\sigma-d\varepsilon$).

Rezultatele arată că CS pentru cementul de oase a fost între 133,37 și 146,70 MPa, iar CM a fost între 1,68 și 1,82 GPa ($p > 0,05$). Cele mai ridicate valori CS au fost obținute pentru cimenturile C1 și C3 și această comportare ar putea fi explicată prin gradul mai ridicat de reticulare în matricea polimerică. S-a observat o ușoară creștere a CM pentru probele cu raport 1,5/1 pulbere/lichid. Adăugarea de AgNP și ZrO₂ a mărit radioopacitatea cementului de oase experimental.

Tab. 8.1. Compozițiile cimenturilor de oase

Cod cement	Componente (% g)	P/L*
C0	Hap (50%), Monomeri (50%)	1/1
C1	Hap_Ag (50%), Monomeri (50%)	1/1
C2	Hap_Ag (60%), Monomeri (40%)	1,5/1
C3	Hap_Ag (25%), ZrO ₂ (25%), Monomeri (50%)	1/1
C4	Hap_Ag (35%), ZrO ₂ (25%), Monomeri (40%)	1,5/1

*P = pulbere; L = monomeri lichizi

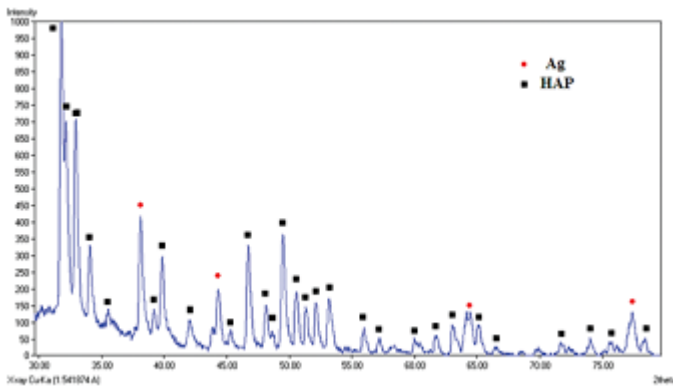


Fig. 8.3. Spectre de difracție a razelor X pe pulberi de Hap-Ag

Se observă o creștere a valorilor radioopacității de la 0,38 mm Al pentru cementul C0 la 3,91mm Al pentru cementul C4. Rezultatele arată o diferență mare între radioopacitatea cementurilor cu pulberi de HAP, HAP-Ag și cimenturile cu pulbere de HAP_Ag și ZrO₂.

Pentru mărirea duratei de viață a implanturilor cementate și în consecință, îngrijirea pacientului, este vitală îmbunătățirea proprietăților mecanice, radioopacității și biocompatibilității materialelor sau obținerea osului nou la interfața cement-os.

Adăugarea de AgNP în aceste biomateriale a avut scopul de a furniza o activitate antimicrobiană. Nanoparticulele de argint prezintă proprietăți antimicrobiene eficiente datorită suprafeței lor extrem de mari, care asigură un contact mai bun cu microorganismele. Folosind AgNP ca umplutură în materialele compozite, va crește dispersarea nanoparticulelor de argint la suprafața cementului de oase și la interfața os-cement.

Creșterea raportului P/L (Tab. 8.1) și adăugarea de pulberi de AgNP și ZrO₂ au ajutat la îmbunătățirea radioopacității cementurilor în ordinea următoare: 0,38 mmAl (C0) < 0,88 mmAl (C1) < 1,24mmAl (C2) < 3,47mmAl (C3) < 3,91mmAl (C4).

Rezultatele obținute propun aceste biomateriale pentru potențiale aplicații clinice.

9. CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat prezintă strategiile de dezvoltare a nanostructurilor/biomaterialelor de interes biologic și biomedical care au condus la realizarea unor ***nanostructuri inovative*** proiectate și realizate ***pentru stimularea răspunsurilor celulare*** specifice la nivel molecular.

Biomaterialele obținute au fost caracterizate prin metode fizice, chimice și biologice adecvate: XRD, FTIR și Raman spectroscopies, TEM, SEM, AFM, măsurători BET și de potențial zeta, și prin teste biologice doveditoare pentru adeziunea, proliferarea și diferențierea osteoblastelor *in vitro*.

Rezultatele obținute arată că modificările în compoziția și structura hidroxiapatitei pot accelera formarea și remodelarea osului, cu potențiale aplicații biologice și biomedicale.

În **capitolul 1**, s-au preparat ***șapte serii de nanostructuri*** (biomateriale), pe baza de hidroxiapatite, cu proprietăți controlate: diverse grade de cristalinitate și porozitate precum și diferite dimensiuni și forme de nanoparticule, calcinate sau necalcinate. Aceste caracteristici asigură o bună activitate biologică, pentru potențiale utilizări biomedicale.

