



UNIVERSITATEA "BABES-BOLYAI", FACULTATEA DE FIZICA  
UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE "IULIU  
HATIEGANU", FACULTATEA DE MEDICINA



**ROZALIA VERES**

***Structura și proprietățile unor noi  
sisteme de interes biomedical***

*Rezumatul tezei de doctorat*

Coordonatori științifici:  
**Prof. Dr. Viorica SIMON**  
**Prof. Dr. Constantin CIUCE**

**Cluj-Napoca, 2013**

UNIVERSITATEA “BABES-BOLYAI”, FACULTATEA DE FIZICA  
UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE “IULIU HATIEGANU”,  
FACULTATEA DE MEDICINA

*Structura și proprietățile unor noi sisteme  
de interes biomedical*

*Rezumatul tezei de doctorat*

Doctorand:  
**Rozalia VERES**

Coordonatori stiintifici:  
**Prof. Dr. Viorica SIMON**  
**Prof. Dr. Constantin CIUCE**

**Cluj-Napoca, 2013**

## CUPRINS

<b>1. Introducere</b> .....	4
<b>2. Rezultatele experimentale ale investigării prin AFM a filmelor subțiri cu compoziția SiO<sub>2</sub>-ZnO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b> .....	5
2.1 Prepararea probelor.....	5
2.2 Caracterizarea probelor prin analiză termică.....	5
2.3 Caracterizarea structurală prin difracție cu raze X .....	6
2.4 Caracterizarea morfologică prin microscopie de forță atomică (AFM).....	6
<b>3. Rezultatele experimentale ale sticlelor bioactive cu și fără polyethylene-glycol (PEG)</b>	
3.1 Sinteza probelor .....	9
3.2 Caracterizarea probelor prin analiză termică.....	9
3.3 Caracterizarea structurală prin difracție cu raze X.....	9
3.4 Caracterizarea structurală prin spectroscopie FTIR.....	12
3.5 Proprietăți texturale obținute prin metoda BET.....	12
3.6 Testarea bioactivității.....	13
3.6.1 Difracție cu raze X.....	15
3.6.2 Spectroscopie FT-IR.....	16
3.7 Teste antibacteriene.....	17
3.8 Iradierea probelor .....	17
3.8.1 Spectroscopie FT-IR .....	17
3.8.2 Spectroscopie UV-vizibil .....	20
<b>4. Rezultatele experimentale ale structurilor suport macroporoase tridimensionale</b> .....	23
4.1 Pregătirea probelor.....	23
4.2 Caracterizarea probelor prin analiza termică.....	23
4.3 Caracterizarea structurală prin difracție cu raze X .....	26
4.4 Caracterizarea structurală prin spectroscopie FT-IR .....	29
4.5 Microscopie electronică de baleiaj (SEM) .....	30
4.6 Testarea bioactivității .....	32
4.6.1 Difracție cu raze X .....	32
4.6.2 Spectroscopie FT-IR .....	33
4.6.3 Microscopie electronică de baleiaj .....	35
4.7 Biocompatibilitate celulară .....	36
<b>Concluzii</b> .....	36
<b>Concluzii generale</b> .....	37
<b>Referințe</b> .....	39

## *Introducere*

Scopul acestei teze este de a sintetiza și caracteriza noi materiale preparate prin metoda sol-gel cu proprietăți adaptate pentru aplicații biomedicale în ingineria tisulară. Sticlele bioactive au atras o atenție semnificativă în ultimele decenii, iar în ultimii ani au fost incluse frecvent ca faze anorganice în biomaterialele compozite concepute ca structure support în ingineria tisulară. Aceste biomateriale au fost, de asemenea, utilizate în aplicații clinice ca acoperiri pentru implanturi, umplere osoasă și, într-o formă poroasă, pentru regenerarea osoasă [1-5]. Prin urmare, teza este axată pe obținerea și caracterizarea de filme subțiri din sticlă bioactivă, sticle bioactive mezoporoase preparate cu și fără polietilen-glicol și, de asemenea, structuri suport macroporoase tridimensionale vitroceramice.

Adăugarea oxidului de zinc în matricea fosfosilicatică a fost luată în considerare, deoarece este cunoscut faptul că zincul stimulează proliferarea celulelor, efectul său stimulator fiind demonstrat *in vivo* și *in vitro* [6, 7]. Tehnica sol-gel a fost aleasă pentru că, în comparație cu metoda prin topitură, aceasta oferă o mai bună omogenitate chimică, prelucrare la temperatură joasă și, de asemenea, permite controlul distribuției chimice a dimensiunii porilor [8]. O abordare alternativă care influențează structura și morfologia materialelor este încorporarea polyethilene-glicolului (PEG) în sol, în timpul sintezei probelor.

Teza este structurată în patru capitole, urmate de concluzii generale, lista de figuri, lista de tabele și anexe. Primul capitol tratează problemele fundamentale ale sticlelor bioactive și sistemelor vitroceramice pentru ingineria tisulară, care descriu rolul zincului și PEG-ului în sticlele preparate și, de asemenea, importanța porozității pentru aceste sisteme. Al doilea capitol descrie metoda sol-gel și metoda tiparului, în scopul de a obține probe macroporoase. Metodele experimentale și dispozitivele utilizate pentru sinteza probelor și caracterizarea lor sunt prezentate în capitolul al treilea. Al patrulea capitol descrie rezultatele experimentale obținute și discuțiile efectuate pe marginea acestora.

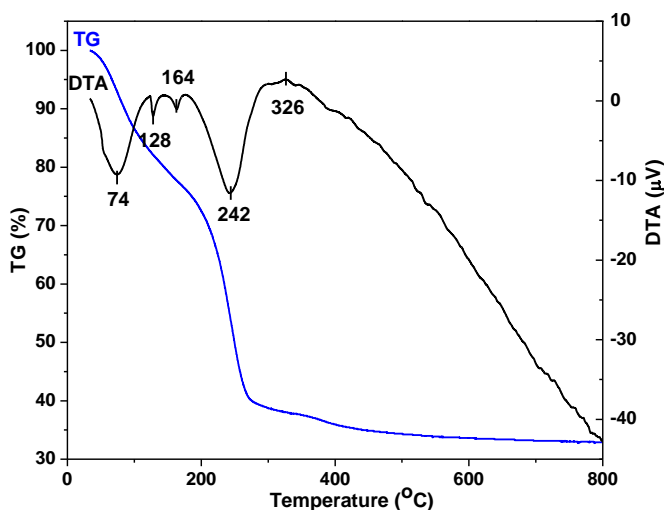
## 2. Rezultatele experimentale ale investigării prin AFM a filmelor subțiri cu compoziția $\text{SiO}_2\text{-ZnO-P}_2\text{O}_5$

### 2.1 Prepararea probelor

Noul sistem de biosticlă  $44.5\text{SiO}_2\text{-}11\text{ZnO}\text{-}44.5\text{P}_2\text{O}_5$  (mol %) a fost preparat prin metoda sol-gel. Precursorii folosiți au fost TEOS ( $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ), azotat de zinc hexahidrat ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) și fosfat de amoniu bibazic ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ). Ca și catalizator s-a folosit  $\text{HNO}_3$ . O parte din gel a fost folosit pentru obținerea filmelor subțiri (un volum de 125  $\mu\text{l}$  /strat) cu un Single Wafer Spin Processor (WS-400B-6NPP/LITE) pe suport de cuarț și a fost rotit cu 1500 rot/min. Cealaltă parte a gelului a fost uscat pentru 24 de ore la  $100^\circ\text{C}$ .

### 2.2 Caracterizarea probelor prin analiză termică

Suprafața filmului obținut prin tehnica acoperirii prin rotație pare să fie omogenă și netedă. Curbele TGA / DTA ale probei uscate la  $100^\circ\text{C}$  sunt prezentate în Figura 2.1.

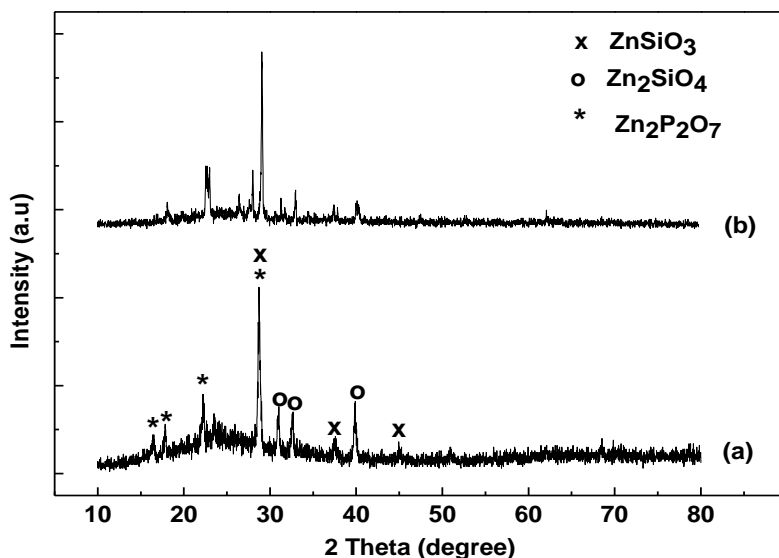


**Figura 2.1** Rezultatele DTA și TG pentru proba uscată din sistemul  $\text{SiO}_2\text{-ZnO-P}_2\text{O}_5$

Curba TG prezintă patru regiuni ale pierderii de masă. Prima pierdere de masă are loc în intervalul ( $35 - 123^\circ\text{C}$ ) (17,03%) și coincide cu un peak endotermic DTA care poate fi asociat cu eliminarea moleculelor libere de apă. Intervalul de temperatură ( $123\text{-}203^\circ\text{C}$ ) unde pierderea de masă este de aproximativ 11%, prezintă două peak-uri endotermice și poate fi legată de eliminarea moleculelor de apă adsorbite fizic pe suprafața probei. A treia pierdere de masă (33%) se poate observa în intervalul ( $203\text{-}297^\circ\text{C}$ ) ce corespunde cu un peak mare endoterm în curba DTA. Această pierdere poate fi asociată cu eliminarea apei încapsulate în pori. În al patrulea interval ( $330\text{-}500^\circ\text{C}$ ) are loc o pierdere mică de masă (3%) și semnalul DTA se diminuează constant care poate corespunde cu eliminarea nitraților din precursori.

### 2.3 Caracterizarea structurală prin difracție cu raze X

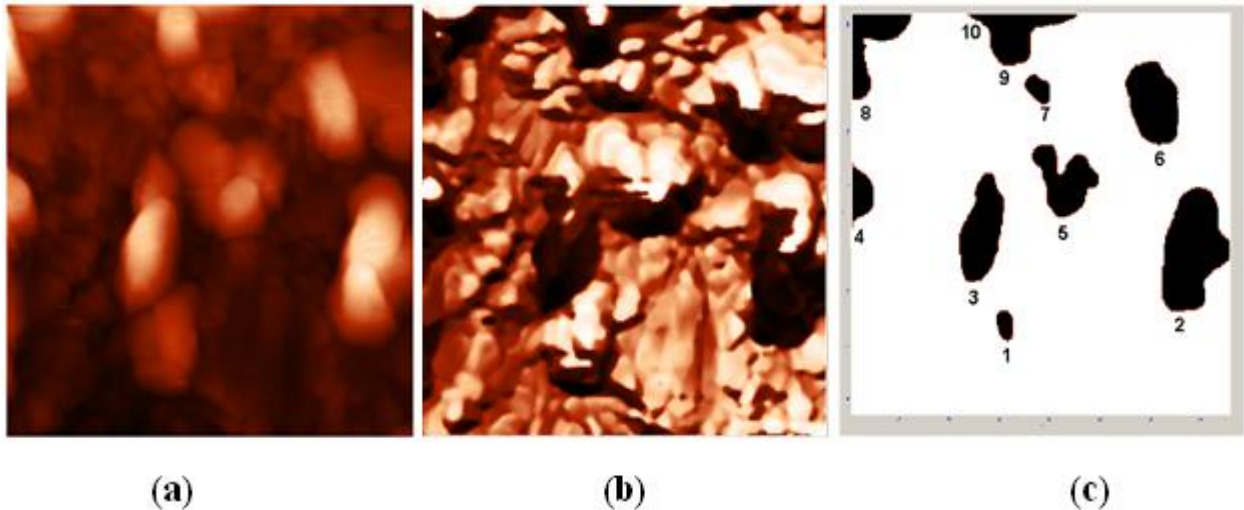
Difractogramele obținute pe filmul subțire și pe proba uscată la 100°C sunt ilustrate în Figura 2.2. Liniile de difracție ale filmului subțire prezintă o bună concordanță cu cele ale probei tratate termic (unghiul Bragg,  $2\theta$  a peak-urilor celor două difractograme sunt similare, cu o diferență mică în intensitate). Se poate observa că ambele probe sunt predominant amorfe. Pe lângă peak-ul mare de difracție care domină difractogramele, există peak-uri care indică prezența unei mici structuri cristaline care ar putea fi atribuite în primul rând prezenței cristalelor de azotat și fosfat rezidual. Pe de altă parte, este de menționat faptul că cristalite de tipul  $ZnSiO_3$ ,  $Zn_2SiO_4$  și  $Zn_2P_2O_7$  nu poate fi complet exclusă, deoarece ar putea contribui la reflecții foarte apropiate de aceleași unghiuri de difracție. Folosind ecuația Scherrer, dimensiunea cristalitelor a fost estimată la aproximativ 32,65 nm.



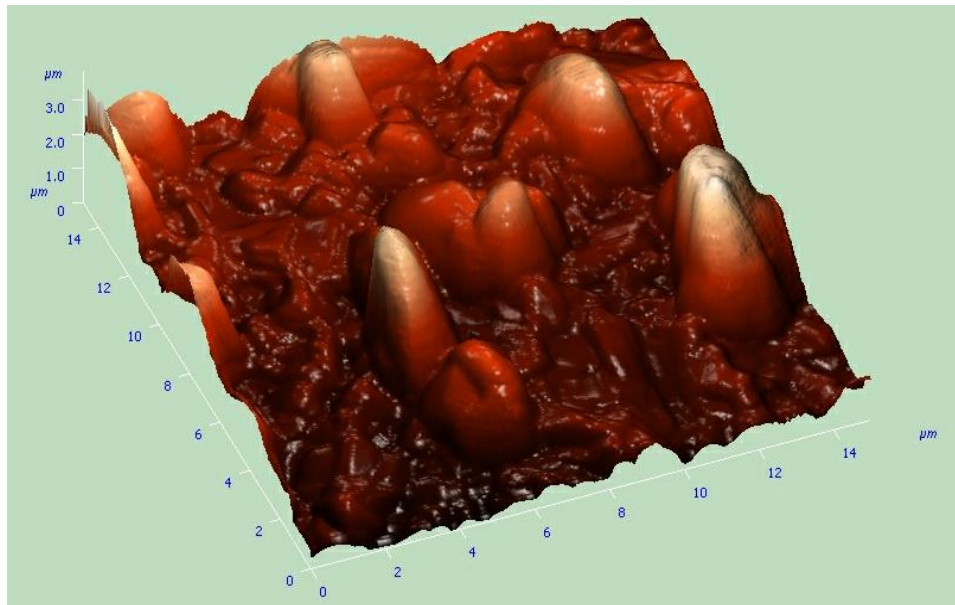
**Figura 2.2** Difractogramele filmelor subțiri (a) și ale probelor uscate la 100°C (b) din sistemul  $SiO_2-ZnO-P_2O_5$

### 2.4 Caracterizarea morfologică prin microscopie de forță atomică (AFM)

Morfologia suprafeței este bine evidențiată în imaginile AFM. Vizualizările bidimensionale (2D) și tridimensionale (3D) ale morfologiei suprafeței filmului subțire (scară de  $15\mu m \times 15\mu m$ ), sunt prezentate în Figura 2.3.a, respectiv Figura 2.4. Analiza lor denotă o suprafață eterogenă, rugoasă, care este de preferat pentru atașarea de biomolecule.



**Figura 2.3** Imaginea AFM bidimensională (2D) în modul semicontact (a), imaginea de fază (b), și rugozitățile corespunzătoare colectate (c) pentru filmul subțire.

