

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI

FACULTATEA DE FIZICĂ

*Emilia Sabina Vanea*

**Studii Spectroscopice pe Biomateriale  
Aluminosilicaticice cu Conținut de Fier și  
Pământuri Rare**

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonator Științific

Prof. Dr. Viorica Simon

Cluj-Napoca

2010

## Table of Contents

Introducere .....	3
1. Prepararea probelor.....	6
2. Caracterizarea probelor prin DRX.....	6
3. Măsurători magnetice .....	8
4. Caracterizarea probelor prin RPE.....	10
5. Funcționalizarea probelor .....	12
5.1 Caracterizarea probelor prin XPS și FT-IR.....	13
5.1.1 Rezultatele XPS obținute pentru sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Y}_2\text{O}_3$ .....	13
5.1.2 Rezultatele FT-IR obținute pentru sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Y}_2\text{O}_3$ ....	19
5.1.3 Rezultatele XPS obținute pentru sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 20\text{Fe}_2\text{O}_3$ .....	20
5.1.4 Rezultatele FT-IR obținute pentru sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 20\text{Fe}_2\text{O}_3$ .....	25
Concluzii .....	27
Bibliografie selectivă .....	29

*Cuvinte cheie: sol-gel, compuși aluminosilicatici, defecte induse prin iradiere, microparticule nanostructurate, adsorbția proteinelor, BSA, fibrinogen, SBF, EPR, XPS, FT-IR,*

## Introducere

Definițiile biomaterialelor și biocompatibilității s-au schimbat în raport cu cunoștințele dobândite și cu creșterea performanței materialelor. Un biomaterial, în accepțiunea actuală, în sens larg, este un material (viu sau neviu) destinat a fi pus în contact cu țesuturile vii și fluide biologice pentru a diagnostica, trata, modifica forme sau a înlocui părți de țesut, organe sau a stimula unele funcții ale acestora [1, 2].

Definiția biocompatibilității s-a schimbat chiar mai mult, în raport cu materialul considerat. Inițial definitoare doar pentru materialele biologice inerte, a fost adaptată materialelor biologic active și în final materialelor funcționalizate pentru regenerare de țesuturi, legare și distribuție de medicamente. Pot fi de asemenea considerate și materialele biodegradabile. Definiția general acceptată pentru biocompatibilitate unui material vizează proprietățile acestuia care asigură o reacție adversă minimă în mediul biologic [2].

Sistemele vitroase sunt foarte des utilizate ca materiale reparatoare sau înlocuitoare de țesut osos în numeroase aplicații de ortopedie și stomatologie, datorită biocompatibilității lor excelente și a oseointegrării acestora [3]. Datorită stabilității ridicate în organism, vitroceramicele aluminosilicice prezintă câteva aplicații biomedicale [4-7-10].

Sticlele aluminosilicice sunt extreme de stabile în organism și prin adăugarea de oxid de fier pot fi optimizate pentru încălzirea locală prin histereză, de interes în hipertermie. Hipertermia a câștigat recent un mare interes ca metodă de tratament al cancerului, în general ca adjuvant al altor metode cum ar fi radioterapia și chimioterapia.

Aplicarea simultană a radioterapiei și hipertermiei crește considerabil efectele terapeutice ale celor două metode [11]. Hipertermia este un tratament termic prin care temperatura țesutului este crescută local pentru a distruge zona bolnavă [12]. Ea se realizează prin generarea de temperaturi până la 45-47°C cu ajutorul particulelor magnetice, introduse local în apropierea țesutului cancerigen, în prezența unui câmp magnetic exterior.

Cele mai importante rezultate obținute studiind aceste sisteme se referă la corelația structură-proprietăți și la efectele diferiților agenți externi cum ar fi temperatura, radiațiile nucleare, agenții chimici sau stresul mecanic asupra caracteristicilor lor fizico-chimice [3,8].

După obținere și înaintea utilizării materialelor de implant, este necesară sterilizarea lor, pentru a reduce riscul apariției unor infecții și a unor complicații asociate [13, 14]. În ciuda disponibilității unui larg șir de tehnici de sterilizare, este bine recunoscut faptul că nicio metodă de sterilizare nu este lipsită de efecte adverse, toate procedeele având propriile lor avantaje și dezavantaje [15-17]. O metodă eficientă de sterilizare trebuie să garanteze nivelul necesar de garanție

a sterilității, cu un efect minim asupra proprietăților fizice, chimice și biologice ale biomaterialului [18, 19].

În teză sunt descrise efectele radiației gama asupra compușilor aluminosilicatici de interes biomedical, în ideea sterilizării acestora prin acest procedeu. O tehnică promițătoare care poate fi utilizată pentru a descrie și explica centrii paramagnetici radio - induși este Rezonanța Paramagnetică de Spin (EPR).

Particulele magnetice utilizate în aplicații de hipertermie/radioterapie trebuie injectate fie local la nivelul tumorii, fie intravenos și dirijate spre locul tumorii. După injectarea acestor particule în sistemul circulator, ele sunt rapid acoperite de componente ale plasmei sangvine, cum ar fi proteinele. Pe de altă parte, particulele pătrunse în organism sunt rapid recunoscute de către sistemul major de apărare al organismului, sistemul reticulo-endotelial (RES), drept corpi străini fiind astfel rapid eliminate din organism [20]. Acest proces poartă denumirea de opsonizare. O soluție a acestei probleme este de a încapsula particulele într-un strat de proteină, evitându-se astfel detectarea acestora de către RES și astfel asigurându-se menținerea îndelungată a particulelor în organism [21]. Modificarea suprafeței în acest sens asigură biocompatibilitatea și stabilitatea particulelor în ceea ce privește procesul de opsonizare.

Este acceptat faptul că modul de adsorbție a proteinelor trebuie îndeaproape controlat pentru a se putea controla suprafața biomaterialului și astfel studiul interacțiunii proteină-suprafață trebuie să fie de mare importanță în dezvoltarea biomaterialelor.

În această lucrare sunt descrise caracteristicile de adsorbție a albuminei serice bovine și a fibrinogenului, două componente plasmatiche principale și proteinele relevante care adsorb la suprafața biomaterialelor care intră în contact cu sângele.

Albumina reprezintă proteina plasmatică predominantă, reprezentând 60-70% din plasma. Este în general considerată ca având un rol în “pasivarea” suprafeței, reducând răspunsul inflamator acut la material [23]. Fibrinogenul reprezintă a treia componentă de bază a plasmei sangvine și este adsorbită foarte repede pe biomaterialele implantate, fiind proteina relevantă care ia parte la coagularea sângelui, facilitează adeziunea și agregarea trombocitelor, proprietăți foarte importante în procesele de homeostazie și tromboză [24].

Astfel, un alt obiectiv al studiilor efectuate in vitro a fost funcționalizarea compușilor aluminosilicatici cu scopul îmbunătățirii biocompatibilității sistemelor. Adsorbția proteinelor la suprafața a fost investigată cu ajutorul spectroscopiei fotoelectronice de raze X (XPS) și a spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).

Spectroscopia XPS este o tehnică utilă de analiză a suprafeței materialelor, oferind informații despre straturile periferice, de câțiva nanometri de la suprafață, ale materialului funcționalizat.

Spectroscopia în infraroșu este una dintre tehnicile cele mai utilizate pentru studierea structurii secundare a proteinelor.

Lucrarea începe cu prezenta introducere, se continuă cu cinci capitole, fiecare dintre acestea fiind urmat de referințe și se încheie cu concluzii.

Primul capitol introduce noțiunile de biomaterial și biocompatibilitate, unitățile structurale de bază ale rețelei  $\text{SiO}_2$  și principalele defecte ale acesteia. Tratează de asemenea principalele tehnici de sterilizare, împreună cu avantajele sterilizării cu radiații gama.

Capitolul al doilea descrie hipertermia ca metoda terapeutică a cancerului și raționamentul biologic pentru asocierea hipertermiei cu radioterapia.

Capitolul al treilea abordează interacțiunea proteină – suprafață, responsabilă pentru îmbunătățirea biocompatibilității materialelor.

Capitolul patru conține o scurtă descriere a metodelor experimentale utilizate atât pentru prepararea cât și pentru analiza sistemelor.

Ultimul capitol, prezintă rezultatele experimentale obținute pentru sistemele aluminosilicice cu conținut de fier și pământuri rare precum și discuții pe baza acestor rezultate.

## 1. Prepararea probelor

Pentru prepararea probelor s-a optat pentru metoda sol-gel, fiind un proces care permite sinteza unor compuși cu omogenitate și puritate ridicată. S-au preparat astfel compuși aluminosilicatici cu conținut de fier și ytriu sau disprosiu.

Compoziția sistemelor aluminosilicaticice preparate este redată în procente molare în tabelul următor (Tabel 1).

*Tabel 1. Compoziția probelor.*

Cod	Compuși (mol %)				
	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
ASF	60	20	20		
ASFD	60	20	10	10	
ASFY	60	20	10		10

Pentru sinteza compușilor au fost utilizate ca materiale de plecare acidul silicic (Si(OH)<sub>4</sub>), azotatul de aluminiu (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O), azotatul de fier (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O), azotatul de ytriu (Y(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) și azotatul de disprosiu (Dy(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O) cu un grad înalt de puritate.

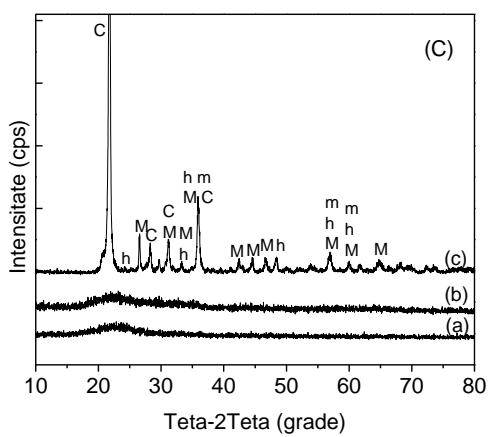
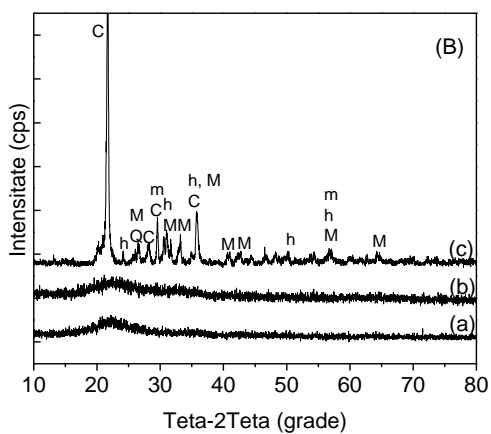
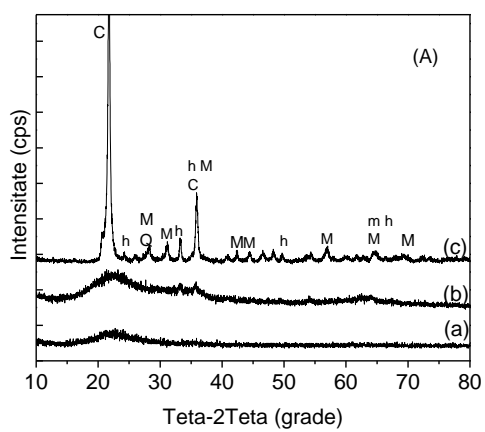
Cantitatea calculată de precursori a fost dizolvată în apă după care amestecate și încălzite la 90°C cu scopul obținerii unui gel.