Obiectivul cercetării în **capitolul 2** a fost de a cerceta efectele substituirii cu silicat în rețeaua hidroxiapatitei (HAP) asupra proprietăților sale chimice și fizice și a răspunsului biologic al osteoblastelor *in vitro*. S-a utilizat o metodă chimică umedă pentru a sintetiza **patru** pulberi de HAP substituit cu silicat (Si-HAP), cu 0,47; 2,34; 4,67 și 9,34 % g Si, liofilizate și calcinate la 650°C, 1h.

Biomaterialele au fost caracterizate fizic și chimic, prin XRD, spectroscopie FTIR și Raman, ca și prin imagistică TEM, SEM și AFM și cercetate în privința influenței asupra adeziunii și proliferării celulare și expresiei proteinei, în cultive de osteoblaste umane, folosind teste de viabilitate, MTT și Alamar blue și colararea imunocitochimică a osteoblastelor, având în vedere potențiala lor folosire în repararea și regenerarea osoasă.

Scaffoldurile din nanostructuri Si-HAP au o mai bună acțiune de stimulare a osteoblastelor decât HAP pur. Scaffoldurile din HAP-Si(0,47%) și HAP-Si(2,34%) apar ca având cea mai bună acțiune dintre cele patru nanomateriale Si-HAP, pentru proliferarea osteoblastelor. Aceste rezultate sugerează că biomaterialele Si-HAP joacă un rol important în reglarea proliferării și diferențierii osteogenice a osteoblastelor la osteocite, ca și în formarea osului, având potențiale aplicații în repararea defectelor osoase.

În **capitolul 3** s-a realizat sinteza a **cinci serii** de noi nano-hidroxiapatite (HAP) poroase, substituite cu diferite cantități de Zn (HAP-Zn), de la 0.2 la 10% g în prezența unui surfactant, L-asparagina, pentru a controla distribuția dimensiunii porilor și morfologia nanopulberilor obținute, folosind un procedeu de co-precipitare. Astfel s-a dezvoltat o nouă abordare pentru prepararea de nanopulberi de HAP-Zn cu nucleație și capacitate de cristalizare îmbunătățită. Măsurătorile XRD au indicat HAP drept unica fază prezentă și au evidențiat natura nanostructurată a biomaterialelor obținute. Spectrele FTIR au confirmat de asemenea prezența structurii de HAP. Imaginile TEM, SEM și AFM au arătat morfologia nanostructurilor HAP-Zn. Analiza BET a permis caracterizarea suprafeței specifice și porozității probelor. Noile nanopulberi sunt proiectate pentru a fi folosite în chirurgia ortopedică, în special pentru tratamentul osteoporozei și ca substitute de os, dar și în stomatologie pentru remineralizarea smalțului.

În **capitolul 4**, se indică prepararea a **patru** noi hidroxiapatite substituite cu stronțiu, HAP-Sr, cu grad ridicat de cristalinitate, printr-un procedeu nou de sinteză chimică umedă, asistată de substanțe șablon (*templates*) (etilendiamină și o-toluidină). Hidroxiapatitele sintetizate corespund formulei $\text{Ca}_{10-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, unde $x = 0$ (hidroxiapatită pură, HAP), 0,59; 1,21 și 1,87 (HAP-Sr), precum și 10, corespunzând la

substituirea totală a calciului cu stronțiu (SrHAP). Ele au fost caracterizate prin XRD, FTIR și spectroscopie Raman, precum și TEM și AFM. Aceste noi nanobiomateriale HAP-Sr prezintă potențiale aplicații în ingineria biomedicală, în special în domeniile ortopedic, stomatologic și maxilo-facial.

În **capitolul 5**, s-a preparat în premieră, nanohidroxiapatită dopată cu Ag (0.25 % g), Au (0.025 %) și Zn (0.2 %), (HAP-Ag-Au-Zn), printr-un procedeu inovativ pe cale umedă, cuplat cu un proces de reducere. Nano HAP-Ag-Au-Zn s-a amestecat cu nanoparticule de argint (AgNP), sintetizate în prealabil, obținând un nou material: HAP-Ag-Au-Zn cu AgNP, notat HAP-Ag. În final s-au obținut compozite cu matrice organică, având ca umplutură HAP și/sau HAP-Ag, dintr-un amestec de monomeri (bis-GMA, 60% și TEGDMA, 40%), care au fost polimerizați pentru diferite concentrații de AgNP, până la 5.4 %. Aceste *opt serii* de noi compozite realizate prezintă semnificative proprietăți antimicrobiene. Efectul inhibitor s-a observat pentru 5 specii microbiene testate: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus cereus* și *Candida albicans*.

În cadrul cercetărilor interdisciplinare recente, am demonstrat că hidroxiapatitele au rol de transportor al AgNP sau al diverșilor complecși de argint-diverse biomolecule sau zinc și diverse biomolecule cu efecte antimicrobiene importante împotriva diferiților patogeni: *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Candida* și *Prototheaca*.

Rezultatele obținute arată că aceste compozite pot fi considerate ca fiind un material antimicrobian promițător pentru acoperirea implanturilor ortopedice și stomatologice sau pentru cimenturi osoase în aplicații chirurgicale, precum și în tratamentul diverselor infecții la animale.