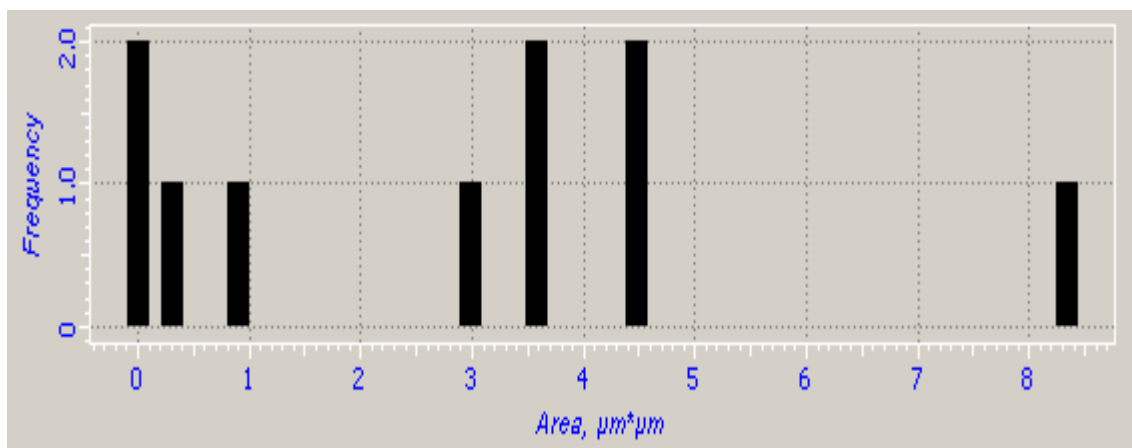


**Figura 2.4** Imagine AFM tridimensională, în modul semicontact.

Microscopia de forță atomică, în modul semicontact permite, de asemenea, afișarea imaginii de fază (Figura 2.3.b) și identificarea rugozităților (Figura 2.3.c). Principalii parametrii geometrici sunt calculați separat pentru fiecare rugozitate. Unele caracteristici ale rugozităților au fost obținute folosind soft-ul microscopului de forță atomică. Parametrii care includ aria rugozității, egală cu aria secțiunii, volumul și dimensiunea maximă a rugozității, înălțimile maxime și medii, perimetrul, împreună cu caracteristicile geometrice majore pentru fiecare rugozitate sunt cuprinse în Tabelul 2.1. Figura 2.5 prezintă histograma densității de distribuție a ariei rugozităților. Ariile a jumătate dintre rugozități sunt cuprinse între 3 și  $4,5 \mu\text{m}^2$ .

**Tabelul 2.1** Parametrii rugozităților prezentate în Figura 2.3.c

	Aria, $\mu\text{m}^2$	Vol. $\mu\text{m}^3$	Z, $\mu\text{m}$	Max Z, $\mu\text{m}$	Media Z, $\mu\text{m}$	Perim. $\mu\text{m}$	Diam, $\mu\text{m}$	Lung. $\mu\text{m}$	Lăț. med, $\mu\text{m}$	X, $\mu\text{m}$	Y, $\mu\text{m}$
Med.	3.253	7.056	0.787	2.458	2.023	8.176	1.824	3.176	0.824	1.882	2.471
SD	2.502	0.011	0.548	2.042	2.102	4.412	0.882	1.588	0.412	1.176	1.294
1	0.578	0.986	0.073	1.744	1.707	3.118	0.882	1.294	0.471	0.647	1.118
2	8.630	20.35	1.468	3.139	2.359	13.64	3.294	5.353	1.588	2.706	4.647
3	4.792	10.56	1.162	2.833	2.205	11.05	2.471	4.412	1.059	1.765	4.059
4	1.408	2.957	0.785	2.456	2.100	5.471	1.353	2.706	0.529	0.882	2.529
5	4.000	7.541	0.567	2.237	1.885	11.11	2.235	3.765	1.059	2.647	2.706
6	4.917	10.55	0.883	2.554	2.147	9.647	2.529	3.765	1.294	2.118	3.118
7	0.754	1.309	0.136	1.806	1.735	3.647	1.000	1.471	0.529	1.000	1.118
8	3.516	7.650	1.671	3.342	2.176	11.64	2.118	4.059	0.882	2.412	3.235
9	3.945	8.630	1.072	2.743	2.188	12.29	2.235	4.765	0.824	4.353	1.941
10	0.003	0.006	0.054	1.725	1.725	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059



**Figura 2.5** Histograma după arii.

### 3. Rezultatele experimentale ale sticlelor bioactive cu și fără polyethylene-glycol (PEG)

#### 3.1 Sinteza probelor

Sticla bioactivă din sistemul  $60\text{SiO}_2 \cdot (35-x) \text{CaO} \cdot x\text{ZnO} \cdot 5\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $0 \leq x \leq 10\%$  mol, cu patru raporturi molare diferite (Tabelul 3.1), este preparată prin metoda sol-gel.

**Tabelul 3.1** Compoziția nominală a sistemelor studiate

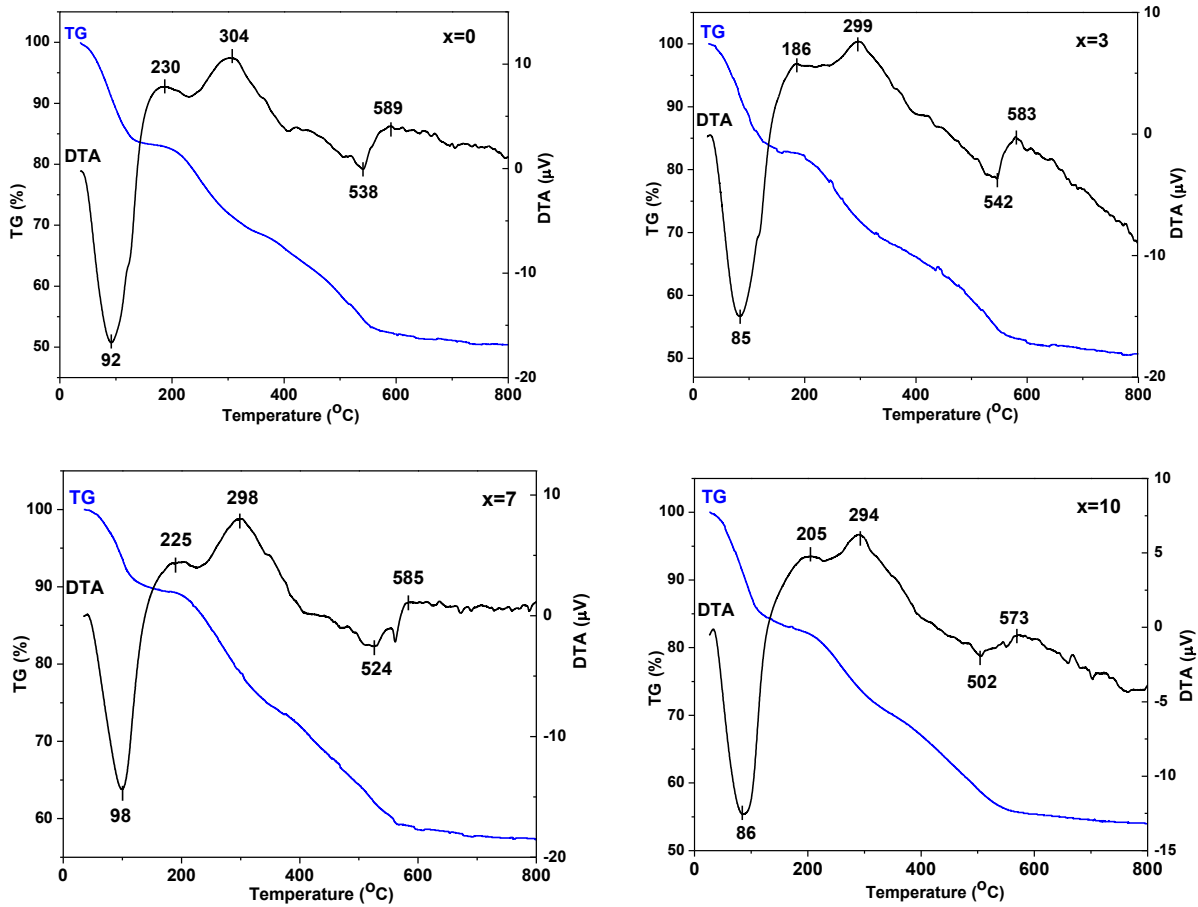
Sample	SiO2(mol%)	CaO(mol%)	P2O5(mol%)	ZnO(mol%)
<b>0%Zn</b>	60	35	5	0
<b>3%Zn</b>	60	32	5	3
<b>7%Zn</b>	60	28	5	7
<b>10%Zn</b>	60	25	5	10

Precursorii folosiți au fost tetraetil ortosilicat (TEOS), azotat de calciu tetrahidrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), trietil-fosfat (TEP) și azotat de zinc hexahidrat ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Ca și catalizator s-a utilizat  $\text{HNO}_3$ . În scopul de a obține probe cu PEG, s-a repetat experimentul anterior și astfel fiecărui sol i s-a adăugat PEG cu raport masic TEOS: PEG = 1: 0,25.

#### 3.2 Caracterizarea probelor prin analiză termică

Analiza termică diferențială (DTA) și analiză termogravimetrică (TG) au fost efectuate pe un derivatograf DTG-GOH de tip Shimadzu, cu scopul de a investiga comportarea termică a probelor uscate. Curbele TGA pentru toate probele preparate fără PEG prezenta mai multe regiuni cu pierdere de masă (Figura 3.1). În Tabelul 3.2 sunt prezentate temperaturile la care apar evenimente. Prima pierdere de masă, care se produce în jurul valorii de  $70^\circ\text{C}$ , coincide cu un pic endoterm în semnalul DTA și poate fi asociată cu eliminarea moleculelor de apă libere. O a doua pierdere de masă, cu mai multe peak-uri corespunzătoare în curba DTA, poate fi observată până în  $400^\circ\text{C}$ . Aceste pierderi pot fi asociate cu descompunerea azotatului de amoniu și eliminarea apei încapsulate în porii. Celelalte pierderi de masă sunt observate până la  $700^\circ\text{C}$ , care poate să corespundă înlăturării elementelor reziduale organice din precursorii rezultate în timpul sintezei probelor. Trebuie remarcat faptul că, în toate semnalele DTA, se observă un peak endoterm în jurul valorii de  $560^\circ\text{C}$ . Acest peak poate fi asociat cu dehidroxilarea sticlelor. Proba cu cea mai mare concentrație de zinc prezintă cea mai mică intensitate a acestui peak. Analiza termică indică

faptul că eliminarea elementelor reziduale au loc până la aproximativ 700°C, temperatură care poate fi considerată ca temperatură de tratament termic pentru probele uscate.

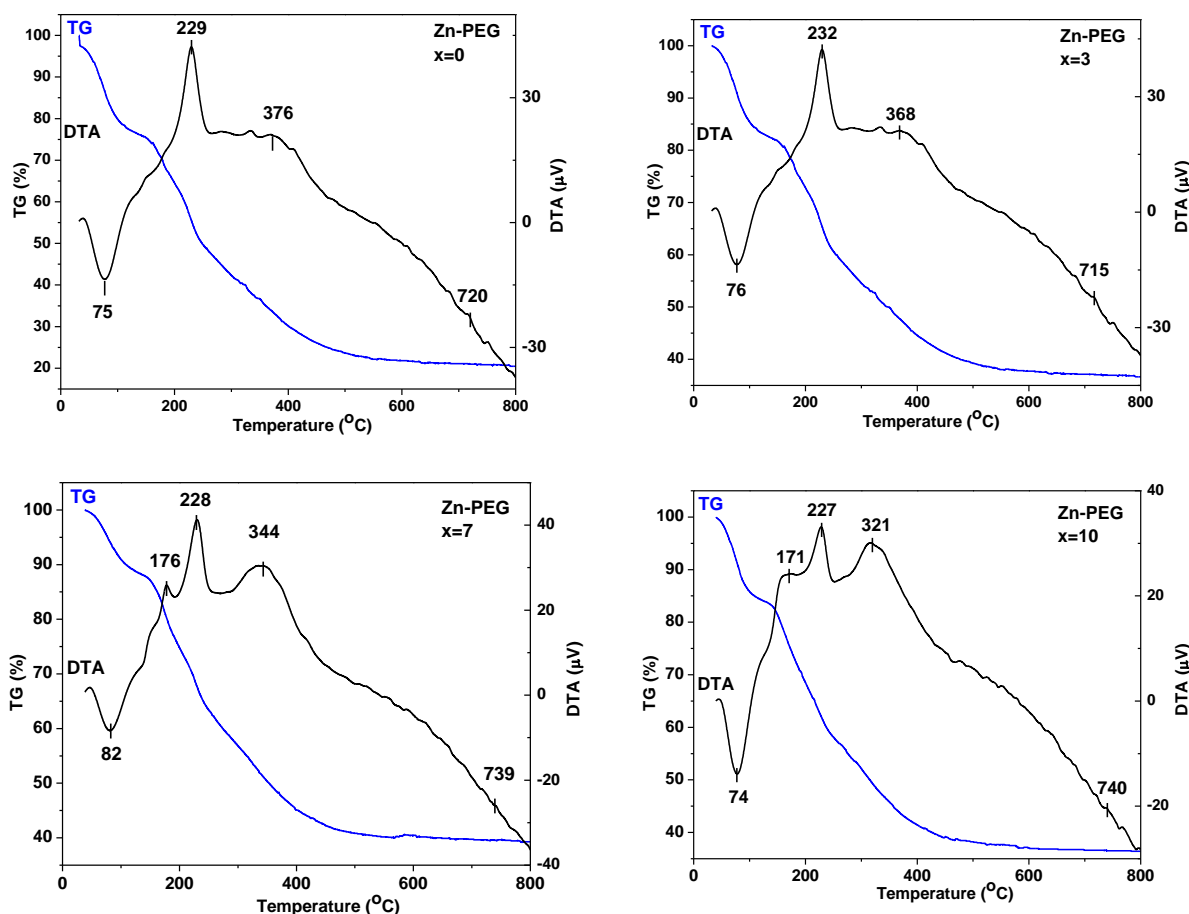


**Figura 3.1** Rezultatele DTA și TG pentru probele preparate prin metoda sol-gel fără PEG

**Tabelul 3.2** Temperatura evenimentelor și pierderile de masă pentru probele preparate fără PEG

Codul probei	Temperat. evenimentului endotermic (°C)	Temperat. evenimentului exotermic (°C)	Pierderea de masă (%)
x=0	92, 538	230, 304, 589	4.7, 18.2, 12.1
x=3	85, 542	186, 299, 583	4.2, 16.4, 11.5
x=7	98, 524	225, 298, 585	3.2, 15.7, 13.7
x=10	86, 502	205, 294, 573	4.5, 13.6, 12.8

Curbele TGA pentru toate probele preparate cu PEG prezintă mai multe regiuni cu pierdere de masă (Figura 3.2). În Tabelul 3.3 sunt prezentate temperaturile la care apare fiecare eveniment.



**Figura 3.2** Rezultatele DTA și TG pentru probele preparate prin metoda sol-gel cu PEG

**Tabelul 3.3** Temperatura evenimentelor și pierderile de masă pentru probele preparate cu PEG

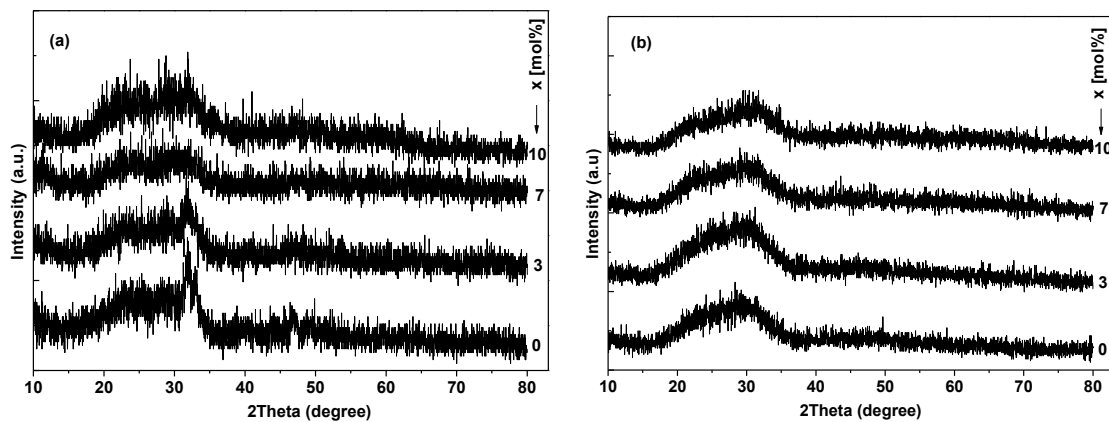
Codul probei	Temperat. evenimentului endotermic (°C)	Temperat. evenimentului exotermic (°C)	Pierdere de masă (%)
<b>x=0</b>	75	229, 376, 720	9.7, 17.2, 5.1
<b>x=3</b>	76	232, 368, 715	11.2, 15.6, 4.5
<b>x=7</b>	82	176, 228, 344, 739	8.2, 16.1, 4.7
<b>x=10</b>	74	171, 227, 321, 740	10.5, 14.9, 5.5

Prima pierdere de masă, care se produce în jurul valorii de 80°C, coincide cu un peak endoterm în semnalul DTA și poate fi asociată cu eliminarea moleculelor de apă liberă. O a doua pierdere de masă, cu mai multe peak-uri corespunzătoare în curba DTA, poate fi observată până în 400°C. Aceste pierderi pot fi asociate cu descompunerea PEG-ului și a azotatului de amoniu și cu eliminarea apei incapsulate în pori. Celelalte pierderi de masă sunt observate până la 700°C, care poate să corespundă înlăturării elementelor reziduale organice din precursorii rezultate în

timpul sintezei probelor. Analiza termică indică faptul că eliminarea elementelor reziduale are loc până la aproximativ 700°C, temperatură care poate fi considerată ca temperatură de tratament termic.