După formarea gelului, probele au fost filtrate, uscate în cuptor electric la 110°C pentru câteva ore iar apoi tratate termic la 500°C pentru o ora și respectiv la 1200°C pentru 24 ore. Scopul tratamentului termic a fost de a crea faze cristaline ale oxidului de fier pentru încălzirea locală prin histereză. Tratamentul termic poate de asemenea să restabilească performanțele materialelor, înlăturând defectele structurale induse în urma preparării probelor [25].

## 2. Caracterizarea probelor prin DRX

Structura compușilor aluminosilicatici astfel preparați a fost investigată înainte și după tratamentul termic aplicat la 500°C și 1200°C cu ajutorul Difrakției de Raze X (XRD).

Măsurătorile de difracție de raze X au fost realizate cu ajutorul unui difractometru Shimadzu XRD-6000 utilizând o radiație X CuK<sub>α</sub> ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ).



**Figura 1.** Difracția de raze X pentru probele ASF (A), ASFD (B) și ASFY (C) înainte (a) și după tratamentul termic la 500°C (b) și 1200°C (c).

Difractogramele de raze X prezintă o structură amorfă înaintea tratamentului termic și o structură crescător cristalină în cazul probelor tratate termic la 500 °C respectiv 1200 °C cum este prezentat în figura 1.

Tratamentul termic la 1200°C determină dezvoltarea unor faze cristaline corespunzătoare cristobalitului (C), cuarțului (Q) [26],  $\text{Al}_6\text{Si}_2\text{O}_{13}$  mulitului (M) [27],  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  hematitei (h) și  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetitei (m) [28] de dimensiuni nanometrice (pană la 75 nm). Dimensiunea cristalelor a fost estimată cu ajutorul ecuației Scherrer în raport cu poziția și lărgimea picurilor.

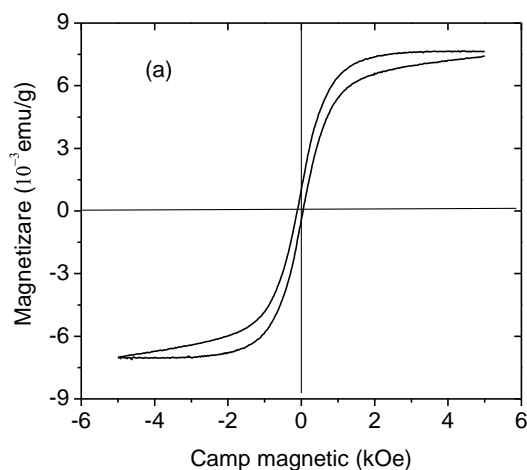
### 3. Măsurători magnetice

Cu scopul de a stabili comportamentul magnetic al compușilor sintetizați au fost verificate de asemenea proprietățile magnetice cum ar fi magnetizarea la saturație și temperatura Curie.

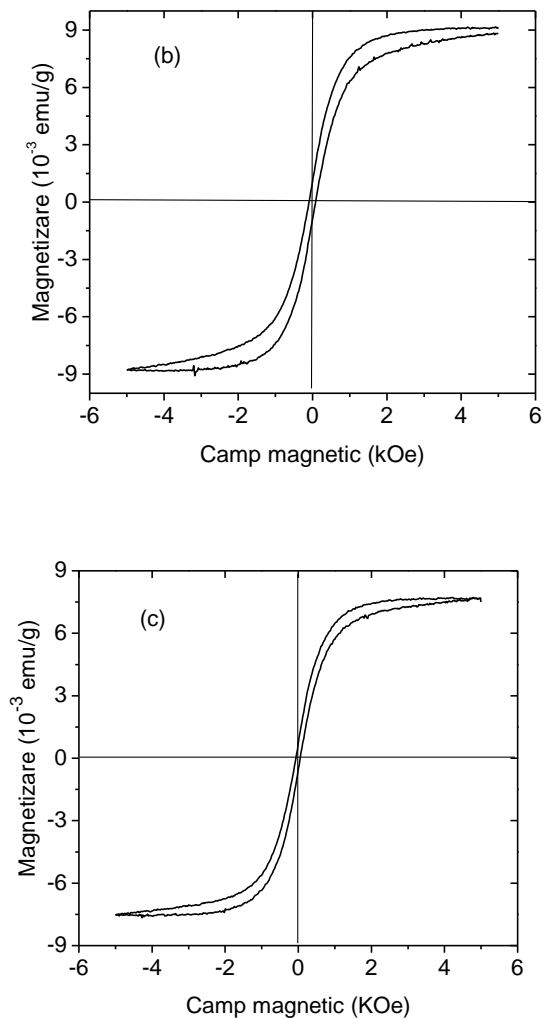
Pentru manipularea particulelor magnetice este foarte importantă cunoașterea momentului lor magnetic. Acesta a fost determinat cu ajutorul Magnetometrului cu gradient alternativ (AGM) MicroMag 2900.

Măsurătorile de magnetizare au fost realizate utilizând o balanță Curie-Weiss. Dependența magnetizării de câmpului magnetic a fost determinată pe un echipament “home - made” pentru sistemele tratate termic la 1200 °C.

Măsurătorile de moment magnetic în funcție de câmpul magnetic indică un comportament feromagnetic al probelor investigate (Fig. 2). Valorile magnetizării au fost determinate prin raportarea valorilor momentului magnetic la cantitatea de probă.

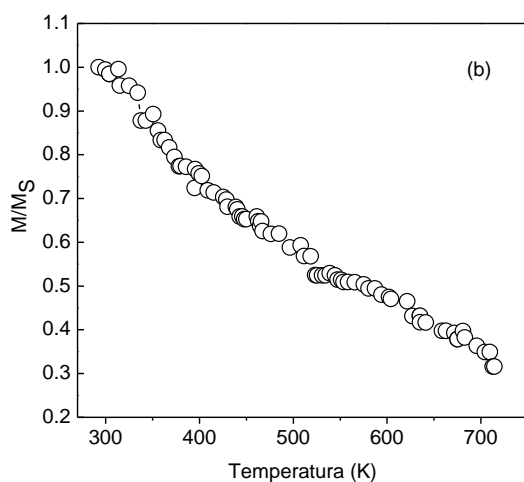
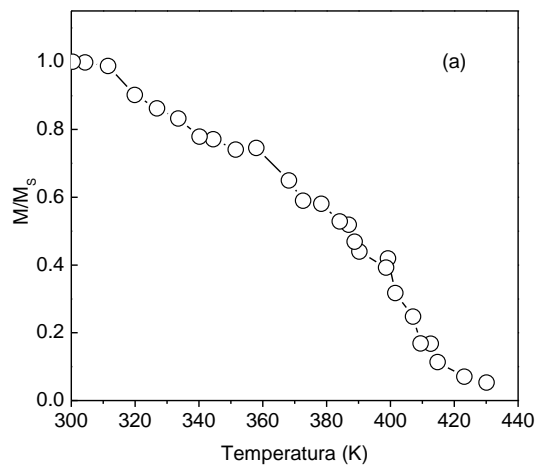






**Figura 2.** Magnetizare în funcție de câmp magnetic pentru ASF (a), ASFY (b), ASFD (c) după tratamentul termic aplicat la 1200 °C.

Dependența magnetizării de temperatură prezintă pentru sistemul notat ASF o temperatură Curie de 430 K (Fig. 3 a), iar pentru sistemul cu conținut de disprosiu, temperatura Curie este de 711 K (Fig. 3 b). Valorile temperaturilor Curie sunt mai mari decât cele optime pentru hipertermie (315 K), dar microparticulele nanostructurate prezintă un comportament stabil din punct de vedere magnetic, reprezentând subiectul investigațiilor următoare.



*Figura 3. Dependența de temperatură a magnetizării normale la valoarea de saturație pentru ASF (a) și ASFD (b) după tratamentul termic aplicat la 1200°C.*

#### **4. Caracterizarea probelor prin RPE**

Pentru utilizarea acestor compuși ca biomateriale, este necesar sterilizarea lor, după preparare și înaintea introducerii lor în organism, cu scopul distrugerii unor microorganisme și de a reduce riscul apariției unor infecții sau a unor complicații asociate.

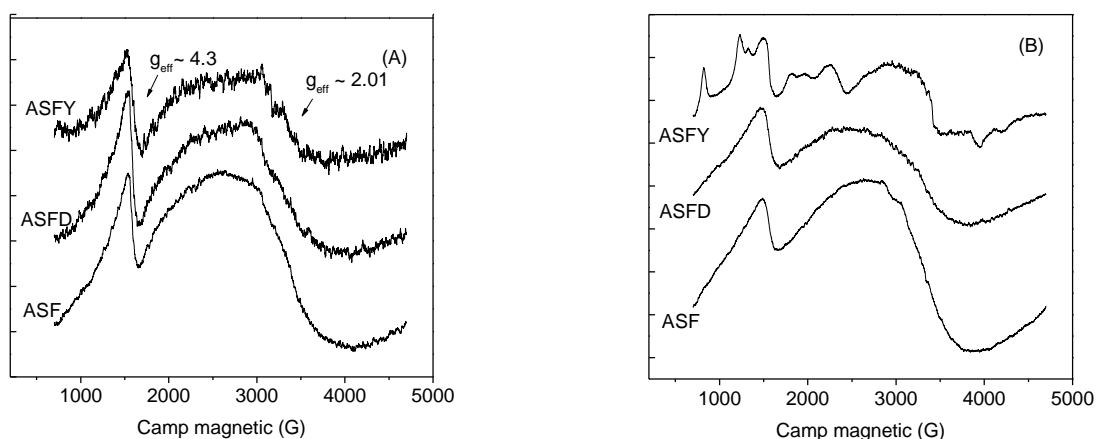
În acest sens s-a optat pentru sterilizarea gama, fiind o tehnică simplă, rapidă, eficientă și totodată accesibilă.