În **capitolul 6** se prezintă hidroxiapatite multi-substituite, conținând Mg, Zn, Sr și Si în rețeaua hidroxiapatitei (HAP), preparate printr-o metodă chimică umedă care permite substituirea simultană a ionilor în locul calciului, ca și a grupelor fosfat și OH. Cele *patru* noi hidroxiapatite au fost sintetizate în premieră, și anume: o HAP complexă, HAP-1,5%Mg-0,2%Zn-0,2%Si (HAPc); HAPc cu 5%Sr (HAPc-5%Sr) și HAPc-10%Sr, inclusiv HAP pură, obținută în aceleași condiții.

S-a cercetat efectul elementelor substituente Sr, Mg, Zn și Si asupra structurii și morfologiei HAP, folosind diferite tehnici de investigare: XRD, spectroscopie FTIR și Raman, imagistică TEM, SEM și AFM, măsurători de potențial zeta și BET, precum și studiul solubilității în diverse medii apoase: apă ultrapură și SBF.

Hidroxiapatitele substituite eliberează în cantitate mai mare Ca și P decât HAP pură, deci prezența elementelor substituente mărește

solubilitatea hidroxiapatitei. Cantitatea de P eliberată este mai ridicată decât cea care ar corespunde raportului stoichiometric P/Ca, deci are loc o dizolvare incongruentă. Cantitățile de Mg și Sr eliberate sunt de asemenea mai mari decât cele care ar corespunde conținutului lor în proba solidă; magneziul pare a fi eliberat cel mai ușor. Valoarea pH-ul mediului a prezentat unele mici variații, între 6 și 7.

Capitolul 7 prezintă răspunsul celular al osteoblastelor *in vitro* la nanostructurile din HAP dopate cu Mg (1,5 %), Zn (0,2 %), Sr (5 % și 10 %) și Si (0,2 %) (sintetizate în Cap. 6), auto-asamblate în **4 scaffolduri poroase** realizate din HAP stoichiometric, HAP-Mg-Zn-Si (notat HAP complex: HAPc), HAPc-5%Sr and HAPc-10% Sr, în mediul de cultură, timp de 1, 3, 7, 21, 28 de zile. Au fost aplicate teste de viabilitate, incluzând adeziunea și proliferarea, folosind MTT, Alamar blue și diacetatul de fluoresceină, ca și expresia proteinei celulare pentru markerii osteoblastelor: collagen-1, fosfatiza alcalină, osteopontina, osteocalcina și osteonectina din teste celulare adecvate. Rezultatele lor evidențiază răspunsul celular la nivelele de Sr și sugerează că se ajunge la un efect optim cu HAP substituit cu 1,5%Mg, 0,2%Zn, 0,2%Si și 10%Sr prin efectul tuturor elementelor folosite în doparea HAP, asupra activității osteoblastelor. Rezultatele obținute sugerează că aceste biomateriale, HAP-Mg-Zn-Sr-Si, au potențiale aplicații în repararea țesutului osos și în tratamentul fracturilor osului osteoporotic.

Capitolul 8 prezintă nanostructuri formate din hidroxiapatită, nanoparticule de argint, AgNP, și ZrO₂, încorporate în matrice polimerică obținându-se **patru noi serii** de cementuri de oase de interes biomedical. Biomateriale nanostructurate obținute de tip compozit au fost testate pentru eliberarea ionilor de Ag⁺ și pentru proprietățile mecanice: rezistența la compresie (CS) și modulul de compresie (CM), precum și pentru radioopacitate. Rezultatele obținute propun aceste biomateriale, cu efecte antimicrobiene sporite, pentru potențiale aplicații clinice.

10. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. S. Larsson, N. L. Fazzalari, Anti-osteoporosis therapy and fracture healing, Arch. Orthop. Trauma Surg., 134 (2014), pp. 291-297.
2. S.E. Sattui, K.G. Saag, Fracture mortality: Associations with epidemiology and osteoporosis treatment, Nat. Rev. Endocrinol., 10 (2014), pp. 592-602.
3. E.F. Eriksen, J. Halse, M.H. Moen, New developments in the treatment of osteoporosis, Acta Obstet. Gynecol. Scand., 92(2013), pp. 620-636.