### 3.3 Caracterizarea structurală prin difracție cu raze X

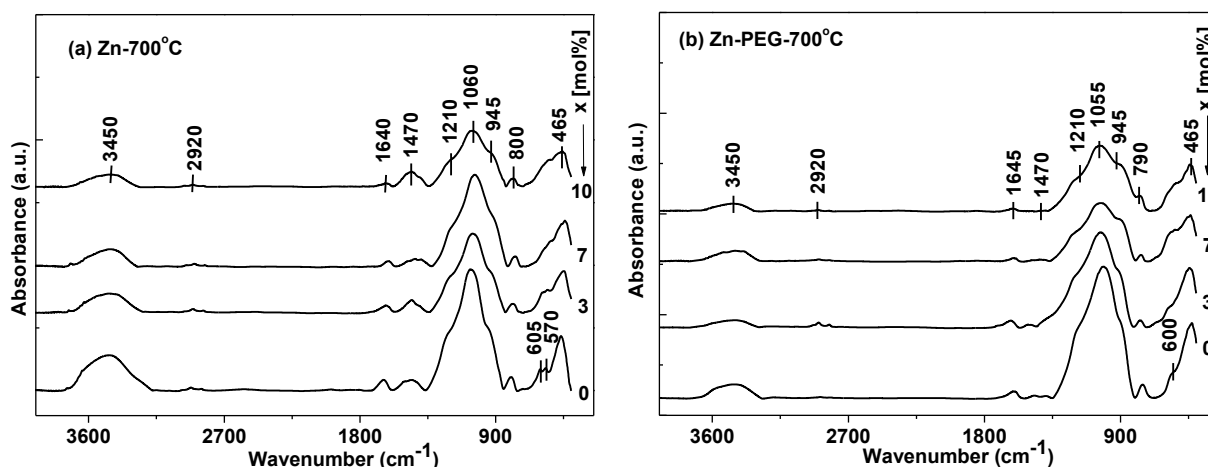
Structura sticlelor bioactive a fost caracterizată prin analiză de difracție de raze X (XRD) cu scopul de a evalua cristalinitatea probelor. În difractogramele probelor tratate termic la 700°C (Figura 3.3), sticlele sunt predominant amorfice indicând dezordinea internă și natura sticloasă a acestor materiale.



**Figura 3.3** Difractogramele pentru probele preparate fără (a) și cu (b) PEG.

### 3.4 Caracterizarea structurală prin spectroscopie FTIR

Spectrele FT-IR a sticlelor preparate fără PEG (Figura 3.4.a) pun în evidență prezența unui semnal larg corespunzătoare vibrației de întindere asimetrică Si-O-Si în intervalul spectral 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$ , care este compus dintr-o bandă intensă de absorbție centrată la 1060  $\text{cm}^{-1}$  și un umăr în jurul 1210  $\text{cm}^{-1}$ . O bandă caracteristică vibrației de întindere simetrică Si-O-Si și centrată la 800  $\text{cm}^{-1}$ , alături de un alt semnal de absorbție corespunzător vibrației de deformare Si-O-Si și identificat în intervalul de 500-400  $\text{cm}^{-1}$  poate fi, de asemenea, văzut în spectrele IR înregistrate [9-11]. Banda observată la 945  $\text{cm}^{-1}$  poate fi atribuită vibrației de întindere Si-O în structura tetraedrală  $\text{SiO}_4$  care conține un atom de oxigen nelegat (Si-O-NBO). În probele cu 0 și 3% zinc, poate fi observată prezența a două benzi situate în jurul valorii de 570 și 605  $\text{cm}^{-1}$ . Aceste semnale de absorbție sunt asociate vibrațiilor de deformare P-O și sunt caracteristice pentru faza cristalină a apatitei. Prezența lor este în bună concordanță cu rezultatele obținute prin XRD [12-14].



**Figura 3.4** Spectrele FT-IR ale sticlelor preparate fără (a) și cu (b) PEG

Banda văzută în intervalul  $1560\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$  este atribuită grupurilor  $(\text{CO}_3)^{2-}$ , care sunt prezente datorită carbonatării sticlelor cu calciu în  $\text{CO}_2$  atmosferic [15, 16]. Banda situată în jurul valorii de  $1640\text{ cm}^{-1}$  creșterea apei moleculare [17]. Mic nod situat în jurul valorii de  $2920\text{ cm}^{-1}$  poate fi asociat cu vibrațiile de întindere C-H. Banda observată în intervalul  $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  poate fi asociată cu apa moleculare [18]. Prin adăugarea progresivă de ZnO în sticle poate fi observată o scădere a intensității a benzilor de absorbție IR. Spectrele FT-IR a sticlelor preparate cu PEG (vezi Figura 3.4.b) arată aceleași benzi principale ca cele discutate anterior. Prin creșterea conținutului de zinc în sticle, poate fi văzută o scădere a intensităților benzilor.

### 3.5 Proprietăți texturale obținute prin metoda BET

Figura 3.5 indică izotermele de adsorbție-desorbție ale azotului ale probelor de sticlă preparate fără PEG și având patru compoziții diferite de zinc. Datele pentru toate probele preparate fără PEG prezintă o izotermă de tip IV, tipică pentru o structură mezoporoasă. Suprafețelor BET ale tuturor probelor de sticlă au unele modificări odată cu schimbarea compozițiilor chimice, dar toate probele au între  $70$  și  $129\text{ m}^2/\text{g}$  (Tabelul 3.4).

**Tabelul 3.4** Aria suprafețelor specifice pentru probelor obținute fără PEG

Proba	0%Zn	3%Zn	7%Zn	10%Zn
Volum specific de pori ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	0.42	0.32	0.19	0.09
Aria suprafeței specifice ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	129.00	111.71	89.47	70.11

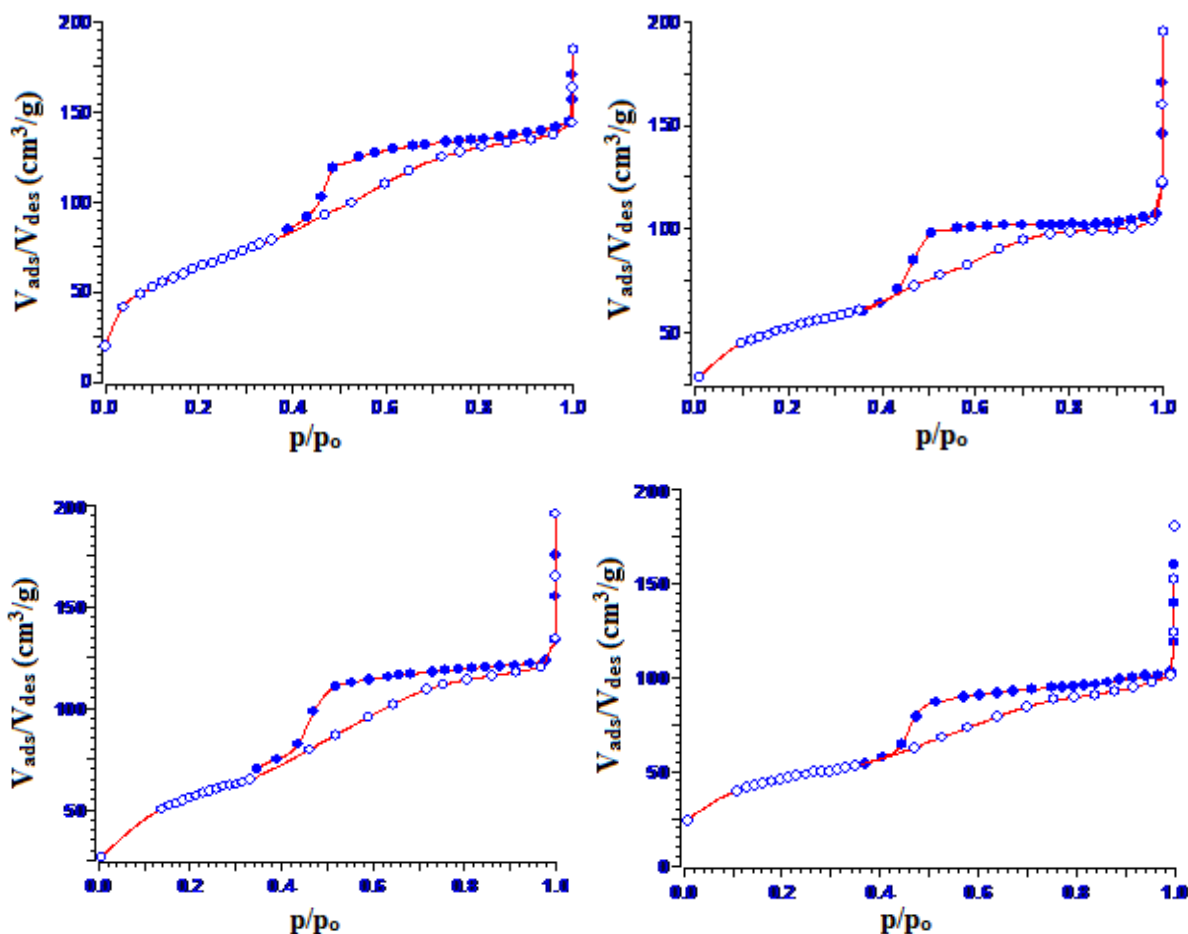
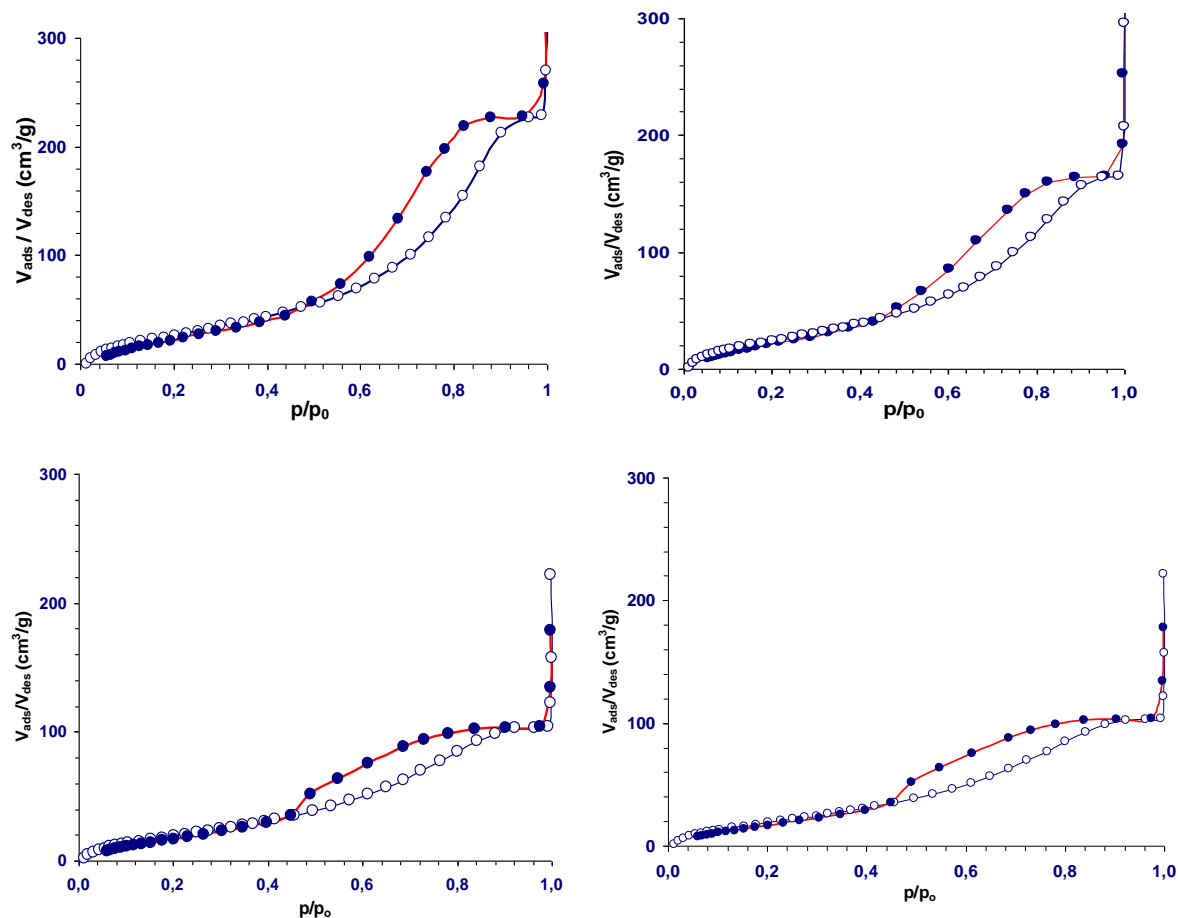


Figura 3.5 Izoterme de adsorbție-desorbție ale  $\text{N}_2$  pentru sticlele preparate fără PEG.

Datele pentru toate probele preparate cu PEG (Figura 3.6) prezintă o izotermă de tip IV, tipică pentru o structură mezoporoasă. Suprafețelor BET ale tuturor probelor de sticlă au avut unele modificări cu schimbarea compozițiilor chimice, dar toate probele ating 112-157  $\text{m}^2/\text{g}$ , (Tabelul 3.5).



**Figura 3.6** Izoterme de adsorbție-desorbție ale N<sub>2</sub> pentru sticlele preparate cu PEG.

**Tabelul 3.5** Aria suprafețelor specifice pentru probelor obținute cu PEG

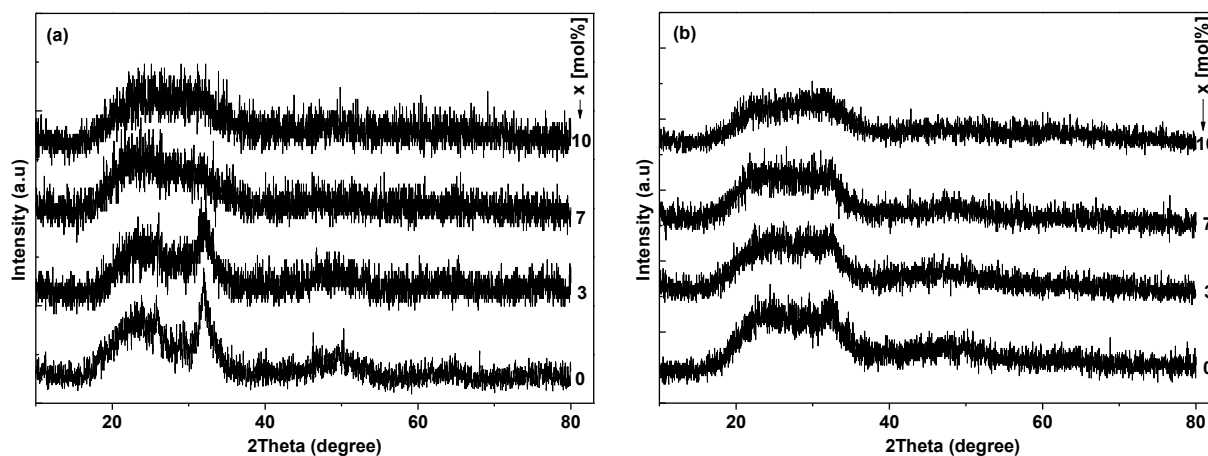
Proba	0%Zn-PEG	3%Zn-PEG	7%Zn-PEG	10%Zn-PEG
Volum specific de pori (cm <sup>3</sup> /g)	0.21	0.16	0.18	0.15
Aria suprafeței specifice (m <sup>2</sup> /g)	157.00	129.71	145.47	112.11

Se poate concluziona că ambele tipuri de probă prezintă o structură mezoporoasă, dar adaosul de PEG în timpul sintezei probelor a conferit suprafețe specifice mai ridicate.