Astfel probele au fost expuse la radiații gama utilizând o sursă de  $^{60}\text{Co}$ , doza totală de radiații fiind în jurul valorii de 8 kGy, iar apoi probele au fost investigate în ceea ce privește posibilitatea apariției unor defecte de iradiere.

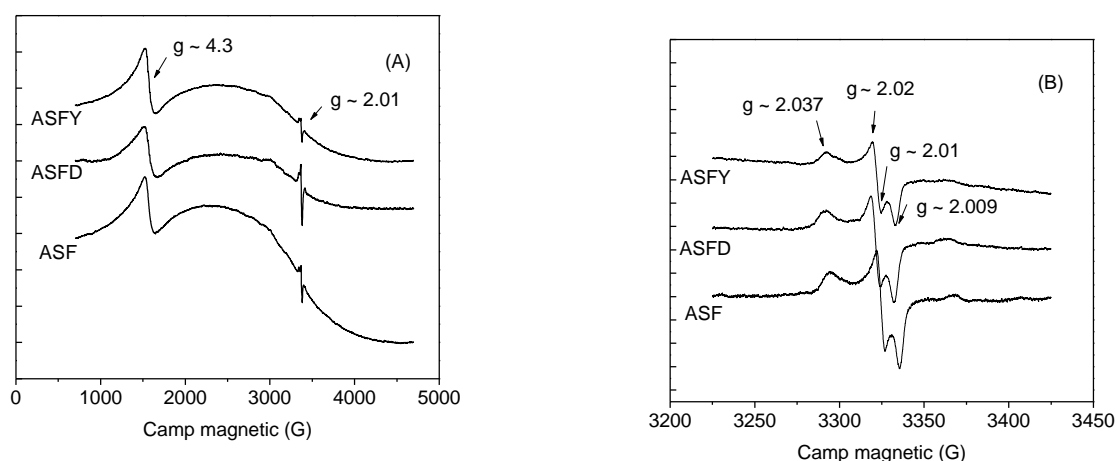
Specetrele RPE au fost înregistrate la temperatura camerei, cu ajutorul unui spectrometru RPE, tip ADANI, operând în bandă X (9.4 GHz). Câmpul magnetic a fost modulată la 100 KHz.

Principalele defecte identificate, induse prin iradierea rețelei silicatică, includ vacanțe de oxigen cum ar fi centrul  $E'$  ( $\equiv \text{Si}\cdot$ ), vacanțe de oxigen la nivelul unui oxygen nelegat-NBOHCs ( $\equiv \text{Si}-\text{O}\cdot$ ), radicali peroxidici ( $\equiv \text{Si}-\text{O}-\text{O}\cdot$ ) și "self-trapped holes" ( $\equiv \text{Si}-\text{O}\cdot-\text{Si}\equiv$ ) [25].

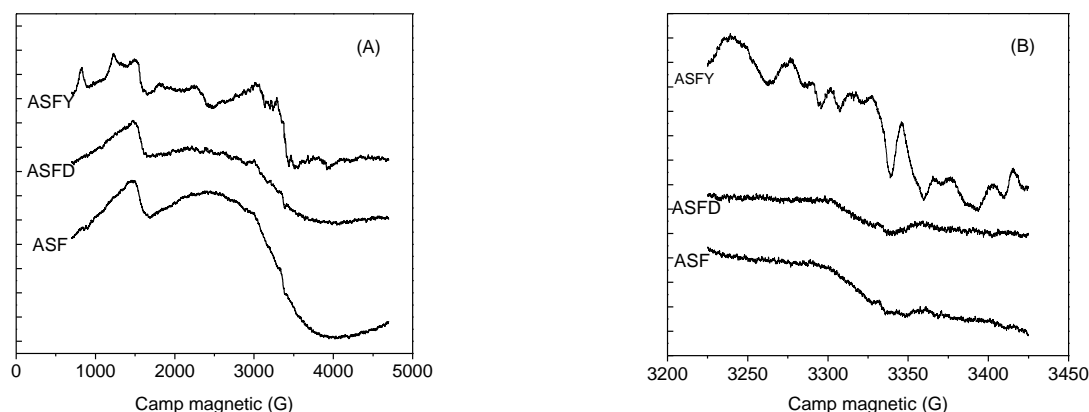
Specetrele RPE înregistrate pe probele neiradiate evidențiază doar linii corespunzătoare ionilor  $\text{Fe}^{3+}$ . Specetrele RPE în bandă X, înregistrate pe sticle cu conținut de fier, în general, scot în evidență două linii bine definite la  $g_{\text{eff}} \approx 4.3$  corespunzătoare ionilor de  $\text{Fe}^{3+}$  izolați și  $g_{\text{eff}} \approx 2$  atribuită speciilor de  $\text{Fe}^{3+}$  care participa la interacțiuni dipol-dipol (Fig. 4) [29].



**Figura 4.** Spectrele RPE înregistrate la temperatura camerei pe compușii aluminosilicatici tratați termic la  $500^\circ\text{C}$  (A) și  $1200^\circ\text{C}$  (B) înainte expunerii la radiații.



**Figura 5.** Spectrele RPE înregistrate la temperatura camerei pe compușii aluminosilicatici tratați termic la  $500^\circ\text{C}$ , utilizând un baleiaj de 4000 G (A) și respectiv 200 G (B).



**Figura 6.** Spectrele RPE înregistrate la temperatura camerei pe compuşii aluminosilicatici trataţi termic la 1200°C, utilizând un baleiaj de 4000 G (A) şi respectiv 200 G (B).

Spectrele RPE înregistrate pe sistemele iradiate gama prezintă semnale adiţionale datorate defectelor paramagnetice radioinduse, în special la nivelul sistemelor tratate termic la 500°C (Fig. 5 (A, B)).

În ceea ce priveşte valorile factorului  $g$ , prezenţa liniei spectrale la  $g \approx 2.037$  indică formarea centrilor peroxidici, iar liniile de la  $g \approx 2.02$ ,  $g \approx 2.0179$ ,  $g \approx 2.009$  pot fi atribuite la NBOHC (Fig. 5 B) [30].

Pentru sistemele cristalizate obţinute în urma tratamentului termic la 1200°C (Fig. 6 (A, B)) spectrele RPE prezintă un semnal de intensitatea redusă la  $g_{\text{eff}} \approx 2.01$ , datorită unui număr scăzut de defecte asociate vacanţelor de oxigen sau cationi, ceea ce denotă o foarte bună stabilitate a compuşilor cristalini.

Aceste analize indică faptul ca pentru probele tratate termic la 500°C, concentraţia defectelor este semnificativ mai mare comparativ cu sistemele tratate termic la 1200°C, lucru care este în foarte bună corelaţie cu faptul că tratamentul termic restabileşte structura materialului, iar defectele native evidenţiate prin expunerea la radiaţii sunt anihilate aproape în totalitate.

## 5. Funcţionalizarea probelor

Experimentele de adsorbţie a proteinelor s-au realizat prin imersarea compusului aluminosilicatic cu conţinut de fier si ytriu în soluţia de fibrinogen (Fg) preparată în PBS (soluţie tampon fosfatică) precum şi în lichid biologic simulat (SBF) îmbogăţit cu albumină serica (BSA). Proba astfel imersată a fost menţinută la 37°C timp de 5 minute, 2 ore şi respectiv 24 ore, în condiţii statice.

Compusul  $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 20\text{Fe}_2\text{O}_3$  după o mojarare fină a fost imersat în SBF, respectiv în SBF îmbogățit cu BSA în două concentrații diferite prin adăugarea a 3.33 și 6.67 g albumină liofilizată la 1 l SBF. Sistemul a fost de asemenea menținut la  $37^\circ\text{C}$  timp de 24 ore, 3 zile și respectiv 7 zile.

## 5.1 Caracterizarea probelor prin XPS și FT-IR

Funcționalizarea chimică a suprafețelor a fost determinată cu ajutorul spectroscopiei fotoelectronice de raze X (XPS) și a spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).

Măsurătorile XPS au fost realizate cu ajutorul unui sistem SPECS PHOIBOS 150 MCD echipat cu o sursă  $\text{AlK } \alpha$  monocromatică.

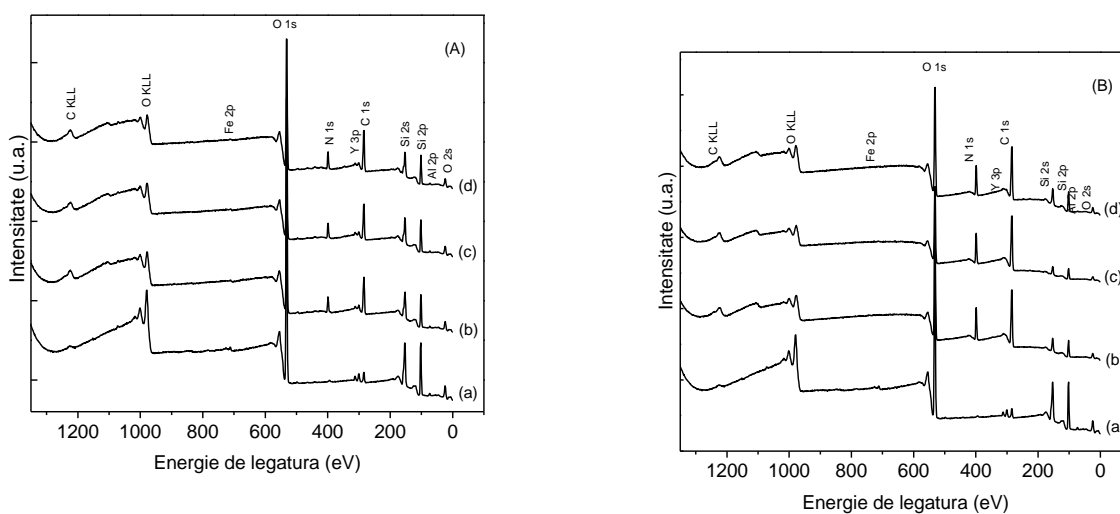
Spectroscopia în infraroșu a fost utilizată în acest studiu pentru a stabili modificările conformaționale a proteinelor adsorbite la suprafață.