4. P.J. Meunier, C. Roux, E. Seeman, S. Ortolani, J.E. Badurski, T. D. Spector, J. Cannata, A. Balogh, E.M. Lemmel, S. Pors-Nielsen, R. Rizzoli, H.K. Genant, J.Y. Reginster, The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis, *N. Engl. J. Med.*, 350 (2004), pp. 459-468.
5. J.Y. Reginster, Strontium ranelate in osteoporosis, *Curr. Pharm. Design*, 8 (2002), pp. 1907-1916.
6. E. Boanini, P. Torricelli, M. Fini, A. Bigi, Osteopenic bone cell response to strontium-substituted hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 22 (2011), pp. 2079-2088.
7. B. Clarke, Normal bone anatomy and physiology, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 3 Suppl 3 (2008), pp. 131-139.
8. P.N. Kumta, C. Sfeir, D.H. Lee, D. Olton, D. Choi, Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization, *Acta Biomater.*, 1 (2005), pp. 65-83.
9. W. Suchanek, M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Mater. Res.*, 13 (1998), pp. 94-117.
10. S.V. Dorozhkin, M. Epple, Biological and medical significance of calcium phosphates, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002), pp. 3130-3146.
11. A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K. Noris Suarez, L. Moro, Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone, *J. Inorg. Biochem.*, 68 (1997), pp. 45-51.
12. F.C.M. Driessens, The mineral in bone, dentin and tooth enamel, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 89 (1997), pp. 663-689.
13. D.M. Ibrahim, A.A. Mostafa, S. I. Korowash, Chemical characterization of some substituted hydroxyapatites, *Chemistry Central Journal*, (2011), pp. 5-74.
14. J. H. Shepherd, D.V. Shepherd, S. M. Best, Substituted hydroxyapatites for bone repair, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 23 (2012), pp. 2335-2347.
15. S. Joschek, B. Nies, R. Krotz, A. Gopferich, Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone, *Biomaterials*, 21 (2000), pp. 1645-1658.

16. D. Tadic, M. Epple, A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomaterials* 25 (2004), pp. 987–994.
17. M. Figueiredo, J. Henriques, G. Martins, F. Guerra, F. Judas, H. Figueiredo, Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes—comparison with human bone, *J. Biomed. Mater. Res.* 92B (2009), pp. 409–419.
18. M. Figueiredo, A. Fernando, G. Martins, J. Freitas, F. Judas, H. Figueiredo, Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone, *Ceramics International*, 36 (2010), pp. 2383–2393.
19. M. Younesi, S. Javadpour, M.E. Bahrololoom, Effect of heat treatment temperature on chemical compositions of extracted hydroxyapatite from bovine bone ash, *J. Mater. Eng. Perform.*, 20 (2011), pp. 1484–1490.
20. P.J. Marie, P. Ammann, G. Boivin, C. Rey, Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone, *Calcif. Tissue Int.*, 69 (2001), pp. 121–129.
21. T. Naddari, B. Hamdi, J.M. Savariault, H. El Feki, A. Ben Salah, Substitution mechanism of alkali metals for strontium in strontium hydroxyapatite, *Mater. Res. Bull.*, 38 (2003), pp. 221–230.
22. J. Caverzasio, Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms, *Bone*, 42 (2008), pp. 1131–1136.
23. S.L. Peng, G.Q. Zhou, K.D.K. Luk, K.M.C. Cheung, Z.Y. Li, W.M. Lam, Z.J. Zhou, W.W. Lu, Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signalling pathway, *Cell Physiol. Biochem.*, 23 (2009), pp. 165–174.
24. A.S. Hurtel-Lemaire, R. Mentaverri, A. Caudrillier, F. Cournaire, A. Wattel, S. Kamel, E.F. Terwilliger, E.M. Brown, M. Brazier, The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate induced osteoclast apoptosis: new insights into the associated signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, 284 (2009), pp. 575–584.
25. A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano, Strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorg. Chim. Acta*, 360 (2007), pp. 1009–1016.
26. M. D. O'Donnell, Y. Fredholm, A. de Rouffignac, R.G. Hill, Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomater.*;4 (2008), pp. 1455–1464.

27. K. Zhu, K. Yanagisawa, R. Shimanouchi, A. Onda, K. Kajiyoshi, Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 26 (2006), pp. 509-513.
28. H.B. Pan, Z.Y. Li, W.M. Lam, J.C. Wong, B.W. Darvell, K.D.K. Luk, W.E. Lu, Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration, *Acta Biomater.*, 5 (2009), pp. 1678-1685.
29. W. Zhang, Y. Shen, H. Pan, K. Lin, X. Liu, B.W. Darvell, W.W. Lu, J. Chang, L. Deng, D. Wang, W. Huang, Effects of strontium in modified biomaterials, *Acta Biomater.*, 7 (2011), pp. 800-808.
30. S.C. Verberckmoes, G.J. Behets, L. Oste, A.R. Bervoets, L.V. Lamberts, M. Drakopoulos, A. Somogyi, P. Cool, W. Dorrine, M.E. De Broe, P.C. D'Haese, Effects of strontium on the physicochemical characteristics of hydroxyapatite, *Calcif Tissue Int.*, 75 (2004), pp. 405-415.
31. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, M. Sandri, G. Logroscino, Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement, *Acta Biomater.*, 3 (2007), pp. 961-969.
32. G.X. Ni, K.Y. Chiu, W.W. Lu, Y. Wang, Y.. Zhang, L.B. Hao, Z.Y. Li, W.M. Lam, S.B. Lu, K.D.K. Luk, Strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement in revision hip arthroplasty, *Biomaterials*, 27 (2006), pp. 4348-4355.
33. G.X. Ni, Z.P. Yao, G.T. Huang, W.G. Liu, W.W. Lu, The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts in vitro, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 22 (2011), pp. 961-967.
34. C. Capuccini, P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I.N. Mihailescu, A. Bigi, Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response, *Acta Biomater.*, 4 (2008), pp. 1885-1893.
35. W. Querido, A. L. Rossi, M. Farina, The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches, *Micron*, 80 (2016), pp. 122-134
36. A.L. Rossi, S. Moldovan, W. Querido, A. Rossi, J. Werckmann, O. Ersen, M. Farina, Effect of strontium ranelate on bone mineral: Analysis of nanoscale compositional changes, *Micron*, 56 (2014), pp. 29-36.
37. A. Bigi, E. Foresti, R. Gregorini, A. Ripamonti, N. Roveri, J.S. Shah, The role of magnesium on the structure of biological apatites, *Calcif. Tissue Int.*, 50 (1992), pp. 439-444.