### 3.6 Testarea bioactivității

#### 3.6.1 Difracție cu raze X

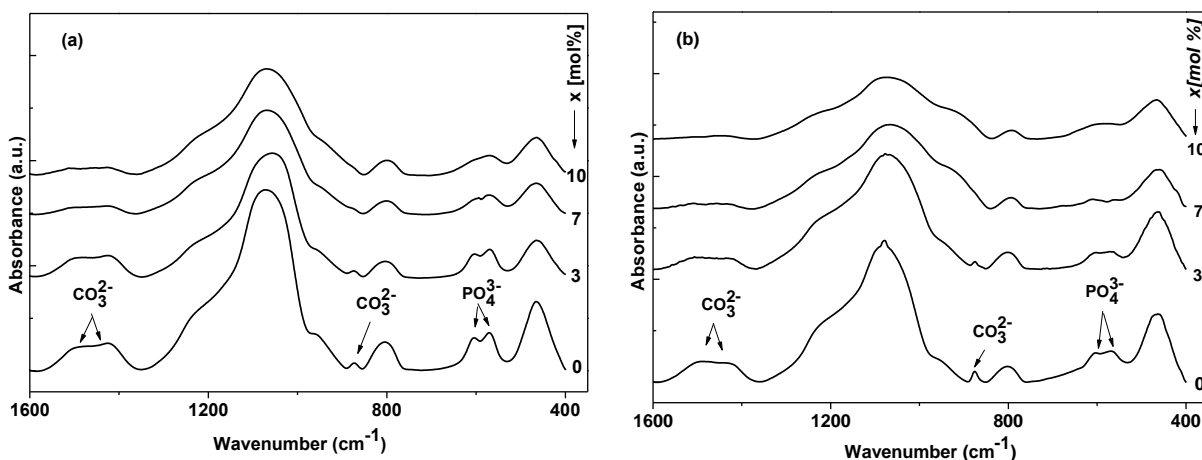
După imersarea probelor în SBF, o lărgire a peak-ului de difracție apare la 2θ cuprins între 31° și 34° (Figura 3.7). Acest peak ce corespunde cristalinității apatitei scade în intensitate odată cu creșterea conținutului de ZnO.



**Figura 3.7** Difractogramele pentru probele fără (a) și cu (b) PEG, după 14 zile de imersie în SBF

### 3.6.2 Spectroscopie FT-IR

După 14 zile de imersare în SBF benzile de absorbție de la  $605$  și  $570\text{ cm}^{-1}$  corespunzătoare grupărilor fosfat, împreună cu benzile de absorbție de la  $1482$ ,  $1428$ , și  $875\text{ cm}^{-1}$  ale grupărilor carbonat, care sunt în concordanță cu spectrele FT-IR ale HCA, scad în intensitate odată cu creșterea conținutului de ZnO (Figura 3.8). Se poate observa că adaosul de PEG, în timpul sintezei probelor, nu are nicio influență asupra bioactivității probelor tratate termic la  $700^\circ\text{C}$ .



**Figura 3.8** Spectrele FT-IR ale sticlelor preparate fără (a) și cu (b) PEG după 14 zile de imersie în SBF

### 3.7 Teste antibacteriene

Pentru testele antibacteriene, celulele tulpina *Escherichia coli* XL1 albastru au fost cultivate în mediu LB ON la 37°C. A doua zi, au fost numărate unitățile formatoare de colonii CFU (Tabelul 3.6). Pentru control negativ nu s-a adăugat nici o proba la cultura bacteriană. Rezultatele obținute (Figura 3.9) indică faptul că nu au avut loc modificări evidente pentru cele patru concentrații de zinc diferite comparativ cu proba de control. Se poate trage concluzia că aceste concentrații de zinc nu au nici un efect antibacterian și, astfel, sunt potrivite pentru testele de viabilitate celulară.

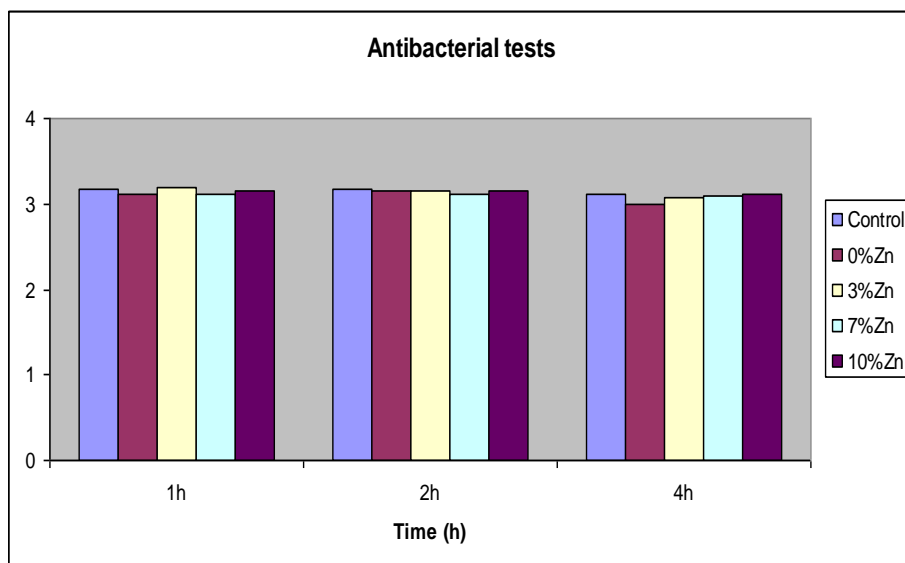


Figura 4.14 CFU în funcție de timp

Tabel 4.7 CFU după incubare cu sticlele studiate pentru diferite perioade de timp.

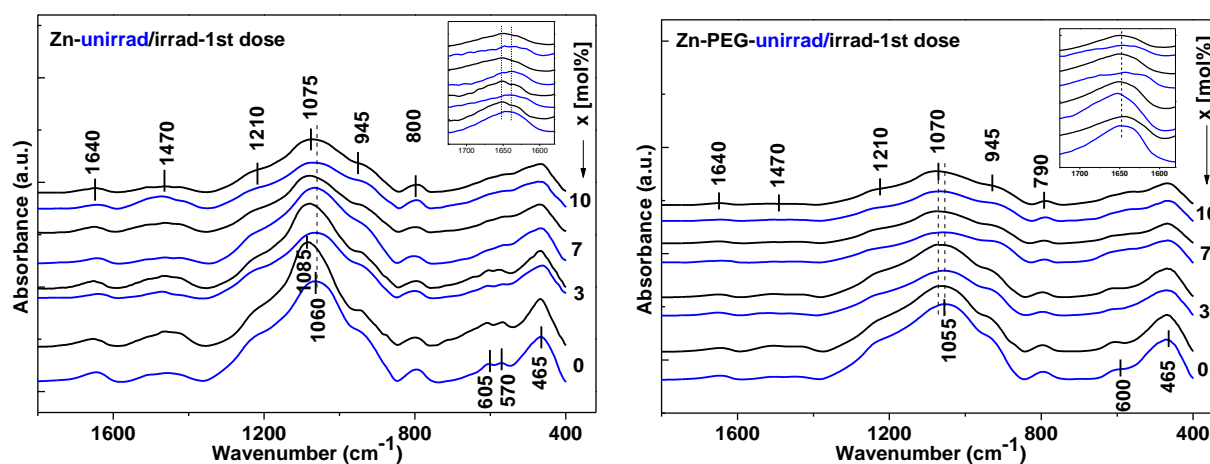
Durata(h)	Codul probei				
	Control	0%Zn	3%Zn	7%Zn	10%Zn
1	3,176091	3,103804	3,192846	3,12156	3,154424
2	3,164947	3,144263	3,158362	3,107888	3,143015
4	3,113943	3,001301	3,082426	3,084576	3,120903

### 3.8 Iradierea probelor

#### 3.8.1 Spectroscopie FT-IR

Ambele tipuri de probe, preparate cu și fără PEG, au fost expuse de două ori la radiații gamma și apoi investigate prin intermediul spectroscopie FT-IR. Fiecare probă de sticlă a fost supusă la o doză totală de 386 și 1169 Gy.

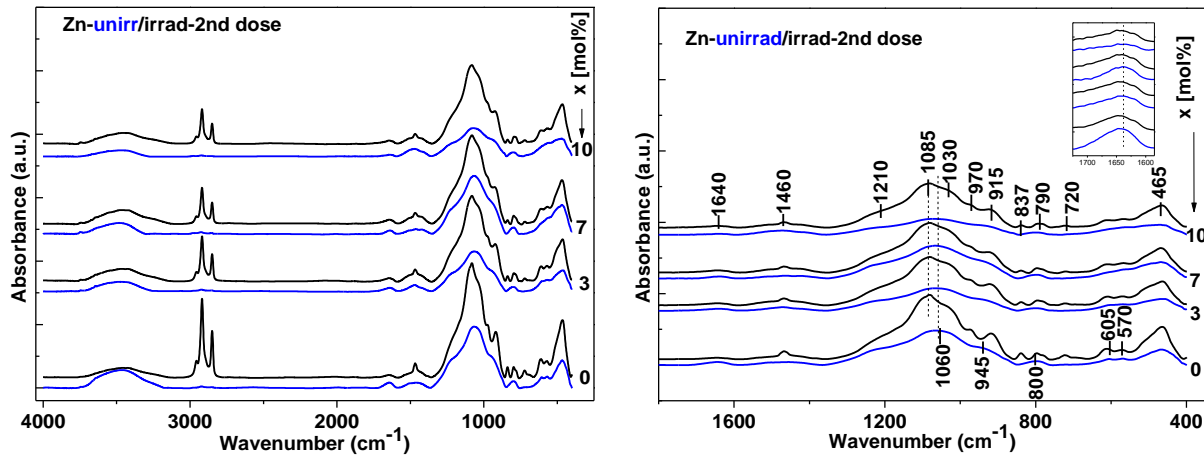
Spectrele IR ale sticlelor preparate fără PEG, expuse la prima doză de radiații gamma (386 Gy), prezintă mai multe modificări spectrale (Figura 3.10.a). Astfel, banda situată la  $1060\text{ cm}^{-1}$  în spectrul IR al sticlei fără zinc este deplasată spre numere de undă mai mari ( $1085\text{ cm}^{-1}$ ). Deplasarea acestui semnal de absorbție poate indica generarea de defecte induse de radiații, inclusiv schimbările în unghiul de legătură și/sau lungimii legăturilor ale legăturilor Si-O-Si [19]. Odată cu creșterea progresivă a concentrației ZnO, deplasarea poziției benzii de absorbție este mai mică. Comportamentul sticlelor poate fi explicat prin modificările structurale pe scurtă distanță survenite din cauza prezenței ionilor de  $\text{Zn}^{2+}$  care formează grupări structurale de forma  $\text{ZnO}_4$ , aceste unități ducând la consolidarea rețelei sticloase. De asemenea, iradierea gamma afectează benzile IR corespunzătoare apei ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ), prin deplasarea lor spre numere de undă mai mari. Acest comportament spectral este cu atât mai puțin pronunțat cu cât crește concentrația de zinc. Astfel, se poate concluziona că iradierea gamma a sticlelor obținute a determinat schimbări nu numai la benzile principale ca urmare a modificărilor survenite în interiorul unităților structurale  $\text{SiO}_4$ , dar și la componentele interstițiale. Pe de altă parte, adăugarea zincului în rețeaua sticloasă a conferit rezistență probelor împotriva iradiere gamma.



**Figura 3.10** Spectrele FT-IR a (386 Gy) sol-gel derivate sticlelor bioactive neiradiate și iradiate, fără (a) și cu PEG (b).

În cazul probelor preparate cu PEG, prima doză de iradiere (vezi Figura 3.10.b) provoacă unele mici modificări ale poziției benzii IR situate la  $1055\text{ cm}^{-1}$  și adăugarea treptată a ZnO pare să nu influențeze această deplasare. De asemenea, schimbările în poziția benzii corespunzătoare molecule de apă după iradiere gamma constă într-o schimbare foarte mică în direcția opusă celei care are loc pentru sticlele preparate fără PEG. Supunând probele de sticlă, preparate fără PEG, pentru a doua oară la iradiere gamma cu o doză totală de 1169 Gy, spectrele IR dezvăluie unele

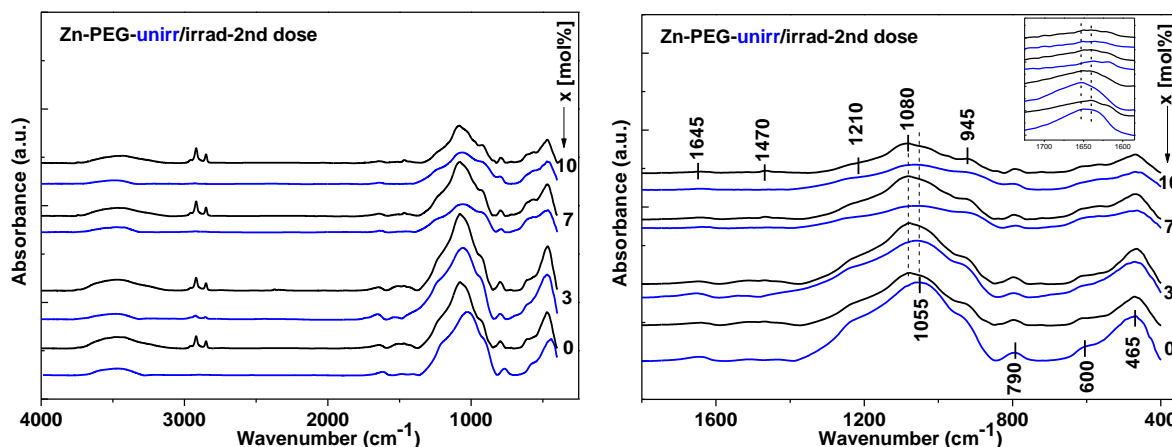
schimbări evidente (Figura 3.11.a și b). Modificările observate sugerează că a doua doză de radiație a provocat ruperea celor două tipuri de legături carbonat. În toate probele de sticlă iradiate spectrele arată prezența unor noi benzi.



**Figura 3.11** Spectrele FT-IR ale sticlelor bioactive neiradiate și iradiate(1169 Gy), preparate fără PEG, în intervalul 4000- 400  $\text{cm}^{-1}$  (a) și 1800 - 400  $\text{cm}^{-1}$  (b).

Apariția de noi benzi poate fi explicată prin faptul că prin creșterea dozei de iradiere, rețeaua silicatică și fosfatică sunt scindate ducând la formarea de mai mulți oxigeni nelegați în sticle. De asemenea, se poate observa că prin adăugarea succesivă de ZnO, se reduce intensitatea noilor benzi formate, confirmând ipoteza anterior că zincul consolidează rețeaua sticloasă.

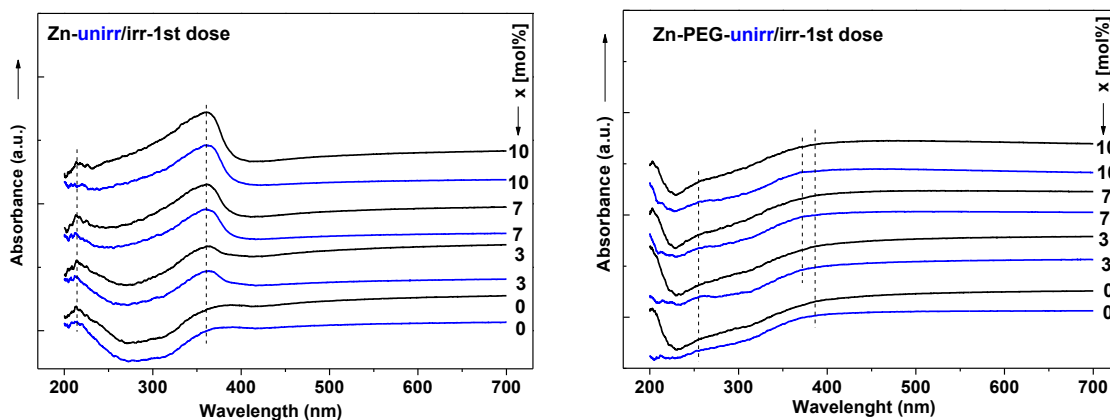
Pentru probele preparate cu PEG, a doua doză de iradiere nu a produs modificări prea mari (Figurile 3.12.a și b) Adaosul de PEG în timpul sintezei probelor a conferit rezistență sticlelor împotriva iradierii, menținând astfel stabilitatea rețelei de sticlă. În concluzie, prin creșterea dozei de iradiere, ionii de  $\text{Zn}^{2+}$  și-au pierdut capacitatea de a consolida rețeaua sticloasă. De asemenea, se constată că efectul iradierii gamma în cazul sticlelor preparate cu PEG este mult mai mic decât în cazul sticlelor preparate fără PEG.



**Figura 3.12** Spectrele FT-IR ale sticlelor bioactive neiradiate și iradiate (1169 Gy) preparate cu PEG, în intervalul 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  (a) și 1800 - 400  $\text{cm}^{-1}$  (b).