Spectrele FT-IR au fost înregistrate prin atenuarea reflexiei totale cu ajutorul unui instrument Equinox 55 Bruker în intervalul  $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ , și o rezoluție de  $2\text{ cm}^{-1}$ .

Datorită faptului că proba a fost spălată cu apă ultra pură, proteinele detectate la suprafața probelor pot fi considerate legate ireversibil.

### 5.1.1 Rezultatele XPS obținute pentru sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Y}_2\text{O}_3$

Spectrul XPS survey înregistrat înainte de imersie, prezintă doar fotopicuri corespunzătoare elementelor care intră în compoziția sistemului, excepție făcând fotopicul de C 1s (Fig. 7 (A, B)). Prezența carbonului se explică prin expunerea probei în atmosferă, dar și datorită benzii dublu adezive de carbon pe care a fost immobilizată proba pentru măsurare.



**Figura 7.** Spectrele XPS survey înainte de imersie (a), și după 5 minute (b), 2 ore (c) și 24 ore (d) de imersie în soluțiile de SBF/BSA (A) și PBS/Fg (B).

După cum era de așteptat fotopicuri corespunzătoare Y 3p, Fe 2p, Si 2p și Al 2p au fost identificate pentru toate probele investigate (Fig. 7 (A, B)).

Este de remarcat faptul că pentru suprafețele funcționalizate cu proteine, detecția acestor patru elemente a fost mai puțin evidentă datorită stratului de proteină format (Tabel 2, 3). Rezultate similare au fost obținute pentru ambele proteine (BSA/Fg) utilizate pentru funcționalizare.

**Tabel 2.** Concentrația relativă a principalelor componente, înainte și după imersia în soluțiile de SBF/BSA determinată din spectrele survey.

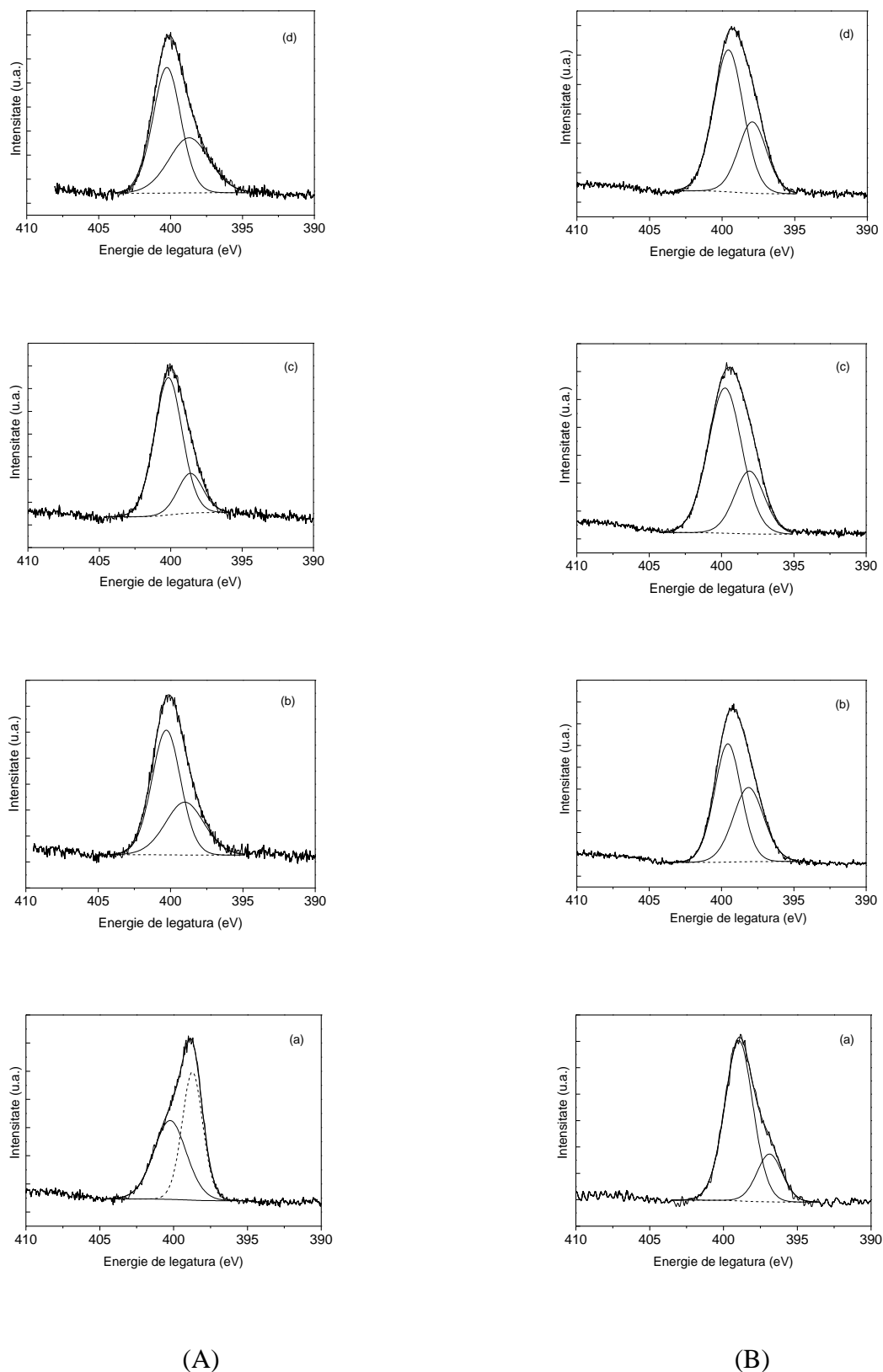
Timpul de imersie	Compoziția elementală (at %)						
	C	N	O	Al	Si	Fe	Y
0	6.92	-	53.08	2.3	36.77	0.18	0.75
5 min	28.43	5.68	37.7	2.19	25.47	0.04	0.49
2 ore	28.93	6.46	37.21	1.71	25.2	0.03	0.46
24 ore	33.21	6.67	35.16	1.54	23	-	0.42

**Tabel 3.** Concentrația relativă a principalelor componente, înainte și după imersia în soluțiile de PBS/Fg determinată din spectrele survey.

Timpul de imersie	Compoziția elementală (at %)						
	C	N	O	Al	Si	Fe	Y
0	6.92	-	53.08	2.3	36.77	0.18	0.75
5 min	43.11	10.69	29.26	0.8	15.96	0.02	0.16
2 ore	51.81	11.5	23.25	0.41	13.02	0.01	-
24 ore	48.53	13.52	27.83	0.1	10.02	-	-

În același timp analiza spectrelor survey indică fotopicuri corespunzătoare N 1s, datorat azotului prezent în fiecare aminoacid component al proteinelor. Măsurătorile XPS de concentrație de azot pot fi interpretate ca o măsură indirectă de determinare a cantității de proteină depusă la suprafață [31]. Concentrația de azot a fost practic zero înainte de imersie în soluțiile cu proteină

(Tabel 2, 3), ceea ce semnifică faptul că azotul poate fi utilizat ca un marcăr sigur al atașării proteinelor, iar raportul N:C este tipic utilizat ca un indicator al atașării proteinelor [32].



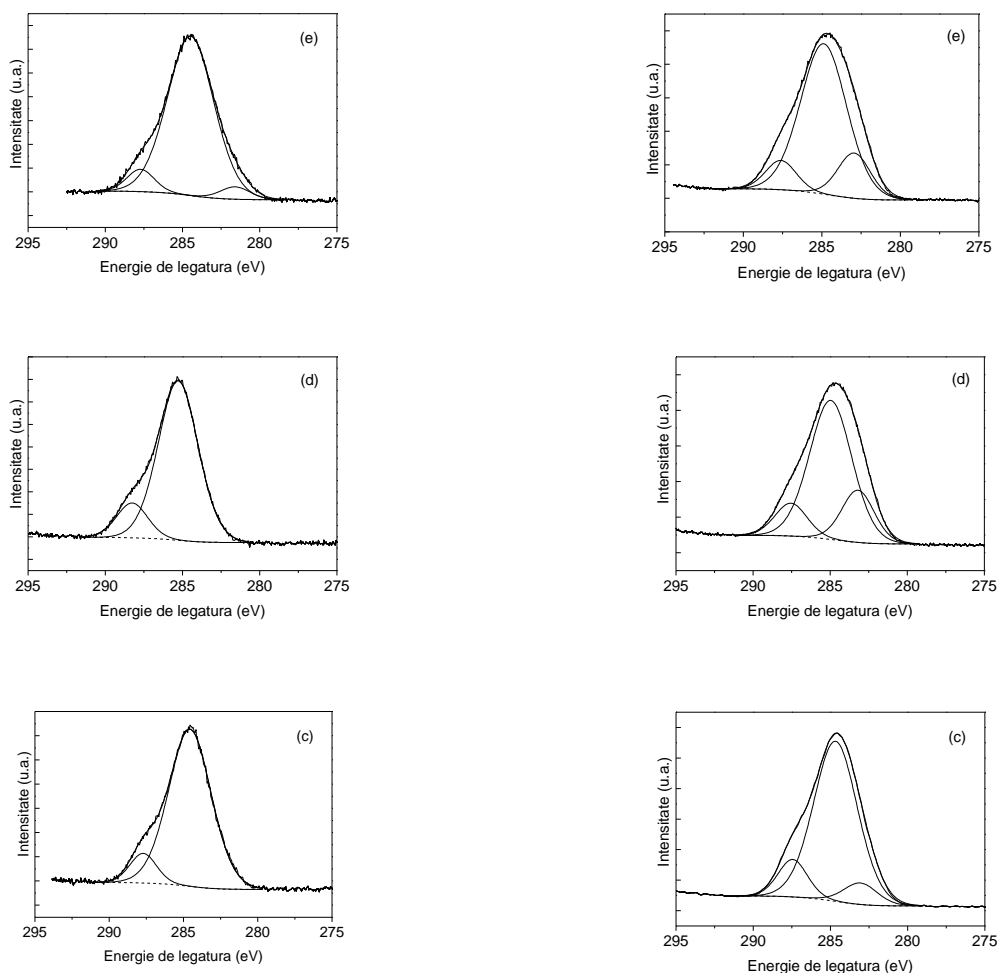
**Figura 8.** Deconvoluția spectrelor XPS de înaltă rezoluție ale N 1s pentru BSA/Fg liofilizat (a) precum și după 5 minute (b), 2 ore (c) și 24 ore (d) imersie în soluțiile de SBF/BSA (A) și PBS/Fg (B).