38. A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti, N. Roveri, Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization, *J. Inorg. Biochem.*, 49 (1993), pp. 69-78.
39. E. Bertoni, A. Bigi, G. Cojazzi, M. Gandolfi, S. Panzavolta, N. Roveri, Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite, *J. Inorg. Biochem.*, 72 (1998), pp. 29-35.
40. E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, S. Sprio, Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008), pp. 239-247.
41. I. Cacciotti, A. Bianco, M. Lombardi, L. Montanaro, Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sintering behaviour. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 29 (2009), pp. 2969-2978.
42. F. Ren, Y. Leng, R. Xin, X. Ge, Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Acta Biomater.*, 6 (2010), pp. 2787-2796.
43. W.L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R.E. Riman, V.F. Janas, K.S. Ten-Huisen, Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method, *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 4647-4657.
44. D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N.H. de Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri, W. Chrzanowski, J.C. Knowles, R.J. Newport, A. Wong, Z. Gan, M.E. Smith, Magnesium incorporation into hydroxyapatite, *Biomaterials*, 32 (2011), pp. 1826-1837.
45. L. Stipniece, K. Salma-Ancane, N. Borodajenko, M. Sokolova, D. Jakovlevs, L. Berzina-Cimdina, Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method, *Ceram. Inter.*, 40(2014), pp.3261-3267.
46. S.C. Cox, P. Jamshidi, L.M. Grover, K.K. Mallick, Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation, *Mater. Sci. Eng., C* 35 (2014), pp. 106–114.
47. M. Caneva, D. Botticelli, E. Stellini, S.L.S. Souza, L.A. Salata, N.P. Lang, Magnesium-enriched hydroxyapatite at immediate implants: a histomorphometric study in dogs, *Clin. Oral Implant Res.*, 22 (2011), pp.512-517.
48. I.R. de Lima, G.G. Alves, C.A. Soriano, A.P. Campaneli, T.H. Gasparoto, E.S. Ramos, L.A. de Sena, A.M. Rossi, J.M. Granjeiro, Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite: an in vitro multiparametric study on biocompatibility, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*. 98A (2011), pp. 351-358.

49. M. Sader, R.Z. LeGeros, G.A. Soares, Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium-phosphate dense tablets, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 20 (2009), pp. 521-527.
50. G. Qi, S. Zhang, K.A. Khor, S.W. Lye, X. Zeng, W. Weng, C. Liu, S.S. Venkatraman, L.L. Ma, Osteoblastic cell response on magnesium-incorporated apatite coatings, *Appl. Surf. Sci.*, 255 (2008), pp. 304-307.
51. S. Kishi, M. Yamaguchi, Inhibitory effect of zinc-compounds on osteoclast-like cell-formation in mouse marrow cultures, *Biochem. Pharmacol.*, 48 (1994), pp. 1225-1230.
52. B.S. Moonga, D.W. Dempster, Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone-resorption in vitro, *J. Bone Miner. Res.*, 10 (1995), pp.453-457.
53. M. Yamaguchi, S. Uchiyama, Receptor activator of NF- κ B ligand-stimulated osteoclastogenesis in mouse marrow culture is suppressed by zinc in vitro, *Int. J. Mol. Med.*, 14 (2004), pp. 81-85.
54. M. Yamaguchi, M. Goto, S. Uchiyama, T. Nakagawa, Effect of zinc on gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells: enhancement of Runx2, OPG, and regucalcin mRNA expressions, *Mol. Cell. Biochem.*, 312 (2008), pp. 157-166.
55. M.A. Khadeer, S.N. Sahu, G. Bai, S. Abdulla, A. Gupta, Expression of the zinc transporter ZIP1 in osteoclasts, *Bone*, 37 (2005), pp. 296-304.
56. M. Yamaguchi, R. Yamaguchi, Action of zinc on bone metabolism in rats - increases in alkaline-phosphatase activity and DNA content, *Biochem. Pharmacol.*, 35 (1986), pp.773-777.
57. C. Ergun, T.J. Webster, R. Bizios, R.H. Doremus, Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. I. Structure and microstructure, *J. Biomed. Mater. Res.*, 59 (2002), pp. 305-311.
58. T.J. Webster, E.A. Massa-Schlueter, J.L. Smith, E.B. Slamovich, Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations, *Biomaterials*, 25 (2004), pp. 2111-2121.
59. Y. Sogo, A. Ito, K. Fukasawa, T. Sakurai, N. Ichinose, Zinc containing hydroxyapatite ceramics to promote osteoblastic cell activity, *Mater. Sci. Technol.*, 20 (2004), pp. 1079-1083.
60. F. Miyaji, Y. Kono, Y. Suyama, Formation and structure of zinc substituted calcium hydroxyapatite, *Mater. Res. Bull.*, 40 (2005), pp. 209-220.