### 3.8.2 Spectroscopie UV-vizibil

Spectrele de absorbție în UV-vizibil a sticlelor preparate fără PEG, înainte și după prima doză de iradiere, sunt ilustrate în Figura 3.13.a. Înainte de prima doză de iradiere, spectrul sticlei nedopate evidențiază o puternică bandă de absorbție UV centrată la aproximativ 215 nm și o curbă, care începe în jurul valorii de 360 nm, la care nivelul de absorbție al probei este considerabil crescut. După adaosul de ZnO, semnalul UV observat la energii mai mari la proba nedopată, începe să scadă în intensitate și devine doar un nod pentru cea mai mare concentrație de zinc. Banda de absorbție situată la aproximativ 360 nm devine mult mai bine definită pe măsură ce crește conținutul de zinc, dar în același timp, semnalul de absorbție înregistrat în domeniul spectral vizibil, de exemplu 400-600 nm, scade progresiv în intensitate.

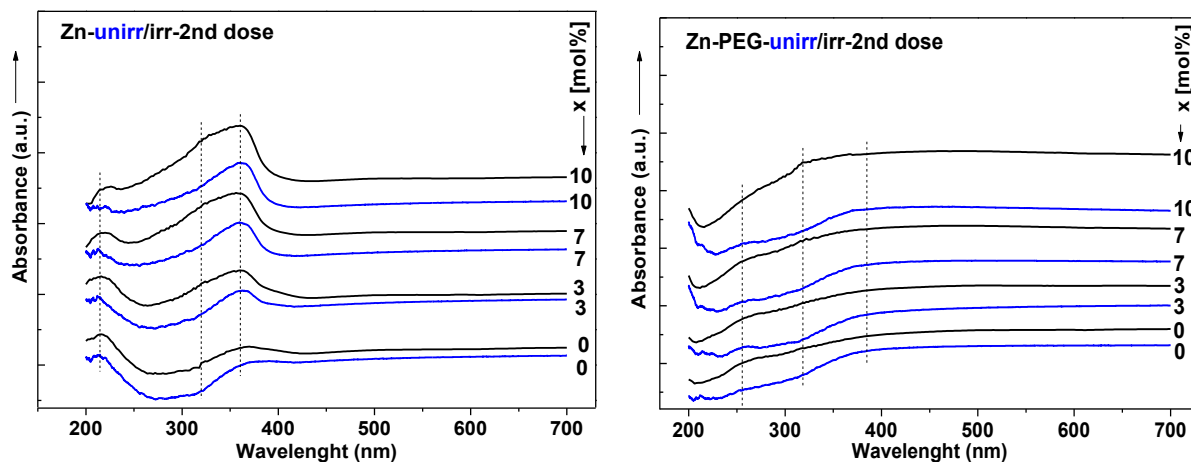


**Figura 3.13** Spectrele UV-vizibil pentru probele sticloase preparate fără (a) și cu PEG (b), înainte și după iradiere gamma (386 Gy).

Prima doză de iradiere gamma a avut efect doar asupra ionilor de fier, cantitatea de oxigeni nelegați formată prin introducerea zincului în matricea de sticlă a rămas neafectate. Spectrele de absorbție UV-vizibil al probelor preparate cu PEG, înainte și după prima doză de raze iradiere gamma, sunt ilustrate în figura 3.13.b. În cazul probelor înainte de iradiere, sticla nedopată relevă o mică bandă de absorbție UV centrată la circa 214 nm, un umăr în jurul valorii de 260 nm și o curbura la 385 nm. După adăugarea ZnO, mica bandă UV observată la 214 nm în proba nedopată, începe să modifice și pentru cea mai mare concentrație de zinc devine un umăr. Umărul situat în jurul valorii de 260 nm devine mai pronunțat pe măsură ce conținutul de zinc este mai mare. Curbura situată în jurul valorii de 385 nm în proba nedopată, este ușor deplasată spre lungimi de undă mai mici după adăugarea de zinc și semnalul de absorbție înregistrat pe domeniul spectral vizibil scade în intensitate. Supunând sticlele la o doză totală de 386 Gy, spectrul UV pentru proba nedopată evidențiază un peak de absorbție ascuțit la aproximativ 200 nm, doi umeri la aproximativ 225 nm și 260 nm și o curbura la aproximativ 395 nm. Prin adăugarea de ZnO, banda ascuțită UV observată în proba nedopată la aproximativ 200 nm, pare să-și schimbe intensitatea odată cu creșterea concentrație de zinc. De fapt, aceste modificări ale formei benzii sunt cauzate de creșterea progresivă a absorbției a semnalului înregistrat între 200 și 210 nm odată cu adaosul de zinc. Umărul situat la aproximativ 225 nm scade în intensitate, în timp ce umărul situat la 260 nm devine mai bine definite. Curbura centrată la 395 nm în proba nedopată pare a fi deplasată spre lungimi de undă mai mici cu creșterea conținutului de zinc. Spectrul probelor iradiate relevă modificări ne semnificative în domeniul spectral vizibil, unde semnalul de absorbție este semnificativ. Analiza absorbției înregistrate pe domeniile UV și vizibil, înainte și după iradiere, arată în mod clar un comportament diferit, pe măsură ce crește conținutul de zinc, pentru cele două serii de probe. Așa cum am menționat, pentru probele înainte de iradiere, semnalului UV crește în intensitate și cel vizibil descrește cu adaosul de zinc, în timp ce, după iradiere, semnalul UV scade încet și cel vizibil este aproape constant.

După a doua doză de iradiere (figura 3.14.a), probele preparat fără și cu PEG arată benzi de absorbție atribuite prezenței impurităților de fier din cauza contaminării inevitabile alături la spectrele de absorbție care corespund formării de oxigeni nelegați datorati prezenței modificatorilor de rețea, în special a zincului. Adăugarea progresivă de zinc în cele două tipuri de eșantioane produce efecte diferite asupra formării benzilor de absorbție UV. Pentru probele preparate fără PEG, are loc o creștere în intensitate a benzilor UV în timp ce, pentru probele preparate cu PEG modificarea constă în deplasarea benzilor odată cu creșterea conținutului de

zinc. De asemenea, se constată că iradiere gamma în cazul probelor preparate fără PEG a produs o lărgire a benzilor, în timp ce pentru probele preparate cu PEG efectul a fost deplasarea benzilor. Se poate concluziona că adăugarea PEG-ului în timpul sintezei probelor a conferit rezistență acestora împotriva iradierii, menținând astfel stabilitatea rețelei de sticlă, rezultate care le confirmă pe cele obținute din analiza FT-IR.

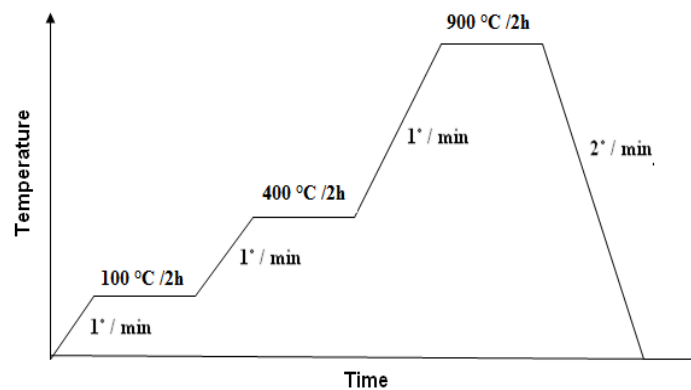


**Figura 3.14** Spectrele UV-vizibil pentru probele sticloase preparate fără (a) și cu PEG (b), înainte și după iradiere gamma (1169 Gy).

## 4. Rezultatele experimentale ale structurilor support macroporoase tridimensionale

### 4.1 Pregătirea probelor

Sistemul vitroceramic  $60\text{SiO}_2 \cdot (35-x) \text{CaO} \cdot x\text{ZnO} \cdot 5\text{P}_2\text{O}_5$  cu  $x = 0, 3, 7, 10\%$  mol este preparat prin metoda sol-gel. Precursorii utilizați au fost tetraetil ortosilicat (TEOS),  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ , trietil-fosfat (TEP) și azotat de zinc hexahidrat ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Catalizatorul utilizat a fost  $\text{HNO}_3$ . PEG cu masa moleculară 200, de la Alfa Aesar, a fost adăugat la solul obținut. Bureți din poliuretanan (PU), caracterizate printr-o rețea 3D de macropori au fost imersate în soluțiile rezultate, iar apoi au fost scoase, stoarse și lăsate să se usuce pe o suprafață netedă timp de 24 ore la temperatura camerei. Procesul a fost repetat de cinci ori, urmat de un tratament termic pentru arderea polimerului și sinterizarea structurii suport finale (vezi Figura 4.1).



**Figura 4.1** Schema tratamentului termic urmat pentru a atinge substraturile finale

### 4.2 Caracterizarea probelor prin analiza termică

Analiza termică diferențială (DTA) și analiză termogravimetrică (TG) au fost efectuate în scopul de a investiga comportamentul termic al substraturilor uscate la  $100^\circ\text{C}$  și să se evalueze temperatura de tratament termic al probelor în scopul de a obține structurile support finale.

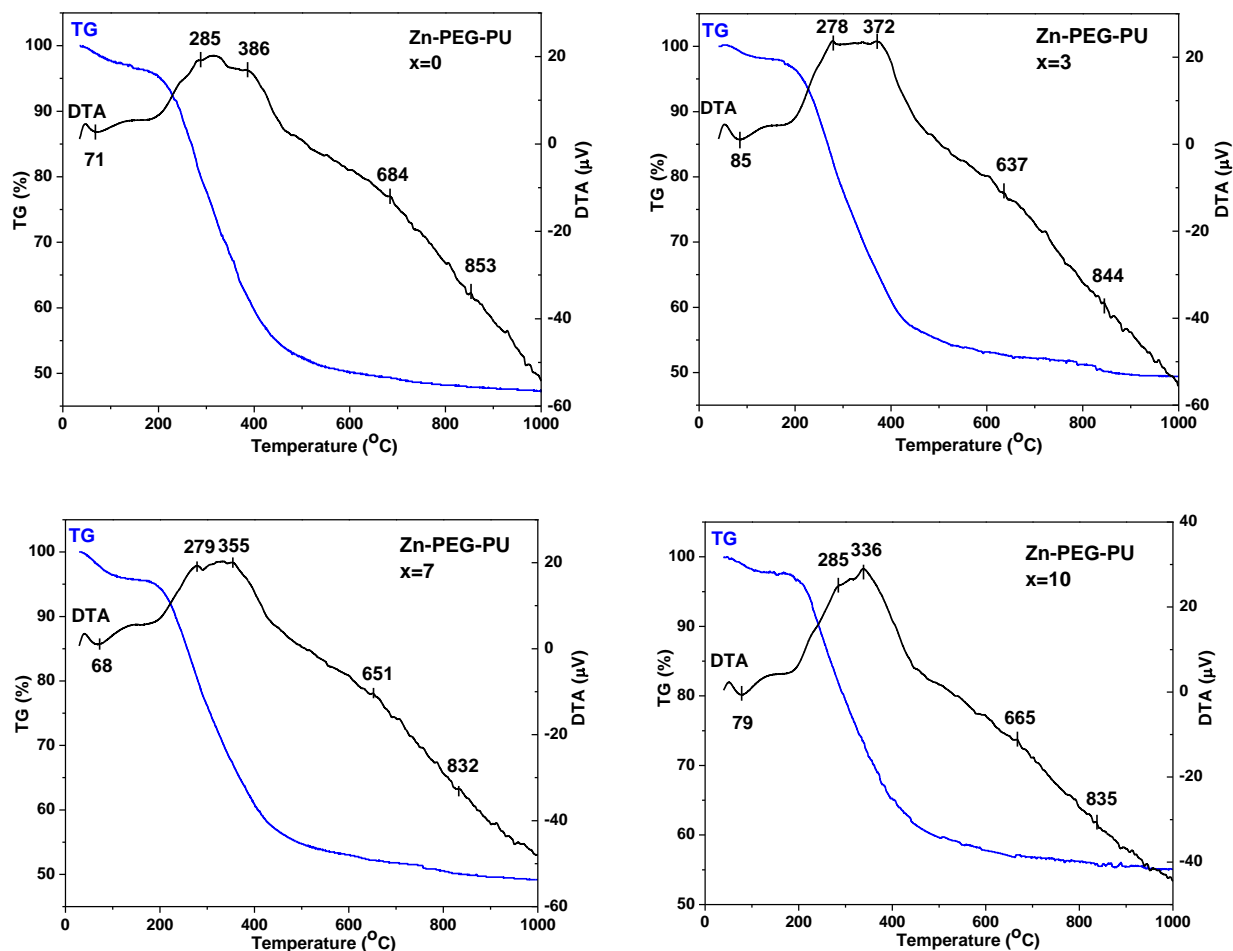


Figura 4.2 Analiza DTA și TG a probelor obținute cu adaos de PEG (Zn-PEG-PU)

Tabelul 4.1 Temperatura evenimentelor și pierderile de masă pentru scaffoldurile preparate cu PEG

Codul probei	Temperat. evenimentului endotermic (°C)	Temperat. evenimentului exotermic (°C)	Pierderea de masă (%)
Zn-PEG-PU, x=0	71, 684	285, 386, 853	3.5, 45.7, 3.1
Zn-PEG-PU, x=3	85, 637	278, 372, 844	2.2, 41.1, 6.9
Zn-PEG-PU, x=7	68, 651	279, 355, 832	4.1, 38.9, 7.4
Zn-PEG-PU, x=10	79, 665	285, 336, 835	1.9, 37.9, 4.6

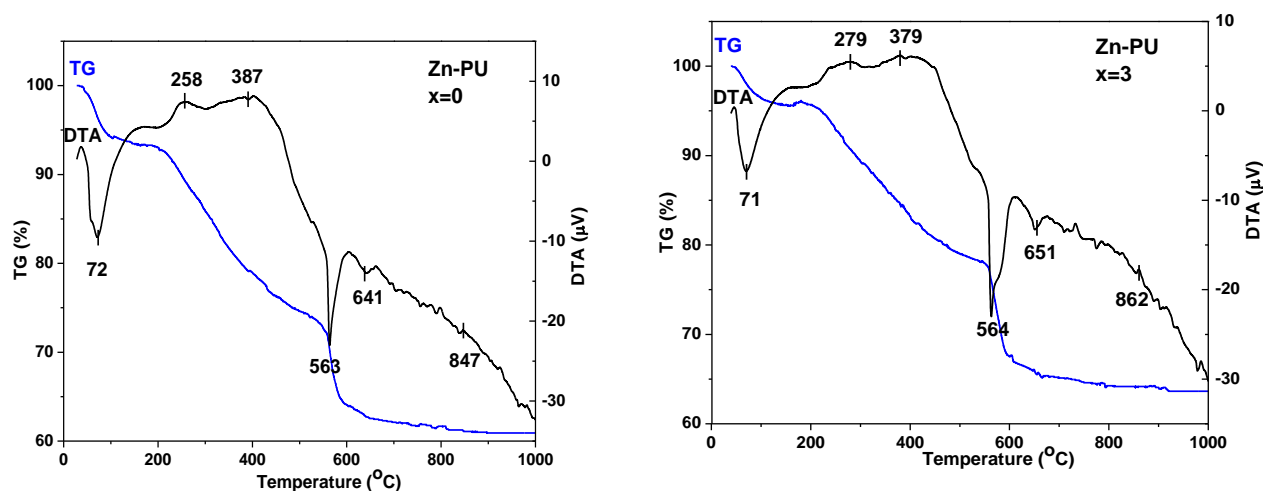
Curbele TG pentru probele preparate cu PEG prezintă mai multe regiuni cu pierdere de masă (Figura 4.2). În tabelul 4.1 sunt prezentate temperaturile la care apar evenimente. Prima

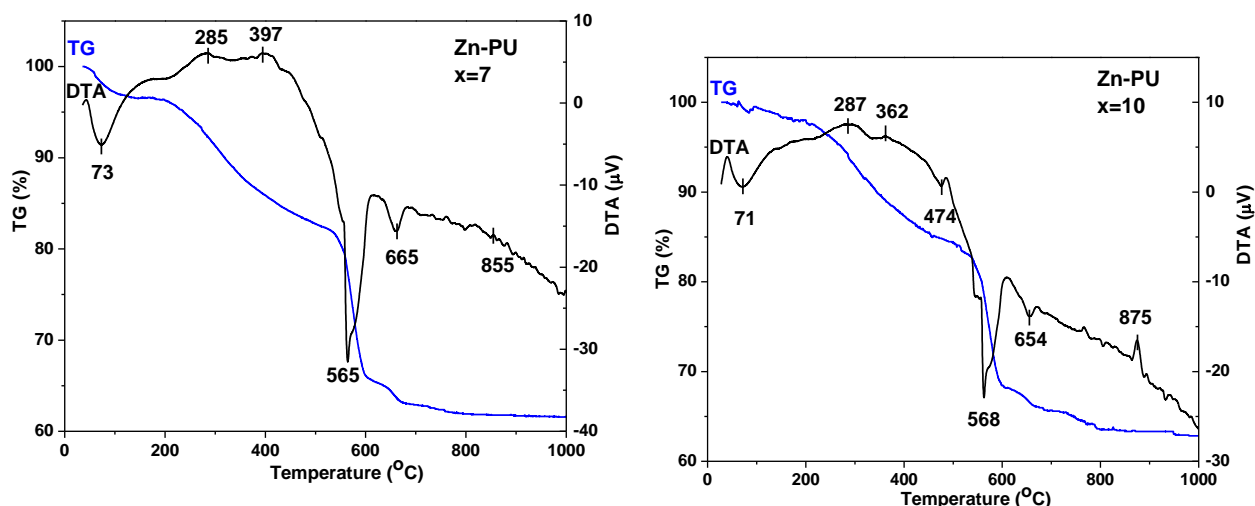
pierdere de masă, care se produce în jur de 65-85°C, coincide cu un pic endoterm în semnalul DTA și poate fi asociată cu îndepărtarea moleculelor de apă libere. O a doua pierdere de masă cu mai multe peak-uri corespunzătoare în curba DTA poate fi observată până în 400 ° C. Această pierdere poate fi asociată cu descompunerea poliuretanului și PEG-ului și eliminarea apei încapsulate în pori. Pierderi de masă se mai pot observa până 800 ° C și corespund cu eliminarea grupărilor reziduale organice din precursorii folosiți în sinteza probelor. Analiza termică indică, de asemenea, faptul că temperatura de cristalizare a probelor se produce în intervalul de 830-860 °C, evidențiat printr-un peak exoterm în curba DTA. Structurile vitroceramice pot fi obținute până la 900 ° C, care poate fi astfel considerată ca temperatură de tratament termic.