Deconvoluția spectrelor de înaltă rezoluție a N 1s (Fig. 8) scoate în evidență două componente, centrate la 398.2 și 400 eV, caracteristice grupărilor C-NH<sub>2</sub> [33]. Fotopicul N 1s înregistrat în apropiere 400 eV este tipic pentru azotul din matrici organice [34].

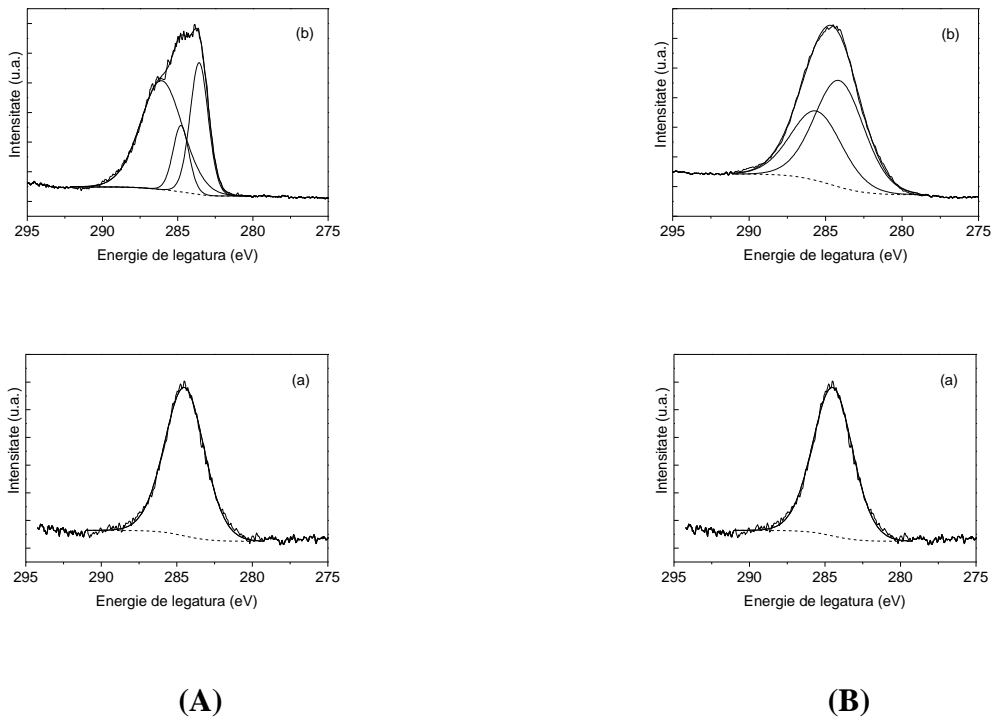
Analizele XPS confirmă creșterea conținutului de azot după diferite perioade de imersie, o proteină mai mare (Fg) va produce un semnal de azot mai intens decât o proteină mai mica ca și cea de mărimea BSA-lui.

În cazul probelor imersate în soluțiile cu proteină, semnalele de înaltă rezoluție ale C 1s (Fig. 9) apar lărgite și semnalizează formarea unor noi tipuri de legături. Fotopicurile de carbon, au fost descompuse în conformitate cu energiile de legătură ale legăturilor de carbon în proteine.

Spectrele sunt bine fitate (Fig. 9) cu componente la 284.6 eV, corespunzătoare legăturilor C-C și C-H, 286.5 eV corespunzătoare legăturii C-O și o componentă la 288.3 eV, corespunzătoare legăturii duble C=O [34, 35, 36]. Componenta la legături de energie mai joase în jur de 283 eV poate corespunde legăturii Si-C.

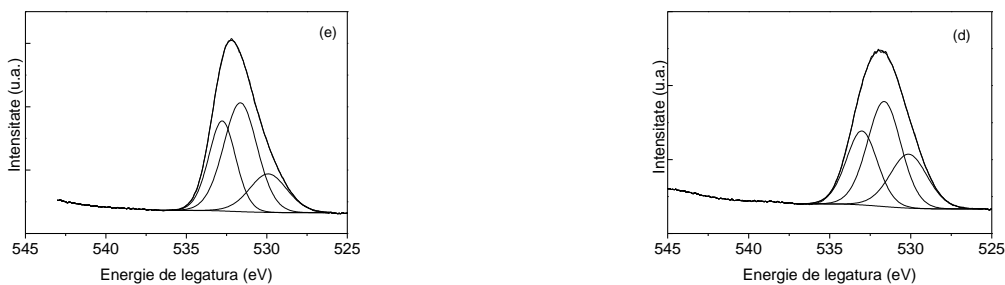


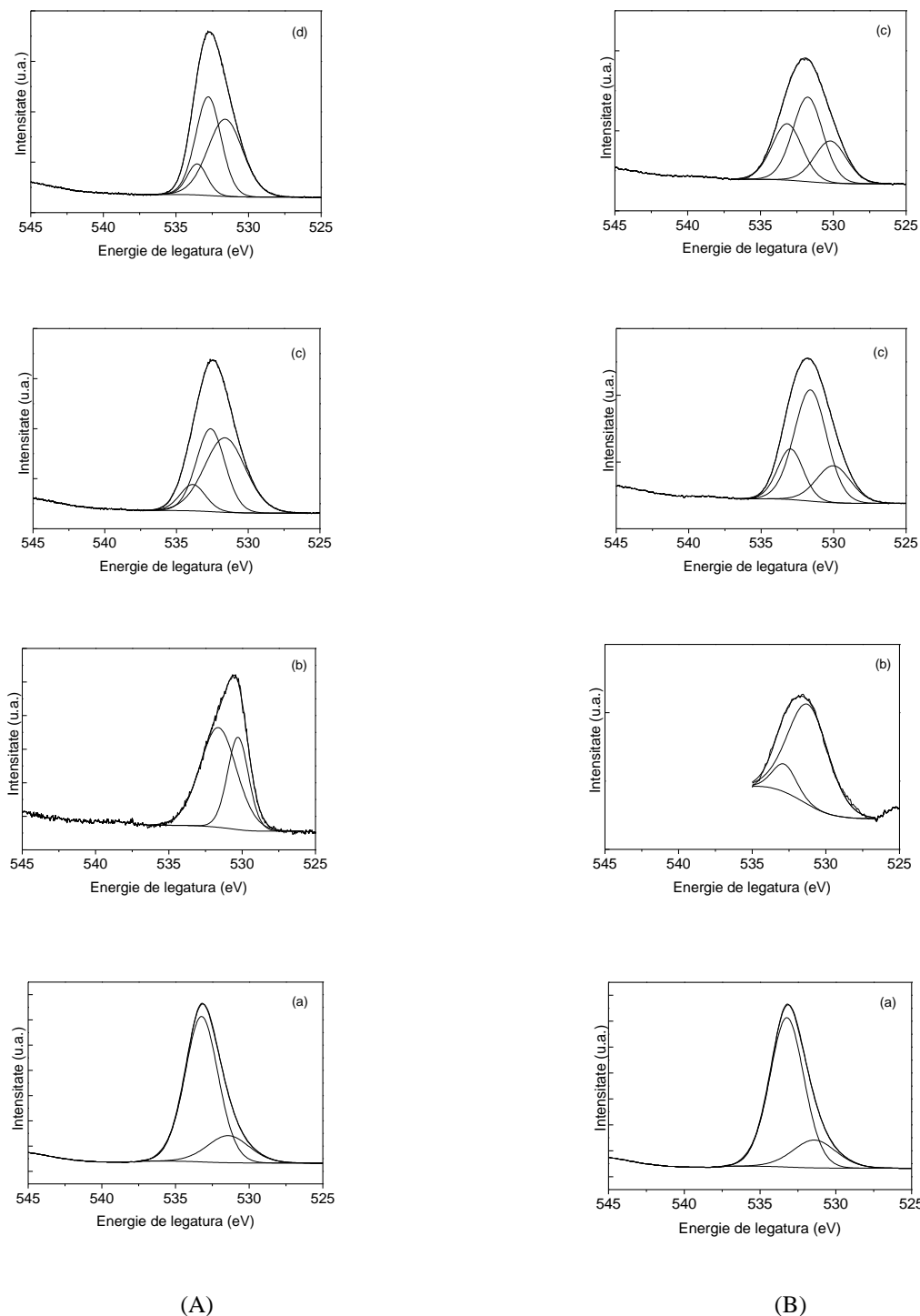




**Figura 9.** Deconvoluția spectrelor XPS de înaltă rezoluție ale C 1s pentru BSA/Fg liofilizat (a) precum și după 5 minute (b), 2 ore (c) și 24 ore (d) imersie în soluțiile de SBF/BSA (A) și PBS/Fg (B).

Semnalul O1s înainte de imersie în soluțiile cu proteină constă într-o componentă dominantă la 533.2 eV asociată legăturii Si-O-Si și o a doua componentă la energia de legătură mai mică 531.5 eV, datorate oxigenilor legați (BO) și respectiv oxigenilor nelegați (NBO) care apar în unitățile structurale ale microparticulelor aluminosilicaticice [37]. Pe baza preponderenței oxigenilor legați relativ la cei nelegați, microparticulelor aluminosilicaticice sunt considerate ca fiind stabile în mediul biologic (Fig. 10 a).





**Figura 10.** Deconvoluția spectrelor XPS de înaltă rezoluție ale O 1s pentru BSA/Fg liofilizat (a) precum și după 5 minute (b), 2 ore (c) și 24 ore (d) imersie în soluțiile de SBF/BSA (A) și PBS/Fg (B).

După imersia în soluțiile cu proteine, fotopical O 1s este evident lărgit și se deplasează spre energii de legătură mai mici, pe baza componentei albuminei de la 530.3 eV, respectiv a fibrinogenului de la 531.2 eV (Fig. 10 b). Rezultatele obținute prin deconvoluția O 1s sugerează faptul că O 1s corespunde în mare parte oxigenului peptidic al proteinelor [38].

## 5.1.2 Rezultatele FT-IR obținute pentru sistemul

### $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{Y}_2\text{O}_3$

Rezultatele spectroscopiei IR au fost analizate în raport cu structura secundară a proteinelor. Spectrele IR corespunzătoare proteinelor, prezintă benzi caracteristice, rezultate în urma vibrației legăturii peptidice, în intervalul  $4000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ .

Există trei benzi dominante, denumite Amida I ( $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) datorată în proporție de 80% vibrației de întindere a legăturii C=O, Amida II ( $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) datorată în proporție de 60% vibrației de deformare a legăturii N-H și în proporție de 40% vibrației de întindere a legăturii C-N, și Amida III ( $1200\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ ): 40% întinderea legăturii C-N și 30% modulul de deformare N-H [39, 40]. Amida I este banda cea mai des utilizată pentru a extrage informații legate de structura secundară a proteinei.

Deoarece fiecare dintre diferitele elemente de structură secundară contribuie la formarea spectrului FT-IR, benzile amidelor înregistrate sunt formate prin suprapunerea câtorva componente dintre care amintim:  $\alpha$ -helixuri, structuri  $\beta$ , precum și alte structuri aleatoare.

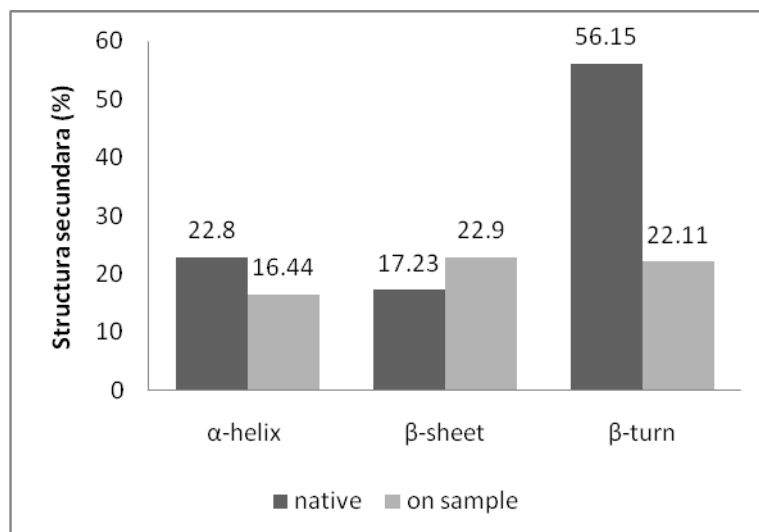
Frecvența exactă de vibrație depinde de natura legăturilor de hidrogen care implică grupările C=O și N-H, acestea în schimb determinând structura secundară particulară adoptată de proteină [41, 42, 43]. Deconvoluția benzii corespunzătoare amidei I, utilizând derivata a doua poate fi utilizată pentru a identifica numărul și poziția benzilor care compun amida [44].

Adsorbția proteinelor a fost evaluată pentru sistemul imersat timp de două ore în soluțiile SBF/BSA și PBS/Fg.

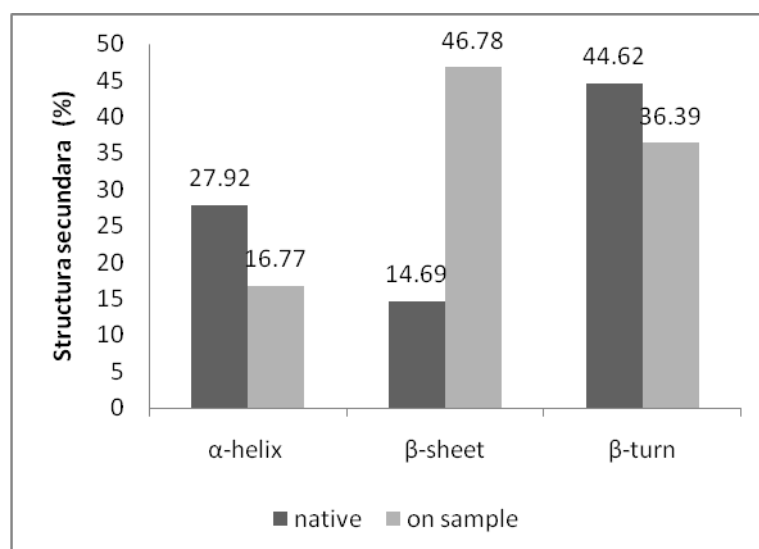
Comparativ cu albumina liofilizată, există câteva modificări conformaționale în cazul albuminei adsorbite la suprafață spre un raport (Fig. 11)  $\beta$ -sheet/ $\beta$ -turn mai mare, ceea ce indică interacțiunea proteină-suprafață și o biocompatibilitate crescută a materialului [45].

Fibrinogenul adsorbit la suprafață își modifică de asemenea structura sa nativă. Conținutul de  $\alpha$ -helix a fibrinogenului adsorbit descrește evident în favoarea structurii  $\beta$ -sheet care crește semnificativ, în timp ce structura secundară  $\beta$ -turn este mai puțin modificată.

Raportul  $\beta$ -sheet/ $\beta$ -turns, utilizat ca indicator al biocompatibilității materialului, prezintă valori mai mari în cazul fibrinogenului adsorbit la suprafață în comparație cu forma nativă a acestuia (Fig. 12), indicând o bună biocompatibilitate, lucru susținut și de alte rezultate din literatură [3].



*Figura 11. Distribuția structurii secundare a albuminei serice.*



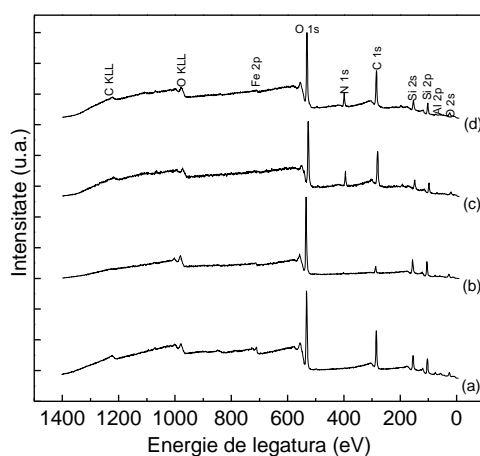
*Figura 12. Distribuția structurii secundare a fibrinogenului.*

### 5.1.3 Rezultatele XPS obținute pentru sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 20\text{Fe}_2\text{O}_3$

Atașarea proteinei din soluții cu diferite concentrații de BSA și timp îndelungat de imersie a fost testată pentru sistemul cu 20 % fier.

În scopul evidențierii proteinei la suprafață au fost analizate atât spectrele survey cât și cele de înaltă rezoluție corespunzătoare C 1s, N 1s și O 1s.

Prezența speciilor de azot este clar evidențiată doar după imersia în soluția de SBF cu proteină (Fig. 13 c).



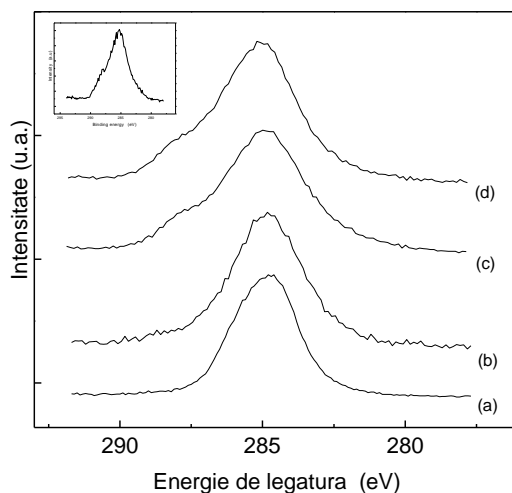
**Figura 13.** Spectrele XPS survey înainte de imersie (a), după o zi de imersie în SBF (b), în SBF îmbogățit cu BSA (c) și SBF dublu îmbogățit cu BSA.

Procentele relative ale carbonului, azotului și oxigenului după imersia în soluțiile cu proteină, determinate din spectrele survey, scot în evidență valori foarte apropiate pentru cele două concentrații diferite de BSA în SBF (Tabel 4), sugerând faptul că atașarea proteinei la suprafață este saturată chiar și prin imersia în soluții cu conținut mai scăzut de BSA.

**Tabel 4.** Procente relative de C, N și O după imersia în soluțiile de SBF, determinate din spectrele survey.

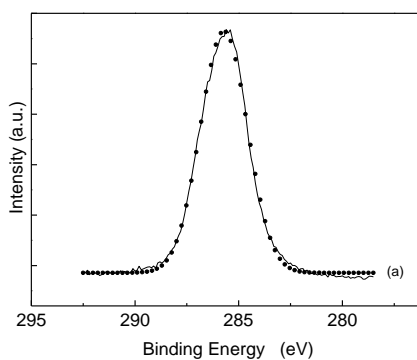
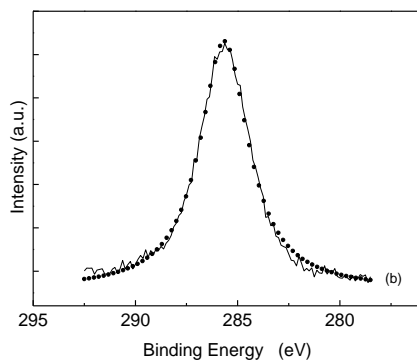
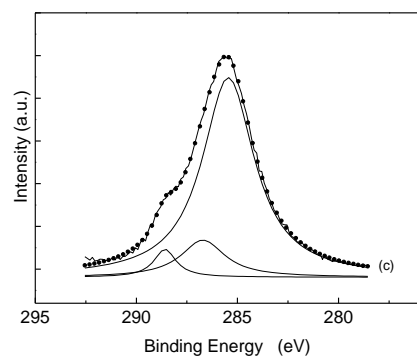
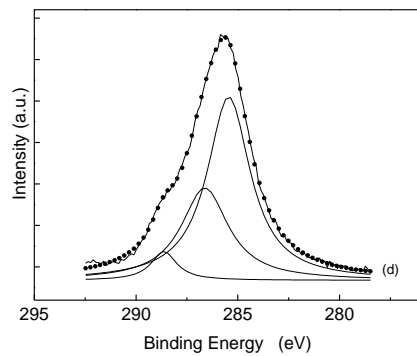
Concentrația de BSA în SBF (g/l)	Compoziția elementală (at %)		
	C	N	O
0	19	-	81
3.33	52	11	37
6.67	51	10	39

Spectrele de înaltă rezoluție ale C 1s înregistrate după imersia probelor în soluția de SBF/BSA (Fig. 14) conțin semnătura BSA după prima zi de imersie în soluția de SBF cu concentrația cea mai mică de BSA.