61. F.Z. Ren, R.L. Xin, X. Ge, Y. Leng, Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites, *Acta Biomater.*, 5 (2009), pp. 3141-3149.
62. **C. Garbo**, M. Sindilaru, A. Carlea, G. Tomoaia, V. Almasan, I. Petean, A.Mocanu, O.Horovitz, and M.Tomoaia-Cotisel, Synthesis and structural characterization of novel porous zinc substituted nanohydroxyapatite powders, *Particul. Sci. Technol.*, 2015, DOI: 10.1080/02726351.2015.1121180.
- 63 F. Velard, D. Laurent-Maquin, J. Braux, C. Guillaume, S. Bouthors, E. Jallot, J.M. Nedelec, A. Belaouaj, P. Laquerriere, The effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils and bone implant-associated acute inflammation, *Biomaterials*, 31 (2010), pp.2001-2009.
64. R.J. Chung, M.F. Hsieh, C.W. Huang, L.H. Perng, H.W. Wen, T.S. Chin, Antimicrobial effects and human gingival biocompatibility of hydroxyapatite sol-gel coatings. *J. Biomed. Mater. Res., Part B.*, 76B (2006), pp. 169-178.
65. V. Stanic, S. Dimitrijevic, J. Antic-Stankovic, M. Mitric, B. Jokic, I.B. Plecas, S. Raicevic, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders, *Appl. Surf. Sci.*, 256 (2010), pp. 6083-6089.
66. D. Shepherd, Zinc-substituted hydroxyapatite for the inhibition of osteoporosis, in: M. Mucalo (Ed.) , *Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications*, Woodhead Publ.Elsevier, Amsterdam, (2015), pp. 107–126.
67. E.M. Carlisle, Silicon: a requirement in bone formation independent of vitamin D1, *Calcif. Tissue Int.*, 33 (1981), pp. 27-34.
68. I.R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield, Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44(1999), pp. 422-428.
69. T. Leventouri, C.E. Bunaciu, V. Perdikatsis, Neutron powder diffraction studies of silicon-substituted hydroxyapatite, *Biomaterials*, 24 (2003), pp. 4205- 4211.
70. C.M. Botelho, M.A. Lopes, I.R. Gibson, S.M. Best, J.D. Santos, Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 13 (2002), pp. 1123-1127.
71. Z.Y. Qiu, I.S. Noh, S.M. Zhang, Silicate-doped hydroxyapatite and its promotive effect on bone mineralization, *Front. Mater. Sci.*, 7(1) (2013), pp. 40-50.
72. G. Tomoaia, A. Mocanu, I. Vida-Simiti, N. Jumate, L.D. Bobos, O. Soritau, M. Tomoaia-Cotisel, Silicon effect on the composition and structure of nanocalcium phosphates. In vitro biocompatibility to human osteoblasts, *Mater. Sci. Eng. C*, 37 (2014), pp. 37-47.

73. A.F. Khan, M. Saleem, A. Afzal, A. Ali, A. Khan, A.R. Khan, Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*, 35 (2014), pp.245-252.
74. F. Balas, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, In vitro bioactivity of silicon substituted hydroxyapatites, *J. Biomed. Mater. Res.*, 66 (2003), pp. 364-375.
75. A.E. Porter, N. Patel, J.N. Skepper, S.M. Best, W. Bonfield, Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and Si-substituted hydroxyapatite bioceramics, *Biomaterials*, 24 (2003), pp. 4609-4620.
76. A.E. Porter, N. Patel, J.N. Skepper, S.M. Best, W. Bonfield, Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface, *Biomaterials*, 25 (2004), pp.3303-3314.
77. A.E. Porter, C.M. Botelho, M.A. Lopes, J.D. Santos, S.M. Best, W. Bonfield, Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 69A (2004), pp. 670-679.
78. K.A. Hing, P.A. Revell, N. Smith, T. Buckland, Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds, *Biomaterials*, 27 (2006), pp. 5014-5026. .
79. Q. Tang, R. Brooks, N. Rushton, S. Best, Production and characterization of HA and SiHA coatings, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21 (2010), pp. 173-181.
80. V. Aina, G. Lusvardi, B. Annaz, I.R. Gibson, F.E. Imrie, G. Malavasi, L. Menabue, G. Cerrato, G. Martra, Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 23 (2012), pp. 2867-2879.
81. A. Mocanu, G. Furtos, S. Rapuntean, O. Horovitz, C. Flore, **C. Garbo**, A. Danisteanu, G. Rapuntean, C. Prejmerean, M. Tomoaia-Cotisel, Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.*, 298 (2014), pp. 225-235.
82. G. Tomoaia, O. Soritau, M. Tomoaia-Cotisel, L.B. Pop, A. Pop, A. Mocanu, O. Horovitz, L.D. Bobos, Scaffolds made of nanostructured phosphates, collagen and chitosan for cell culture, *Powder Technol.*, 238 (2013), pp. 99-107.
83. J. Rouquerol, D. Avnir, C.W. Fairbridge, D.H. Everett, J.M. Haynes, N. Pernicone, J.D.F. Ramsay, K.S.W. Sing and K.K. Unger, *Pure and Applied Chemistry*, 66 (1994), pp. 1739-1758.