Curbele TG pentru probele preparate fără PEG prezenta mai multe regiuni cupierdere de masă (Figura 4.3). În tabelul 4.2 sunt prezentate temperaturile la care apar evenimente.

**Tabelul 4.2** Temperatura evenimentelor și pierderile de masă pentru scaffoldurile preparate fără PEG

Codul probei	Temperat.eventimentului endotermic (°C)	Temperat.eventimentului exotermic (°C)	Pierdere de masă (%)
Zn-PU, x=0	72, 563, 641	258, 387, 847	5.7, 20.1, 10.1, 1.9
Zn-PU, x=3	71, 564, 651	279, 379, 862	3.8, 17.5, 12.3, 2.4
Zn-PU, x=7	73, 565, 665	285, 397, 855	3.5, 14.2, 16.8, 3.7
Zn-PU, x=10	71, 474, 568, 654,	287, 362, <sup>875</sup>	4.6, 11.4, 14.9, 4.5





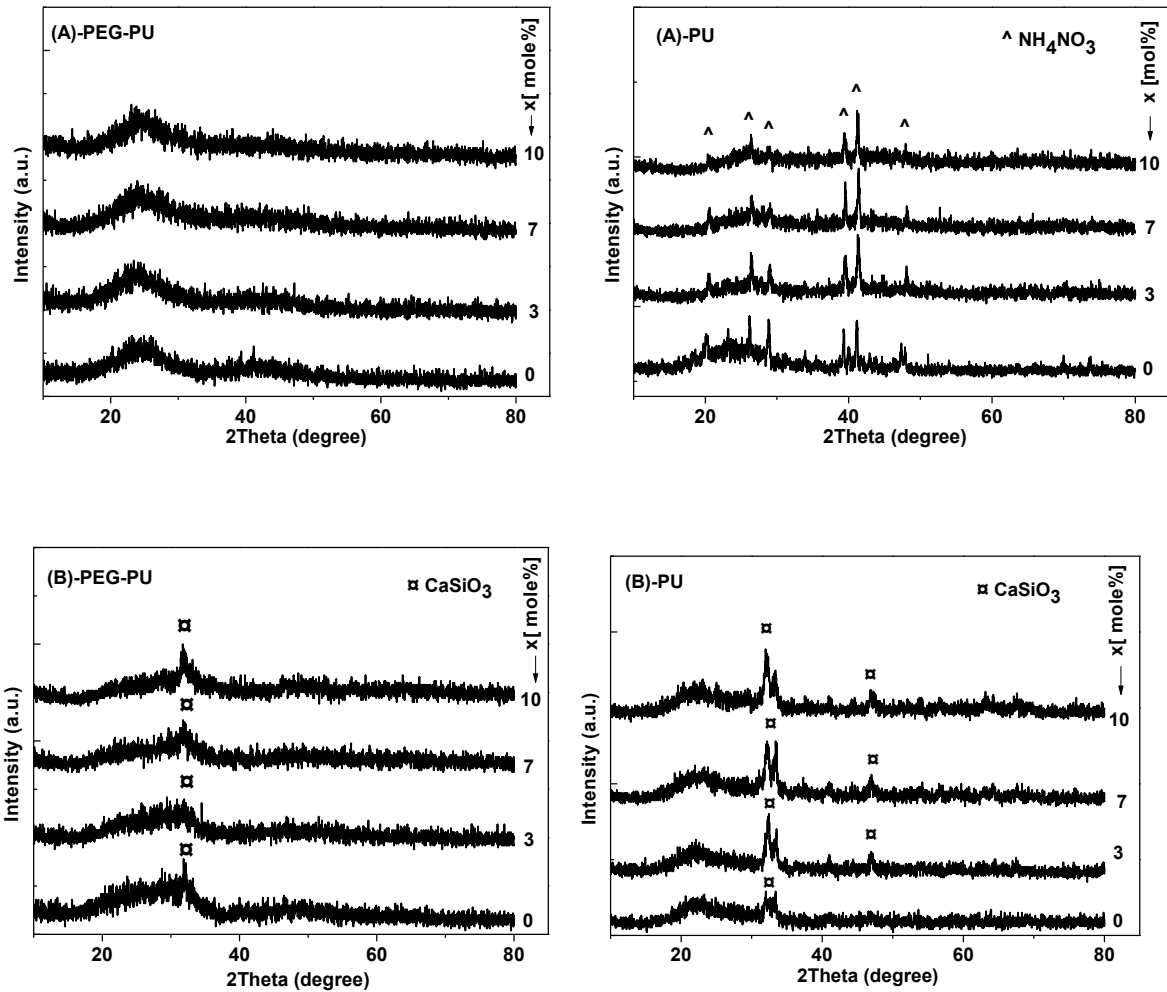
**Figura 4.3** Analiza DTA și TG a probelor obținute fără PEG (Zn-PU).

Prima pierdere de masă are loc în jur de 70-75°C și corespunde unui peak endoterm în semnalul DTA și poate fi asociată cu îndepărtarea moleculelor libere de apă. O a doua pierdere de masă care coincide cu două peakuri exoterme în curba DTA poate fi observată până 400 ° C. Această pierdere poate fi asociată cu descompunerea poliuretanului și eliminarea apei încapsulate în pori. Alte pierderi de masă sunt observate până la 800 ° C și corespund procesului de dehidroxilare în intervalul 560-570 ° C și eliminarea grupărilor organice reziduale din precursorii folosiți la sinteza probelor. Analiza termică indică, de asemenea, faptul că temperatura de cristalizare a probelor se produce în intervalul de 860-885 ° C, printr-un peak exoterme observat în curba DTA. Se pare că temperatura optimă care poate fi utilizată, pentru tratamentul termic, în scopul de a obține probe sticloase este cea de 700°C. De asemenea, scaffoldurile vitroceramice pot fi obținute până 900 ° C, care poate fi considerată ca temperatura de sinterizare pentru acestea.

#### **4.3 Caracterizarea structurală prin difracție cu raze X**

Modificările structurale care apar după tratamentul termic și sinterizarea probele au fost investigate folosind difracția de raze X (Figura 4.4 și 4.5). Difractogramele indică faptul că probele uscate la 100°C preparate cu PEG (Figura 4.4.A) au o structură amorfă descrisă de peakul larg de difracție situat între  $2\theta = 20^\circ$  și  $30^\circ$ . Pentru probele preparate fără PEG, alături de peakul de difracție mare care domină difractograma, există peakuri care indică prezența unei

structuri cristaline minore, care ar putea fi atribuită cristalelor de azotat de amoniu rezidual ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) [41]

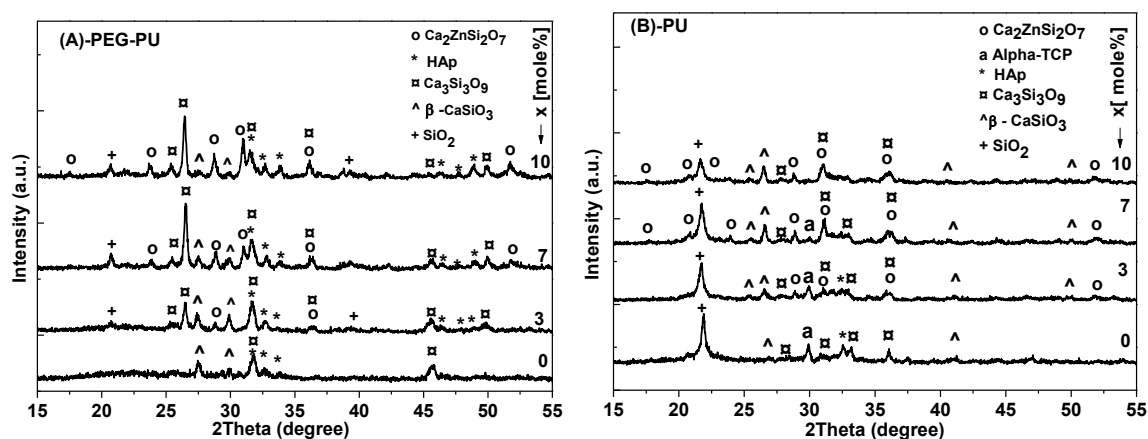


**Figura 4.4** Difractogramele pentru probele uscate la  $100^\circ\text{C}$  (A) și probele tratate termic la  $700^\circ\text{C}$  (B), preparate cu și fără PEG

Probele tratate termic la  $700^\circ\text{C}$  (vezi Figura 4.4.b) preparate cu și fără PEG sunt, de asemenea, în principal amorfe, în curs de dezvoltare o fază cristalină care corespunde silicat de calciu ( $\text{CaSiO}_3$ ).

Difractogramele probelor sinterizate la  $900^\circ\text{C}$  (Figura 4.5) arată dezvoltarea mai multor faze nanocristaline. În probele preparate cu PEG au fost identificate faze specifice hardystonitului ( $\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$ ), hidroxiapatitei, pseudowollastonitului ( $\text{Ca}_3\text{Si}_3\text{O}_9$ ), wollastonitului ( $\beta\text{-CaSiO}_3$ ) și cristobalitului slab dezvoltat ( $\text{SiO}_2$ ) (Figura 4.32A). Așa cum era de așteptat, proba

preparată fără zinc nu prezintă cristale de hardystonite. În cazul scaffoldurilor preparate fără PEG, fazele nucleate sunt hardystonite, alfa-TCP [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], hidroxiapatita, pseudowollastonite ( $\text{Ca}_3\text{Si}_3\text{O}_9$ ), wollastonite, cristobalit slab dezvoltat, dar peakuri de difracție specifice hidroxiapatitei apar numai pentru proba cu un conținut de 0 și 3% zinc (fig. 4.32B). Odată cu creșterea conținutului de zinc, probele preparate cu PEG prezintă o creștere a intensității hardystonite și vârfuri cristobalit ieftine cu declinul simultană a wollastonite. Faza specifică hidroxiapatitei este bine dezvoltată, de asemenea, în toate probele preparate cu PEG în timp ce în probele fără PEG se poate observa doar pentru concentrațiile de zinc de 0 și 3%. Probele fără PEG prezintă peakuri care corespund fazei alfa-TCP, a cărei intensitate este cu atât mai puțin pronunțată cu cât concentrația de ZnO crește de la 0 la 10% mol. Rezultatele indică faptul că adăugarea de PEG poate favoriza dezvoltarea fazelor specifice pseudowollastonitului și hidroxiapatitei.



**Figura 4.5** Difractogramele probelor tratate termic la  $900^\circ\text{C}$ , cu (A) și fără (b) PEG.

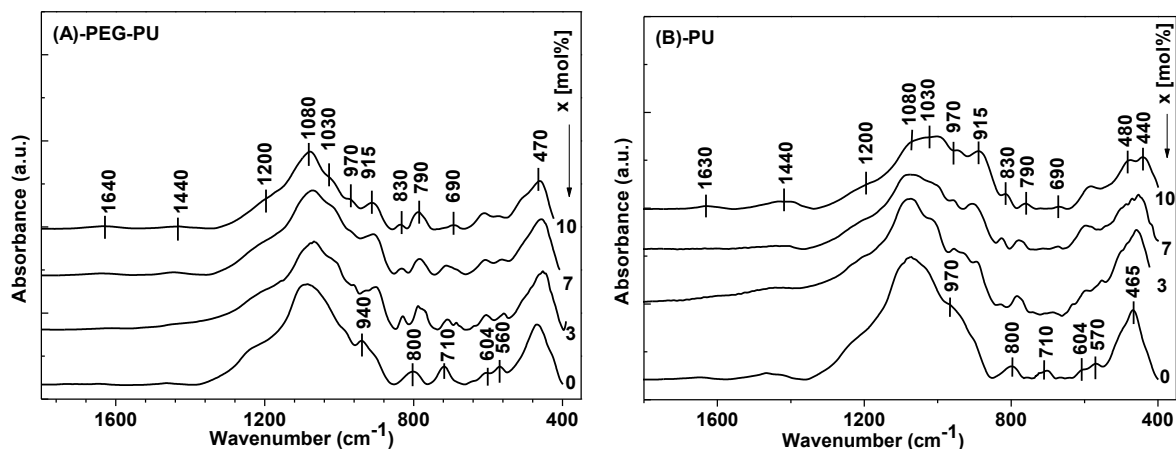
Dimensiunea cristalitelor de pseudowollastonite, calculată cu ecuația Scherrer pentru probele preparate cu și fără PEG (Tabelul 4.3), crește cu creșterea conținutului de zinc. Probele preparate cu PEG prezintă o distribuție mai uniformă a dimensiunii cristalitelor care este mai mare decât pentru cele obținute fără PEG.

Tabelul 4.3 Dimensiunea cristalitelor de pseudowollastonite în probele obținute cu tipar de PU acoperite cu sticle preparate prin tehnica sol-gel, cu și fără PEG.

Sample code	Crystallite size (nm)
0%ZnO-PEG-PU	32.1
3%ZnO-PEG-PU	32.7
7%ZnO-PEG-PU	33.4
10% ZnO-PEG-PU	34.2
0%ZnO-PU	18.6
3%ZnO-PU	20.5
7%ZnO-PU	25.1
10% ZnO-PU	28.3

#### ***4.4 Caracterizarea structurala prin spectroscopie FT-IR***

Spectrele FT-IR ale probei preparate cu PEG (Figura 4.6.A) arată că, prin adăugarea progresivă de ZnO, are loc apariția de noi benzi. Intensitatea benzilor asociate vibrațiilor grupărilor Si-O-NBO și Si-O-2NBO crește cu concentrația de zinc care indică faptul că rețeaua silicatică vitroasă suferă o scădere netă a simetriei sale locale ca urmare a adaosului de zinc. Banda observată încă la  $940\text{ cm}^{-1}$  pentru un conținut de zinc de 3% se deplasează spre  $970\text{ cm}^{-1}$  în odatăbcu creșterea concentrației de zinc. Acest lucru se explică prin faptul că ionii de  $\text{Zn}^{2+}$  tind să acționeze ca și modificator de rețea într-o manieră mult mai puternică decât ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  [20]. Chiar dacă ZnO are capacitatea de a juca atât rolul de modificator de rețea cât și de oxid intermediar, în probele investigate, ionii de zinc acționează doar ca modificatori de rețea de sticlă.