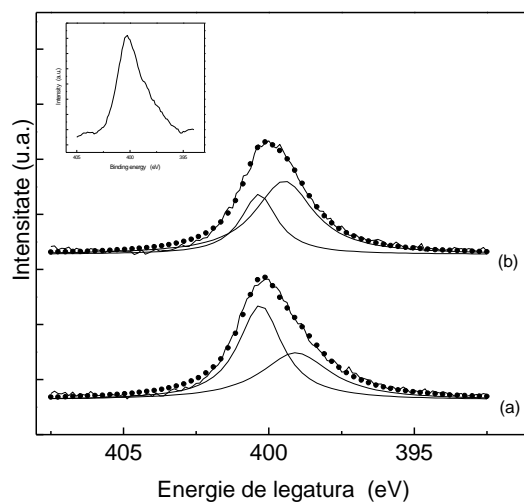
**Figura 14.** Spectrele XPS de înaltă rezoluție ale C1s înainte de imersie (a), după o zi de imersie în SBF (b), în SBF îmbogățit cu BSA (c) și SBF dublu îmbogățit cu BSA. În inlay este prezentat spectrul înregistrat pentru BSA liofilizat.

Deconvoluția fotopicurilor C 1s (Fig. 15) furnizează mai multe informații. Pentru proba neimersată s-a înregistrat doar un singur pic la 285.5 eV. După o zi de imersie în SBF, fotopicul carbonului este bine fitat cu o singură linie, dar este lărgit la 2.9 eV (Fig. 15 b), spre deosebire de lărgimea la semiînălțime corespunzătoare probei neimersate care este de 2.3 eV (Fig. 15 a). Deconvoluția fotopicurilor C 1s înregistrat pe probele imersate în soluțiile cu conținut de proteină, evidențiază pe lângă picul de la 285.5 eV alte două componente centrate la 286.7 și 288.6 eV. Este fără îndoială faptul că această contribuție crescută la energii de legătură mai mari se datorează albuminei adsorbite la suprafața compusului aluminosilicatic.

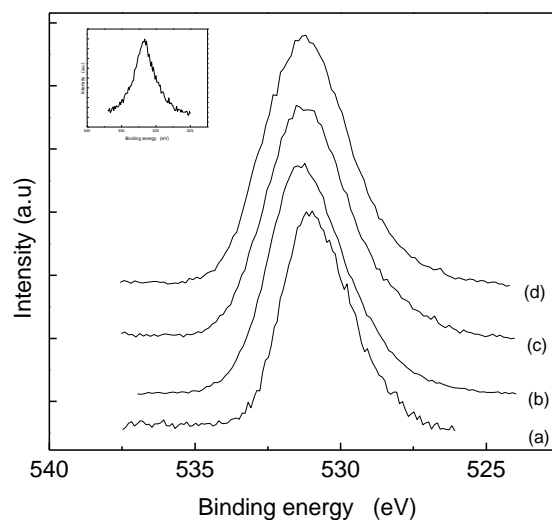


**Figura 15.** Deconvoluția spectrelor XPS de înaltă rezoluție ale C1s înainte de imersie (a), după o zi de imersie în SBF (b), în SBF îmbogățit cu BSA (c) și SBF dublu îmbogățit cu BSA.

Azotul a fost înregistrat doar pentru probele imersate în soluțiile de SBF cu BSA (Fig. 16). Deconvoluția fotopicurilor corespunzătoare N 1s prezintă și în acest caz două componente centrate la 400.3 eV (datorată legăturii C-N) [46, 47] și 399.1 eV.



**Figura 16.** Spectrele XPS de înaltă rezoluție ale N 1s înainte de imersie (a), după o zi de imersie în SBF (b), în SBF îmbogățit cu BSA (c) și SBF dublu îmbogățit cu BSA. În inlay este prezentat spectrul înregistrat pentru BSA liofilizat.



**Figura 17.** Spectrele XPS de înaltă rezoluție ale O 1s înainte de imersie (a), după o zi de imersie în SBF (b), în SBF îmbogățit cu BSA (c) și SBF dublu îmbogățit cu BSA. În inlay este prezentat spectrul înregistrat pentru BSA liofilizat.



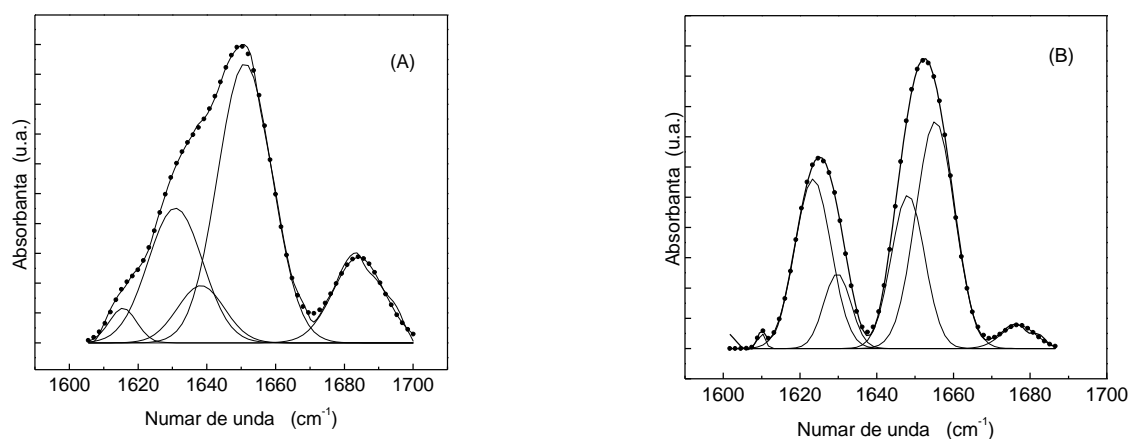
În ceea ce privește oxigenul, spectrele de înaltă rezoluție se prezintă sub forma unor picuri simetrice bine fitate cu o singură linie (Fig. 17) și care cuprind contribuții datorate atomilor de oxigen de la suprafața probelor aluminosilicatică, grupărilor –OH adsorbite la suprafață din umezeala atmosferică, dar și contribuția datorată oxigenului peptidic constituent al proteinei [38].

Lărgimea la semiînălțime a fotopicului de O 1s înregistrat pentru proba neimersată este de 2.3 eV și crește la 2.7 eV pentru proba imersată în SBF pur și la 2.9 după imersia în soluțiile de SBF/BSA, cu cele două concentrații diferite. Această lărgime a liniei sugerează o largă distribuție a poziției oxigenului.

#### 5.1.4 Rezultatele FT-IR obținute pentru sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot 20\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 20\text{Fe}_2\text{O}_3$

Caracteristicile spectrului FT-IR înregistrat pe proba introdusă în SBF îmbogățit cu BSA sunt bine evidențiate în cazul probei imersate timp de 7 zile în soluția cu conținut de 6.67 g BSA / l SBF.

Deconvoluția amidei I corespunzătoare albuminei liofilizate și a albuminei adsorbite la suprafață este prezentată în figura 18 A, B.

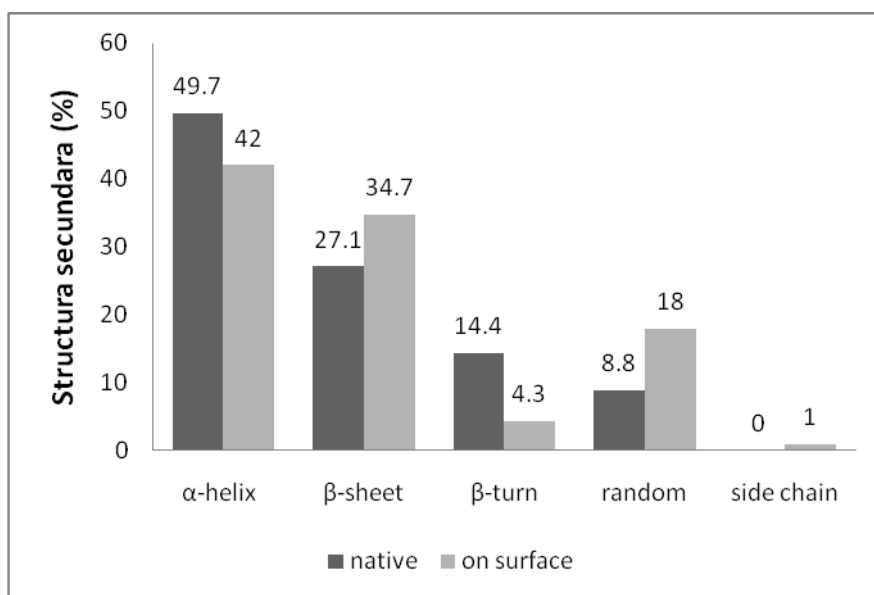


**Figura 18.** Deconvoluția benzii de absorbție a amidei I corespunzătoare albuminei liofilizate (A) și a albuminei adsorbite la suprafață (B).

Deconvoluția amidei I a albuminei native s-a realizat presupunând cinci componente, în timp ce pentru albumina adsorbită au fost considerate șase componente (Fig. 19 A, B). În literatura recentă [44], procedura de fitare arată că șase sau cinci componente trebuie utilizate pentru suprafețe hidrofile sau hidrofobe.

Apariția unei noi benzi în jurul valorii  $1610\text{ cm}^{-1}$  poate fi atribuită structurii  $\beta$  intermoleculare, care este un indicativ al agregării proteinei. Se poate observa din datele rezumate în

figura 19, conținutul de  $\beta$ -sheet crește de la 27.1 % în starea liofilizată la 34.7 % după adsorbție, la fel și conformațiile aleatoare care cresc de la 8.8 % la 18 %. În același timp, componenta  $\alpha$ -helix descrește de la 49.7 % la 42 % după adsorbție, iar  $\beta$ -turn de la 14.4 % la 4.3 %.



**Figura 19.** Distribuția structurii secundare în BSA.

Raportul  $\beta$ -sheet/  $\beta$ -turns și în acest caz prezintă valori mai mari pentru proteina adsorbită comparativ cu cea nativă, indicând o bună biocompatibilitate a materialului [44].

Astfel adsorbția albuminei la suprafață a fost încă o dată confirmată de rezultatele obținute în infraroșu [49, 50].