11. Articole publicate: lucrări premiate de UEFISCDI

Lucrări științifice proprii (cercetări originale); **două** lucrări premiate UEFISCDI **Factor de Impact total: 9.638 (5 year Journal Impact 10.352)**

1. A. Mocanu, R.D. Pasca, Gh. Tomoaia, **C. Garbo**, P. T. Frangopol, O. Horovitz and M. Tomoaia-Cotisel, "New procedure to synthesize silver nanoparticles and their interaction with local anesthetics", *Int. J. Nanomedicine*, **8**, (2013), pp. 3867-3874

2015 Impact Factor: **4.320 (5 year impact 5.034)**. Lucrare premiată UEFISCDI

2. G. Furtos, M. Tomoaia-Cotisel, **C. Garbo**, M. Șenilă, N. Jumate, I. Vida-Simiti, C. Prejmerean, "New composite bone cement based on hydroxyapatite and nanosilver", *Particulate Science and Technology*, **31** (4), (2013), pp. 392-398

2015 Impact Factor: **0.790**.

3. A. Mocanu, G. Furtos, S. Rapuntean, O. Horovitz, C. Flore, **C. Garbo**, A. Danisteanu, Gh. Rapuntean, C. Prejmerean, M. Tomoaia-Cotisel, „Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles", *Applied Surface Science*, **298**, (2014), pp. 225–235

2015 Impact Factor: **3.380**. Lucrare premiată UEFISCDI

4. **C. Garbo**, M. Sindilaru, A. Carlea, Gh. Tomoaia, V. Almasan, I. Petean, A. Mocanu, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, "Synthesis and structural characterization of novel porous zinc substituted nanohydroxyapatite powders" *Particulate Science and Technology*, DOI:10.1080/02726351.2015.1121180.

2015 Impact Factor: **0.790**.

5. P.T. Frangopol, A. Mocanu, V. Almasan, **C. Garbo**, R. Balint, G. Borodi, I. Bratu, O. Horovitz and M. Tomoaia-Cotisel, "Synthesis and structural characterization of strontium substituted hydroxyapatites", *Rev. Roum. Chim.*, **61**(4-5), (2016), pp. 339-346.

2015 Impact Factor: **0.210**.

6. A. Danisteanu, M. Gorea, A. Avram, S. Rapuntean, Gh. Tomoaia, A. Mocanu, **C. Garbo**, O. Horovitz, M. Tomoaia-Cotisel, "Antimicrobial activity of ceramic disks loaded with silver ions and nitroxoline", *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Chemia*, **61** (3), Tom I, (2016), pp. 275-283

2015 Impact Factor: **0.148**.

Articole în Proceedings

7. Gh. Tomoaia, O. Soritau, A. Mocanu, **C. Garbo**, M. Tomoaia-Cotisel, "Scaffolds made of nano hydroxyapatite, collagen and chitosan for improved

adhesion and bioactivity of osteoblasts,“ The 6th International Granulation Conference Proceedings”, Sheffield, UK, June 26-28, 2013, pp. 1-13.

Articole în reviste CNCSIS

8. S. Rapuntean, A. Pop, V. Miclaus, **C. Garbo**, F. Chirila, Gh. Rapuntean, N. Fiț, H. Farcău, M. Tomoaia-Cotisel, “Research concerning in vitro sensitivity of some microorganisms at hydroxyquinoline and cupric derivatives, deposited onto hydroxyapatite”, Bulletin UASVM, Veterinary Medicine 72(2)/2016; pISSN 1843-5270; eISSN 1843-5378.

12. Comunicări la Conferințe și Simpozioane: Postere premiate

1. Cristina Prejmerean, Ioan Petean, Aurora Mocanu, Gabriel Furtos, **Corina Garbo**, Moldovan Marioara, Maria Tomoaia-Cotisel, “*Surface structure of three bioadhesive systems with potential applications in dentistry. AFM investigations*”, 1st International Conference on Biological and Biomimetic Adhesives, COST Action TD 0906, School of Dentistry, University of Lisbon, Portugal, **9-11 May, 2012**.