**Figura 4.6** Spectrele FT-IR ale substraturilor obținute cu (A-PEG-PU) și fără (B-PU) adaos de PEG

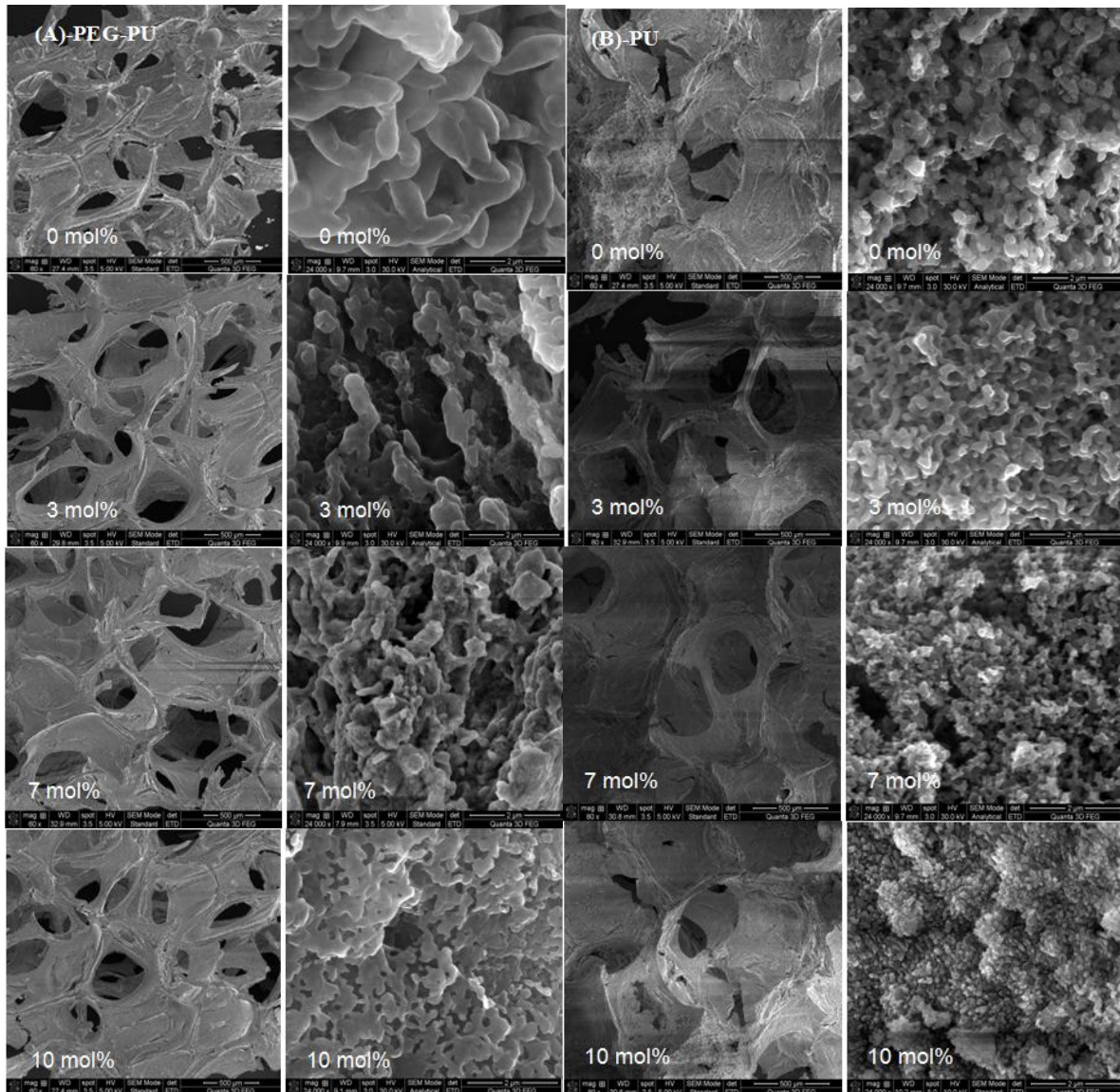
Banda situată în jur de  $710\text{ cm}^{-1}$  datorată vibrației de întindere asimetrică P-O-P [21, 22], prezintă o reducere progresivă în intensitatea sa relativă și o ușoară deplasare spre numere de undă mai mici odată cu creșterea concentrației de zinc. Acest comportament poate fi explicat prin modificarea unghiurilor de legătură a lanțurilor P-O-P ca efect al modificatorilor în structura rețelei [23]. Prezența a două benzi bine rezolvate în jur de  $570$  și  $604\text{ cm}^{-1}$  pot fi observate în toate probele preparate cu PEG. Aceste benzi sunt atribuite vibrațiilor de deformare P-O în tetraedrele  $\text{PO}_4^{-3}$ , caracteristice pentru fazele cristaline de tip apatitic [24-26] și sunt în bună concordanță cu rezultatele XRD.

În comparație cu spectrele înregistrate la probe preparate cu PEG, pentru cele fără PEG (Figura 4.6.B), s-a observat că banda de absorbție caracteristică vibrației de întindere Si-O-Si ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ) este mai largă în timp ce intensitatea benzilor corespunzătoare vibrației de deformare Si-O-Si ( $400\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  și  $800\text{ cm}^{-1}$ ) este mai ascuțită. De asemenea, benzile corespunzătoare legăturilor Si-O-NBO și Si-O-2NBO sunt mai bine evidențiate în probele fără PEG, pentru care gradul de conectivitate a rețelei descrește odată cu înlocuirea legăturilor de siliciu cu oxigeni legați cu cele de siliciu cu oxigeni nelegați [27]. În cazul probelor preparate fără PEG, cele două benzi apropiate de  $600\text{ cm}^{-1}$ , atribuite vibrației de deformare P-O tipice pentru faza de tip hidroxiapatitic, sunt înregistrate numai de la proba fără și cu cel mai mic conținut de zinc,  $x = 0$  și  $3\% \text{ ZnO}$ . Pe de altă parte, introducerea polimerului în timpul sintezei probelor a creat un mediu termodinamic favorabil pentru viitoarea dezvoltare a fazei cristaline hidroxiapatitice.

#### 4.5 Microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Imaginile SEM (Figura 4.7.A și B) ale substraturilor obținute pot fi utilizate pentru studii dimensiunii macroporilor și a interconectivității, precum și a microstructurii probelor.

Scaffoldurile vitroceramice produse prin metoda tiparului au menținut interconectivitatea porilor de la buretele poliuretanic. Adăugarea PEG-ului în timpul sintezei probelor nu a modificat dimensiunea macroporilor, imaginile SEM dezvăluind morfologia macroporoasă pentru toate substraturile sinterizate, cu un diametru al porilor de 300-500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.7** Structura porilor și microstructura probelor obținute cu (A-PEG-PU) și fără (B-PU) PEG.

De asemenea, pentru ambele tipuri de probe, microstructura este dependentă de

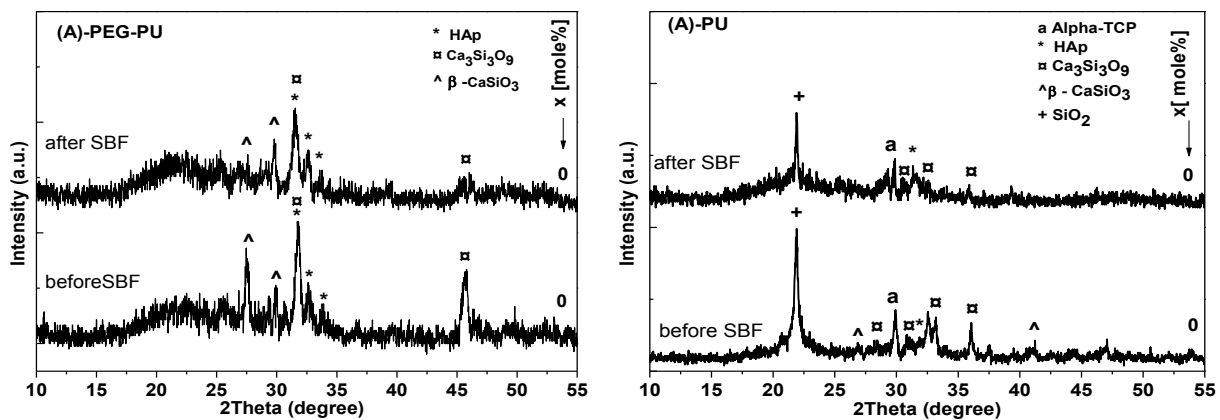
compoziția chimică a sistemelor vitroceramice care are ca rezultat o textură relativ mai densă pentru cea mai mare concentrație de zinc. Pe baza imaginilor SEM, se poate concluziona că substraturile vitroceramice preparate prin adăugarea de PEG menține o interconectare mai bună și o microstructura relativ diferită.

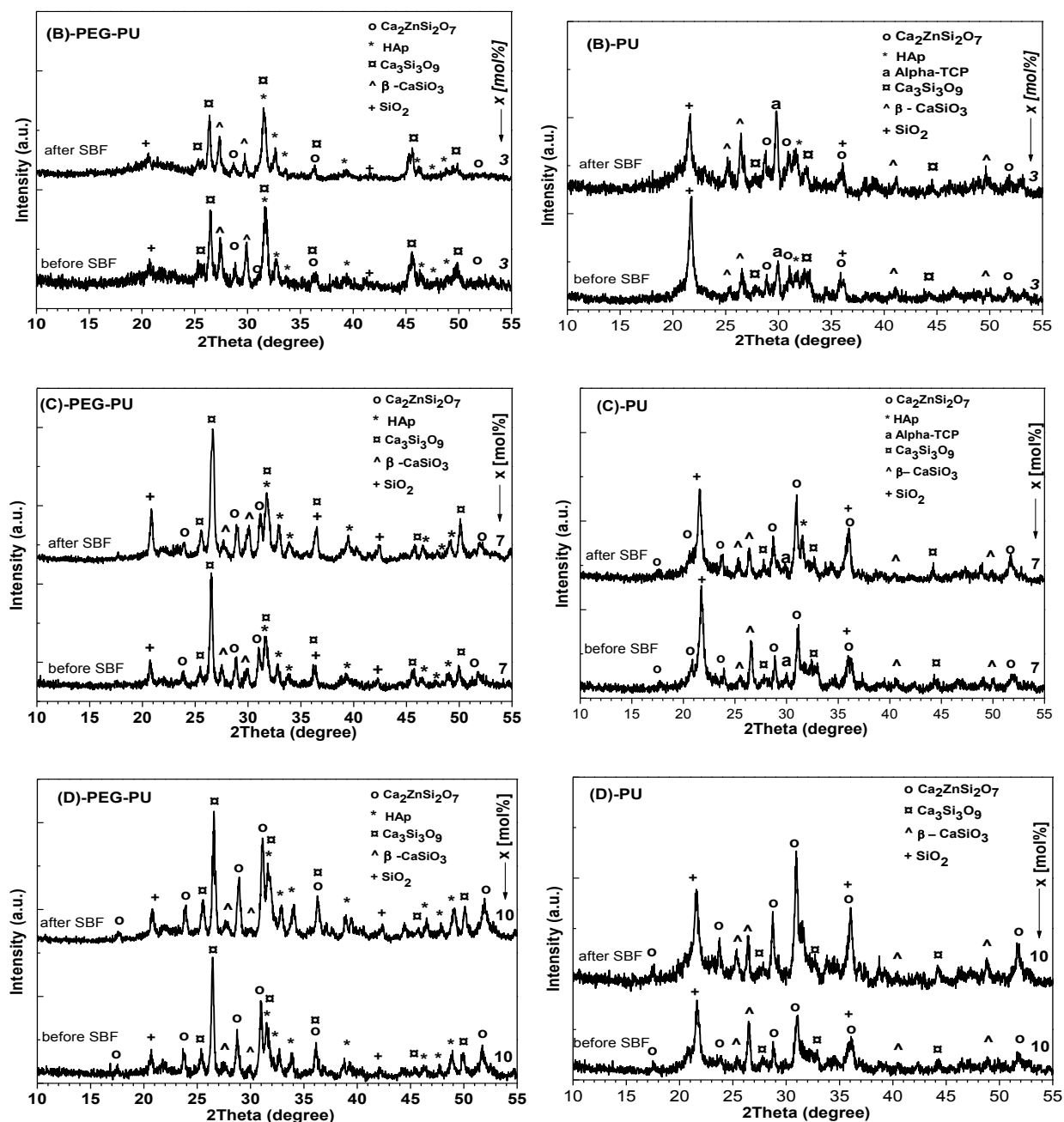
#### 4.6 Testarea bioactivității

##### 4.6.1 Difrakție cu raze X

Evaluarea bioactivitate a fost efectuat pe sistemele vitroceramice după 14 zile de imersare în SBF folosind XRD, FT-IR și SEM. Difractogramele XRD ale probelor preparate cu PEG înregistrate înainte și după imersia lor în SBF (Figura 4.8.A, B, C și D), arată că faza de hidroxiapatita se regăsește în toate aceste probe chiar înainte de imersare în SBF și este cu atât mai bine dezvoltat cu cât crește concentrația de zinc. În probele preparate fără PEG, înainte de imersie, a fost observată prezența fazei apatitice doar pentru proba fără zinc și cel mai mic conținut de zinc, în timp ce pentru scaffoldurile imersate a fost prezentă pentru 0, 3 și 7% ZnO (Figura 4.8).

Scaffoldurile imersate în SBF au demonstrat un efect inhibitor asupra formării apatitei în cazul probelor preparate fără PEG și cu conținutul cel mai mare de zinc. Evident, adăugarea polimerului în timpul sintezei probelor a fost benefică pentru bioactivitate lor, indiferent de concentrația de zinc.



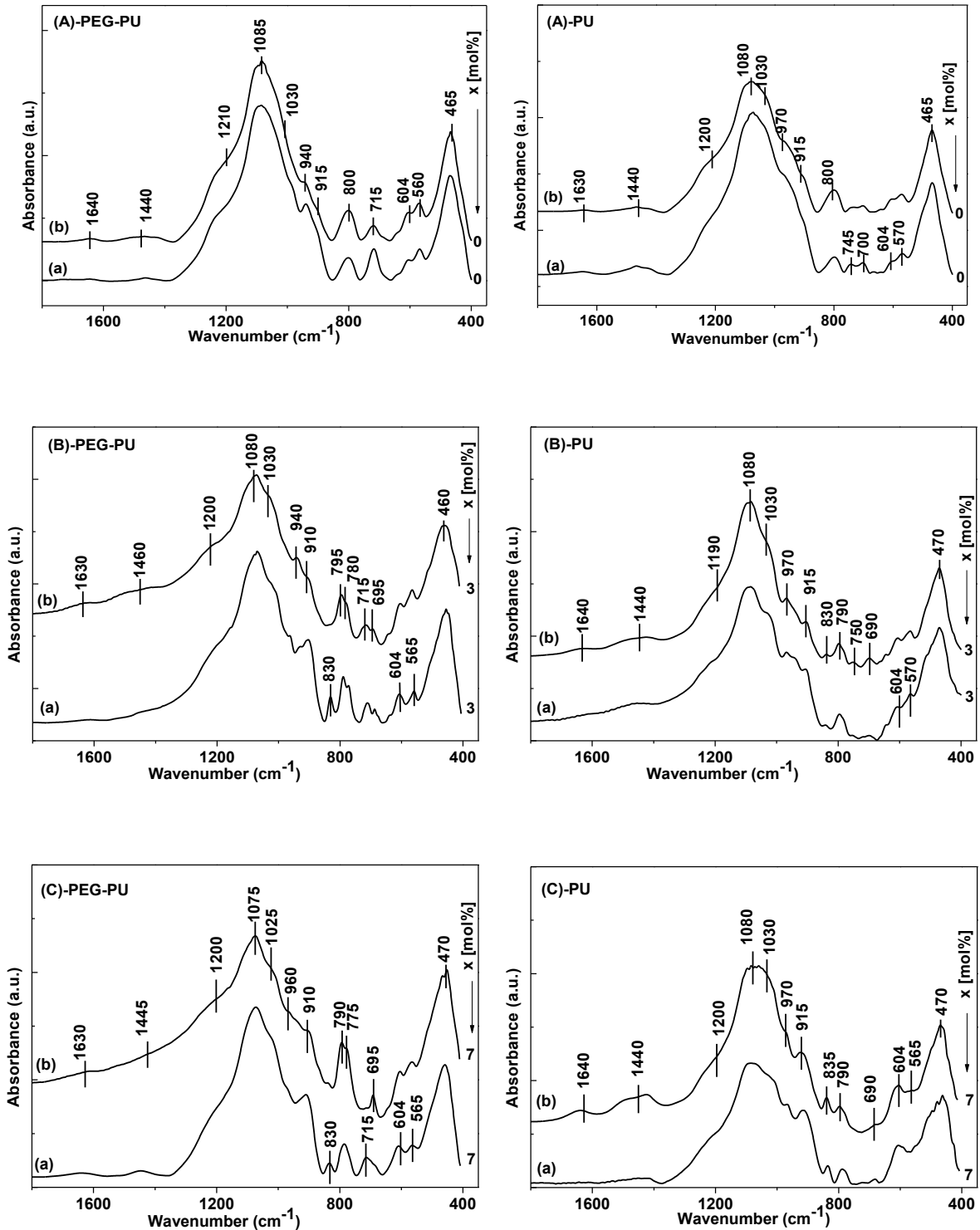


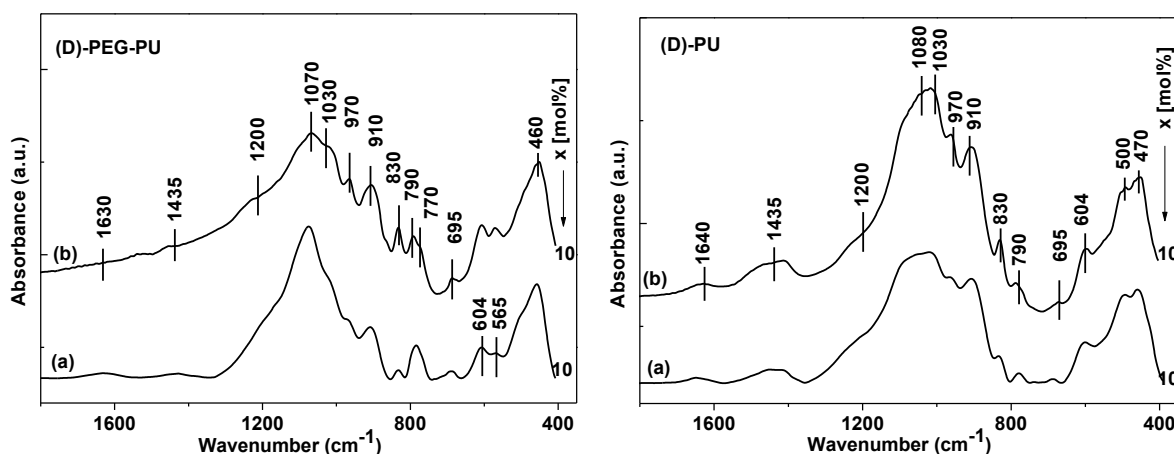
**Figura 4.8** Difractogramele pentru probele cu și fără PEG cu 0% ZnO (A), 3% ZnO (B), 7% ZnO (C) și 10% ZnO (D), înainte și după 14 zile de imersare în SBF.

#### 4.6.2 Spectroscopie FT-IR

Analiza FT-IR efectuată pe scaffolduri după 14 zile de imersare în SBF confirmă rezultatele XRD. Spectrele FT-IR ale probelor preparate fără PEG nu au evidențiat nici o bandă nouă după 14 zile de imersie în SBF (Figura 4.9.A, B, C și D). Aceste rezultate spectroscopice dovedesc că structura locală a probelor nu poate fi distrusă prin migrarea ionilor din SBF pe

suprafața sticlelor. Banda dublă situată la 570 și 604  $\text{cm}^{-1}$  corespunzătoare vibrațiilor de deformare P-O și caracteristică pentru faza cristalină a hidroxiapatitei [71-73] este prezentă în spectrele probelor cu  $x \leq 7 \text{ mol\% ZnO}$  imersate în SBF.



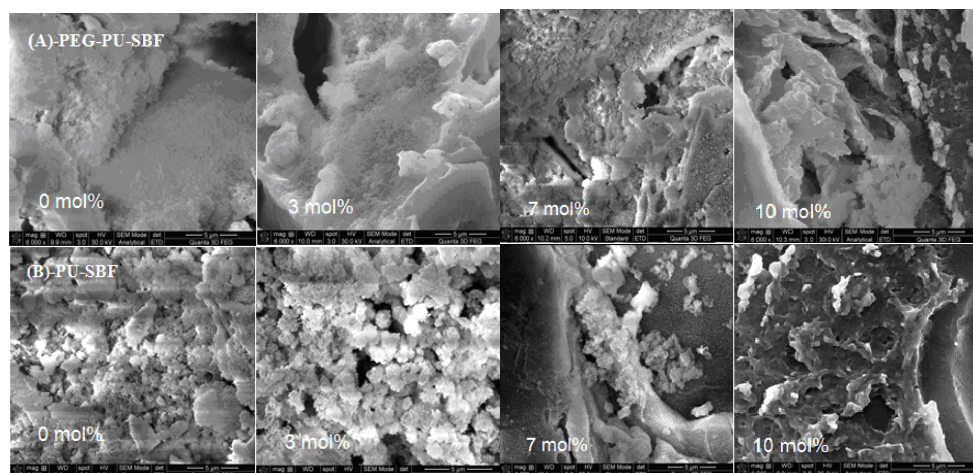


**Figura 4.9** Spectrele FT-IR ale substraturilor cu și fără PEG, având 0% ZnO (A), 3% ZnO (B), 7% ZnO (C) și 10% ZnO (D), înainte (a) și după (b) 14 zile de imersare în SBF.

#### 4.6.3 Microscopie electronică de baleiaj

Imaginile SEM înregistrate după 14 zile de imersare în SBF de la probele de preparate cu PEG (Figura 4.10), scot în evidență apariția pe suprafața lor a unor aglomerări aceiforme, care este o bună dovadă pentru auto-asamblarea fazei de hidroxiapatită în SBF.

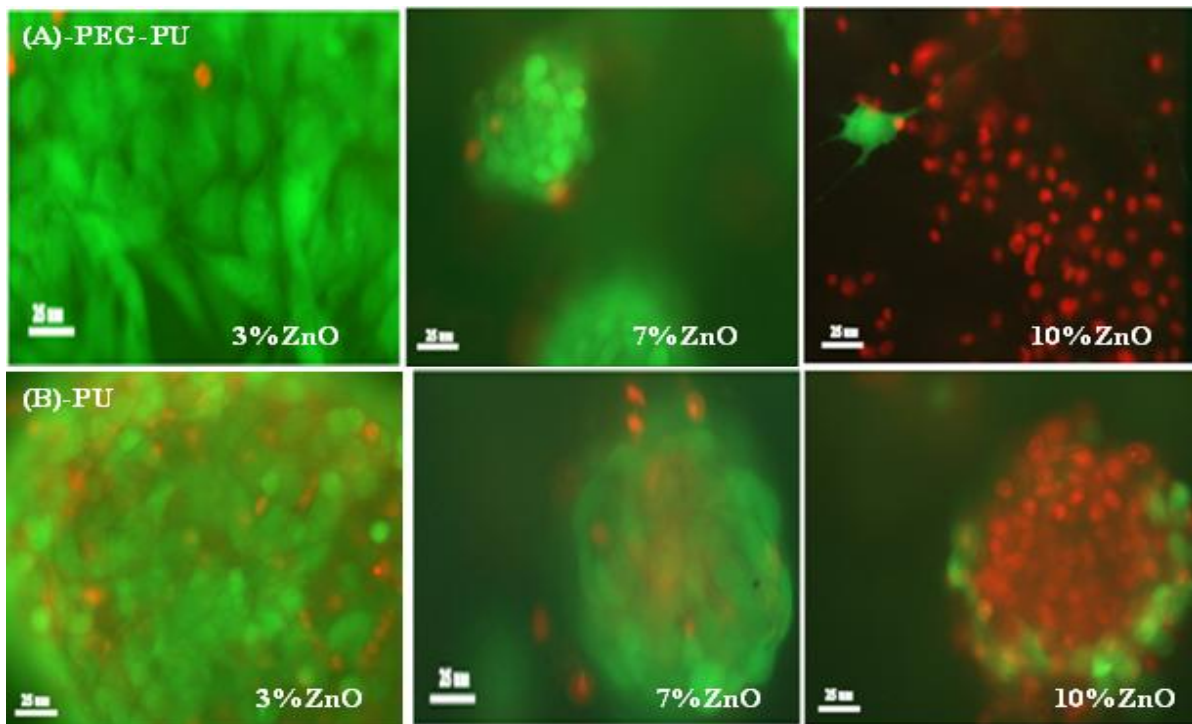
În același timp, suprafața probelor fără PEG post-imersate cu cel mai mare conținut de zinc este liberă de aglomerări, rezultat confirmat prin difracție de raze X și spectroscopie în infraroșu. Din imaginile SEM se poate concluziona că o cantitate mai mare de zinc în compoziția sistemului vitroceramic fără PEG, are un efect inhibitor pentru formarea hidroxiapatitet. Pe de altă parte, adăugarea polimerului în timpul sintezei probelor a favorizat formarea stratului de apatită pe suprafața lor, chiar și pentru cel mai mare conținut de zinc.



**Figura 4.10** Microstructura substraturilor obținute cu (A-PEG-PU) și fără (B-PU) PEG, după 14 zile de imersare în SBF.

#### 4.7 Biocompatibilitate celulară

Testele de viabilitate celulară au fost efectuate în scopul de a evalua celulele cultivate pe sistemele vitroceramice preparate. Se poate observa că celulele viabile au culoarea verde, iar celulele neviabile sunt colorate în roșu, prin utilizare colorării duble cu diacetat de fluoresceină (1 ug / ml) și iodură de propidiu (5 ug / ml) ca marcări(Figura 4.11). Rezultatele indică faptul că odată cu creșterea concentrației de zinc în sistemele vitroceramice, preparate cu și fără PEG, are loc scăderea viabilității celulare.



**Figura 4.11** Imagini obținute prin microscopie de fluorescență pentru testarea viabilității celulelor cultivate pe probele preparate

## ***Concluzii:***

- Filme subțiri din sticlă bioactivă, având compoziția 44.5SiO<sub>2</sub>-11ZnO-44.5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (mol%), s-au obținut prin tehnica de acoperire prin rotație;
- Atât pentru filmul subțire cât și pentru proba uscată la 100°C, rezultatele XRD indică o fază predominant amorfă și cristale nanometrice de fosfat de zinc și de silicat de zinc formate în timpul sintezei, datorită reziduurilor provenite din precursori;
- Marea pierdere de masă înregistrată în intervalul de temperatură (203-297°C) pentru proba uscată este legată de îndepărtarea moleculelor de apă reținute în cavități care sugerează o anumită porozitate, care este de asemenea de așteptat pentru filmele subțiri;
- Analiza AFM a filmelor subțiri evidențiază o suprafață aspră, eterogenă, cu dimensiuni ale rugozităților în jurul valorii de 3 μm și arii de până la 8.63 μm<sup>2</sup>, care sunt convenabile pentru atașarea de biomolecule.
- Probele obținute prin metoda sol-gel bazate pe ZnO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>, tratate termic la 700°C au o structură predominant amorfă indicând o dezordine internă și natura sticloasă al acestor compuși.
- Ambele probe, preparate cu și fără PEG au o structură mezoporoasă, dar adăugarea PEG-ului a conferit o porozitate și o suprafață specifică mai mare.
- Bioactivitatea probelor scade cu creșterea concentrației de zinc și nu au efect antibacterian, ceea ce demonstrează, că sticlele cu cele patru concentrații de zinc (0, 3, 7 și 10% mol) sunt potrivite pentru testele de viabilitate celulară.
- În plus, adaosul de zinc în rețeaua sticloasă induce rezistență probelor împotriva iradierii gamma, în timp ce pentru o doză crescută de iradiere, ionii de Zn<sup>2+</sup> și-au pierdut capacitatea lor de a consolida rețeaua probelor din sticlă.
- Pe de altă parte, adăugarea PEG-ului în timpul sintezei probelor conferă rezistența foarte bună sticlelor împotriva iradierii, menținând astfel stabilitatea rețelei de sticlă.
- Sistemele vitroceramice macroporoase cu zinc au fost preparate cu succes prin sinteza sol-gel, combinată cu metoda tiparului.
- Adăugarea PEG-ului, în timpul sintezei sol-gel, influențează morfologia probelor obținute și le conferă o mai mare interconectivitate porilor.
- Pentru substraturile vitroceramice rezultate după tratamentul termic la 900°C, fazele nanocristaline principale dezvoltate în probele preparate cu PEG sunt pseudowollastonite și hidroxiapatită care favorizează creșterea bioactivității probelor.
- Testele in vitro indică faptul că creșterea conținutului de zinc previne formarea hidroxiapatitei, dar nu are nici un efect inhibitor în cazul probelor preparate cu PEG.

- Analiza pe culturi celulare arată o descreștere a viabilității celulare cu creșterea concentrației de zinc.

### ***Concluzii generale:***

Filmele subțiri din sticlă bioactivă cu o nouă compoziție  $44.5\text{SiO}_2\text{-}11\text{ZnO-}44.5\text{P}_2\text{O}_5$  (mol%) obținute prin tehnica acoperirii prin rotație sunt eterogene, cu topografie rugoasă și suprafață specifică mare, care este convenabilă pentru atașare de biomolecule.

Proprietăți structurale și morfologice ale probelor obținute prin tehnica sol-gel, aparținând sistemului  $60\text{SiO}_2 \cdot (35-x) \text{CaO} \cdot x\text{ZnO} \cdot 5\text{P}_2\text{O}_5$ , ( $x = 0, 3, 7, 10\%$  mol), tratate termic la  $700^\circ\text{C}$ , preparate cu și fără adaos PEG sunt influențate de iradiere cu radiații gamma, frecvent utilizate pentru sterilizarea biomaterialelor. Adaosul de zinc la matricea de sticlă calco-fosfo-silicatică și adăugarea PEG-ului în timpul sintezei probelor a diminuat efectele iradierii cu radiații gamma.

Compușii macroporoși din sistemul  $60\text{SiO}_2 \cdot (35-x) \text{CaO} \cdot x\text{ZnO} \cdot 5\text{P}_2\text{O}_5$ , ( $x = 0, 3, 7, 10\%$  mol) preparați prin metoda sol-gel combinată cu metoda tiparului și tratați termic la  $900^\circ\text{C}$  prezintă o mai mare bioactivitate pentru probele obținute cu adăugare de PEG, în timpul sintezei sol-gel. Testele in vitro indică faptul că creșterea conținutului de zinc previne formarea hidroxiapatitei, dar nu are nici un efect inhibitor în cazul probelor preparate cu PEG. Rezultatele analizelor efectuate pe culturi de celule osteoblaste, linia MG63 din osteosarcoma umană, indică o scadere a viabilității celulare odată cu creșterea concentrației de zinc.

## **Referințe:**

1. E. Verne, M. Bosetti, C. Vitale-Brovarone, C. Moiescu et al, *Biomaterials*, 23 (2002) 3395.
2. E. Verne, R. Defilippi, G. Carl, C. Vitale-Brovarone, P. Appendino, *J. Eur. Cer. Soc.* 23 (2003) 675.
3. C. Vitale-Brovarone, S. Di Nunzio, O. Bretcanu, E. Verne, *J. Mat. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 209.
4. E. Verne, F. Valles, C. Vitale-Brovarone, S. Spriano, C. Moiescu, *J. Eur. Cer. Soc.* 24 (2004) 2699.
5. C. Vitale-Brovarone, E. Verne, *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 16 (2005) 863.
6. M. Yamaguchi, H. Oishi, Y. Suketa, *Biochem. Pharmacol.* 364 (1987) 007.
7. G. Lusvardi, D. Zaffe, L. Menabue, C. Bertoldi, G. Malavasi, U. Consolo, *Acta Biomater.* 5 (2009) 419.
8. L.L. Hench, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 967.
9. J. Serra, P. Gonzalez, S. Liste, S. Chiussi, L. Leon et al, *J. Mater. Sci. Med.* 13 (2002) 1221.
10. J. Marchi, D.S. Morais, J. Schneider, J.C. Bressiani, A.H.A. Bressiani, *J. Non-Cryst. Solids* 351 (2005) 863.
11. M. Wang, J. Cheng, M. Li, F. He, *Physica B*, 406 (2011) 187.
12. M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.* 78 (1995) 2463.
13. A. Vulpoi, L. Baia, S. Simon, V. Simon, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 178.
14. A. Martinez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regi, *Chem. Mater.* 12 (2000) 3080.
15. J. Simitzis, D.E. Baciuc, *Dig. J. Nanomater. Bios.* 7 (2012) 1719.
16. P. Saravanapavan, L.L.Hench, *J. Non-Cryst. Solids*, 318 (2003) 14.
17. R.M. Almeida, G.C. Pantano, *J.Appl. Phys.*, 68 (1990) 4225.
18. P. Piao, W.G. Oldham, E.E. Haller, *J.Non-Cryst.Solids*, 276 (2000) 71.
19. A.A. Khan, J.P. Roux, W.J. James, *Acta Crystall. B*, 28 (1972) 2065
20. S. Haimi, G. Gorianc, L. Moimas, B. Lindroos et al, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3122.
21. I. Battisha, A. El Nahrawy, *New J. Glass Ceram.* 2 (2012) 17.
22. M.V. Ramachandra Rao, Y. Gandhi, L. Srinivasa Rao, G. Sahayabaskaran, N. Veeraiah, *Mater. Chem. Phys.* 126 (2011) 58.
23. R. Ciceo-Lucacel, O.Ponta, V. Simon, *J. Non-Cryst. Solids* 358 (2012) 2803.

24. M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.* 78 (1995) 2463.
25. C.Y. Kim, A. E. Clark, L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.* 26 (1992) 1147.
26. A. Vulpoi, L. Baia, S. Simon, V. Simon, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 178.
27. D.M. Sanders, W.B. Person, L.L. Hench, *Appl. Spectrosc.* 28 (1976) 1474.