2. Cristina Prejmerean, Ioan Petean, Aurora Mocanu, Gabriel Furtos, **Corina Garbo**, Moldovan Marioara, Maria Tomoaia-Cotisel, “*Surface morphology of some bioadhesives with potential applications in medicine. AFM investigation*”, The 32nd National Conference of Chemistry, Caciulata, **3-5 October, 2012**.

<http://conferinta.oltchim.ro/>

3. Valer Almășan, Mihaela Lazăr, Maria Tomoaia-Cotisel, Aurora Mocanu, **Corina Garbo**, Gheorghe Tomoaia, “*Modified nanostructured hydroxyapatite with medical applications*”, The 8th International Conference on Materials Science & Engineering – BRAMAT 2013, Brașov, **28 February – 2 March, 2013**.

<http://www2.unitbv.ro/bramat/Firstpage/tabid/8295/language/roRO/Default.aspx>

4. Valer Almasan, Mihaela D. Lazar, Gheorghe Tomoaia, Aurora Mocanu, **Corina Garbo**, Laura Ciupeiu, Camelia Ciobotariu, Adriana Andonie, Cristina Spelmezan, Liviu Dorel Bobos and Maria Tomoaia-Cotisel, “*Modified nanostructured hydroxyapatite with biological and biomedical applications*”, COST Action TD0906 “WG3 & WG4 Scientific Workshop Biological Adhesives: from Biology to Biomimetics”, Cluj-Napoca, **9-11 April, 2013**

5. Cristina Prejmerean, **Corina-Lacramioara Garbo**, Hodisan Ioana-Maria, Ancuta Danisteanu, Ioan Petean, Aurora Mocanu, Gabriel Furtos, Maria Tomoaia-Cotisel, “*Surface characterization of some bioadhesives with potential applications in medicine. AFM investigation*”, The 11th Conference on Colloid and Surface Chemistry – 11 CCSC, Iasi, **9-11 May, 2013**.

<http://www.icmpp.ro/events/conferences/ccsc2013.html>

6. Gheorghe Tomoaia, Olga Soritau, Aurora Mocanu, **Corina Garbo**, Maria Tomoaia-Cotisel, “*Scaffolds made of nano hydroxyapatite, collagen and chitosan for improved adhesion and bioactivity of osteoblasts*”, “The 6th International Granulation Workshop and Conference”, University of Sheffield, UK , **26-28 June, 2013**.

<https://www.sheffield.ac.uk/agglom/2013>

7. **Corina Garbo**, Ossi Horovitz, Aurora Mocanu, Valer Almasan, Gheorghe Borodi, Ioan Bratu, Maria Tomoaia-Cotisel, “*Effects of maturation conditions on the structure of hydroxyapatite nanopowder*”, The 5th Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems, Cluj-Napoca, **7-10 September, 2014**.

8. **Corina Garbo**, Aurora Mocanu, Valer Almasan, Balint Reka, Gheorghe Borodi, Ioan Bratu, Ossi Horovitz , Maria Tomoaia-Cotisel, “*Effects of preparation conditions and the presence of surfactant on the hydroxyapatite nanopowders*”, PIM 2015, Cluj-Napoca, **23 - 25 September, 2015**.

<http://pim.itim-cj.ro/>

9. Roxana-Diana Pasca, Gheorghe Tomoaia, Aurora Mocanu, Ioan Petean, **Corina Garbo**, Alexandra Gertrud Paltinean, Maria Tomoaia-Cotisel, “*The interaction between collagen, hydroxyapatite and APTES. Langmuir-Blodgett and AFM study*”, ICPAM 11, 11th International Conference on Physics of Advanced Materials, Cluj-Napoca, **8-14 September, 2016**; Poster premiat.

<https://www.icpam.ro/>

10. Ancuta Danistean, **Corina Garbo**, Reka Balint, Gheorghe Tomoaia, Aurora Mocanu, Sorin Rapuntean, Ossi Horovitz, Maria Tomoaia-Cotisel, “*Bioceramics comprising silver nanoparticles, as a new generation of antimicrobials*”, ICPAM 11, 11th International Conference on Physics of Advanced Materials, Cluj-Napoca, **8-14 September, 2016**.

<https://www.icpam.ro/>

13. Participări la cercetări contractuale

Este membră în echipa de cercetare a unor proiecte din Planul National 2: DONTAS nr. 171 și INOVAMAT nr. 241, precum și la proiectul international, NANOFOROSTEO nr. 4-005 din Platforma Europeană de Nanomedicină, care s-au realizat in Centrul de Chimie Fizică, Facultatea de Chimie si Inginerie Chimica, UBB, Director, Prof. Univ. Dr. Maria Tomoaia-Cotisel.

14. Membră în Societăți de Chimie și Centre de Cercetare

Este membră în Societatea de Chimie și în Centrul de Chimie Fizică, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, UBB.