## Concluzii

- Prin metoda sol-gel au fost preparate sisteme omogene aluminosilicaticice cu conținut de fier și pământuri rare (ytriu și disprosiu).
- După tratamentul termic, fierul cristalizează preponderent sub formă de hematită, dar magnetita și maghemita sunt de asemenea dezvoltate, așteptându-se astfel un comportament feromagnetic al compușilor. Cristalitele dezvoltate sunt de dimensiuni nanometrice.
- Măsurătorile de moment magnetic ca funcție de câmp magnetic aprobă comportamentul feromagnetic așteptat.
- Dependența de temperatură a magnetizării arată pentru sistemele ASF și ASFD o temperatură Curie în jurul valorii de 430 K și respectiv 711 K.
- După expunerea gama a sistemelor, au fost evidențiați prin spectroscopie RPE centrii ai vacanțelor de oxigen (NBOHC) și centrii peroxidici.
- S-a evidențiat faptul că aceste defecte paramagnetice pot apărea în timpul preparării compușilor și pot fi identificate prin expunerea la radiații gama, concentrația lor scăzând pe măsură ce temperatura tratamentul termic crește, ca dovadă a creșterii stabilității sistemului în ceea ce privește inducerea de defecte prin iradiere.
- Prima evidență a interacțiunii microparticulelor cu proteina este prezența în spectrele XPS a fotopicului de N 1s, a cărei intensitate crește pe parcursul perioadei de incubare de la 5 minute la 24 ore.
- Această interacțiune este semnalizată și prin scăderea semnificativă a cantităților procentuale ale principalelor elemente constitutive ale sistemelor preparate.
- După incubarea probelor în soluțiile cu proteină, spectrele de înaltă rezoluție ale C 1s conțin componente la energii de legătură specifice carbonului peptidic.
- Semnalul O 1s înainte de imersie în soluțiile cu proteină este datorat oxigenilor legați (BO) și oxigenilor nelegați (NBO), a căror preponderență presupune o bună stabilitate a microparticulelor aluminosilicate în mediul biologic.
- După imersia în soluțiile cu proteină, conținutul diminuat al O 1s corespunde semnificativ oxigenului peptidic constituent al proteinelor, datorită atașării la suprafața a albuminei sau fibrinogenului cu un conținut scăzut în oxigen.
- Concentrația proteinei în SBF influențează formarea stratului de BSA, dar după o scurtă perioadă de imersie suprafața este aproape saturată în ceea ce privește atașarea grupărilor funcționale ale albuminei, indiferent de concentrația acesteia în SBF.

- Analizele benzilor de absorbție FT-IR, caracteristice structurii secundare a proteinei, arată o creștere a valorilor raportului  $\beta$ -sheet/ $\beta$ -turns în cazul proteinelor adsorbite comparativ cu cele native, ceea ce indică o bună biocompatibilitate a acestor materiale.
- Atașarea albuminei și a fibrinogenului este dovedită prin structura  $\beta$ -sheet a amidei I la  $1650\text{ cm}^{-1}$ , prin schimbările spectrale în jurul valorii  $1540\text{ cm}^{-1}$ , atribuită amidei II și  $1320\text{ cm}^{-1}$  atribuită amidei III.
- Astfel, rezultatele acestui studiu evidențiază faptul că sinteza acestor microparticule aluminosilicatici nanostructurate cu conținut de fier și ytriu/disprosiu pot fi utile în potențiale aplicații simultane de hipertermie și radioterapie.

## Bibliografie selectivă

- [1]. S.V. Bhat, *Biomaterials*, Alpha Science, Harrow U.K. 2005.
- [2]. H. F. Hildebrand, N. Blanchemain<sup>1</sup>, G. Mayer, Y. M. Zhang, O. Melnyk, M. Morcellet and B. Marte, *Key Engineering Materials Vols. 288-289*, 47-50, 2005.
- [3]. I. D. Xynos, A. I. Edgar, L. D. K. Buttery, L. L. Hench, J. M. Polak, *J. Biomed. Mater. Res*, 55, 151, 2001.
- [4]. L.L. Hench, D.E. Day, W. Holand, V.M. Rheinberger, *Glass and Medicine, Int J Appl Glass Sci*; 1:104–117, 2010.
- [5]. D. Day, *Am Ceram Soc Bull*; 74: 64-68, 1995.
- [6]. J.K. Bibby, N.L. Bubb, D.J. Wood, P.M. Mummery, *J Mater Sci: Mater Med*; 16:379– 385, 2005.
- [7]. V. Simon, D. Eniu, A. Gritco, S. Simon, *J Optoelectr Adv Mater* ; 9: 3368-337, 1, 2007.
- [8]. R.F. Brown, L.C. Lindesmith, D.E. Day, *Int. J. Rad. Appl. Instrum B*, 18, 783, 1991.
- [9]. S.W. Lee, W.D. Reece, *Phys. Med. Biol.*, 50, 151, 2005.
- [10]. J.E. White, D.E. Day, *Key Eng. Mat.*, 94-95, 181, 1994.
- [11]. M. Kawashita, H. Takaoka, T. Kokubo, T. Yao, S. Hamada, T. Shinjo, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 109, 39, 2001.
- [12]. S. K. Alpard et al, *Perfusion*, 11, 425-435, 1996.
- [13]. J. M. Anderson, B. Bevacqua, A. N. Cranin, D. Whittlesey, Academic Press, London, 415–420, 1996
- [14]. M. Baciut, G. Baciut, V. Simon, C. Albon, V. Coman, P. Prodan, St. I. Florian, S. Bran, *J. Optoelectr. Adv. Mat.*, 9, 2547, 2007.
- [15]. M. Goldman, L. Pruitt, *J. Biomed Mater Res.*, 40, 378, 1998.
- [16]. E. M. Noah, J. Chen, X. Jiao, I. Heschel, N. Pallua, *Biomaterials*. 23, 2855, 2002.
- [17]. M. Takechi, Y. Miyamoto, Y. Momota, T. Yuasa, S. Tatehara, M. Nagayama, K. Ishikawa, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl Biomater.*, 69, 58, 2004.
- [18]. S. Lerouge, C. Guignot, M. Tabrizian, D. Ferrier, N. Yagoubi, L. Yahia, *J. Biomed. Mater. Res.*, 52, 774, 2000.
- [19]. P. D. Nair, *J. Biomater. Appl.*, 10, 121, 1995.
- [20]. R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Bunk, R. H. Muller, J. M. Verbavatz, R. Langer, *Advanced Drug Delivery reviews*, 16, 215 – 233, 1995.
- [21]. C. C. Berry, S. Adams, G. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, 198- 206, 2003.
- [22]. L. Tang, A.H. Lucas, J.W. Eaton, *J Lab Clin Med*; 122(3): 292-300, 1993.
- [23]. L. Tang L, J. W. Eaton, *Am J Clin Pathol*; 103(4): 466-71, 1995.

- [24]. V. Balasubramanian *et al.*, J Biomed Mater Res; 44(3): 253-60, 1999.
- [25]. D.L. Griscom, Science and Technology, Eds. G. Pacchioni, L. Skuja and D.L. Griscom, Kluwer Academic Publishers, p. 117, 2000.
- [26]. S.H. Hyun, S.C. Yi, S. G.Kim, J Mat Sci Lett; 15:1384-1387, 1996.
- [27]. F. He, W.T. Petuskey, Mater Lett; 63:2631-2634, 2009.
- [28]. Y. Sun, L. Duan, Z. Guo, Y. Duanmu, M. Ma, L. Xu. J Magn Magn Mater;285:65-70, 2005.
- [29]. V. Simon *et al.*, J. Non-Cryst. Solids 351, 2365-2372, 2005.
- [30]. D. Cacaina, H. Ylänen, D. A. Udvar, S. Simon, J. Optoelectr. Adv. Mater., 9, 675, 2007.
- [31]. A. Arvidsson, F. Currie, P. Kjellin, Y.T. Sul, V. Stenport, J Mater Sci: Mater Med; 20:1869-1879, 2009.
- [32]. S.L. McArthur, Surf Interface Anal; 38:1380–1385, 2006.
- [33]. M. Advincula M, Fan X, Lemons J, Advincula R, Colloid Surface B;42:29-43, 2005.
- [34]. A. P. Serro, M.P. Gispert, M.C.L. Martins, P. Brogueira, R. Colaco, B. Saramago, J Biomed Mater Res;78A:581-589, 2006.
- [35]. A. Lebugle, M. Subirade, J. Gueguen, BBA Protein Struct Mol Enzymol; 1248:107-114, 1995.
- [36]. D.D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, Sotiropoulou D, Amedee J, Missirlis YF, Biomaterials; 22:1241-1251, 2001.
- [37]. G. Speranza, M. Ferrari, M. Bettinelli, Philos Mag B; 79:2145-2155, 1999.
- [38]. G. Iucci, G. Polzonetti, G. Infante, L. Rossi, Surf Interface Anal; 36:724-728, 2004.
- [39]. G. Reiter, N. Hassler, V. Weber, D. Falkenhagen, U.P. Fringeli, Biochim. Biophys. Acta 1699, 253-261, 2004.
- [40]. G.Falini, E.Foresti, I.G.Lesci, B.Lunelli, P.Sabatino, N.Roveri, Chem.Eur.J.12, 1968-74, 2006.
- [41]. W.J. Yang, P.R. Griffiths, D.M. Byler, H. Susi, Appl. Spectrosc. 39, 282-287,1985.
- [42]. D.M. Byler, H. Susi., Biopolymers 25, 469-487, 1986.
- [43]. C.K. Krishnan, Biomaterials 19, 357-369, 1998.
- [44]. S. Tunc, M.F. Mainz, G. Steiner, L. Vazquez, M.T. Pham, R. Salzer, Colloid Surface B: Biointerfaces 42, 219-225, 2005.
- [45]. K. K. Chittur, Biomaterials 19, 357-369, 1998.
- [46]. F. Zhang, R.J. Gates, V.S. Smentkowski, S. Natarajan, B.K. Gale, R.K. Watt, M.C. Asplund, M.R. Linford, J. Am. Chem. Soc. 129, 9252, 2007.
- [47]. M.A.Z. Ewiss, Phys.Chem. Glasses 39 (4), 236, 1998.
- [48]. V. Simon, D. Muresan, A.F. Takács, M. Neumann, S. Simon, Solid State Ionics 178, 221, 2007.
- [49] V. Simon, S. Cavalu, S. Simon, H. Mocuta, **E. Vanea**, M. Prinz, M. Neumann, Solid State Ionics, 180, 764–76, 2009.

[50]. V. Simon, S. Cavalu, M. Prinz, **E. Vanea**, M. Neumann, S. Simon, European Cells & Materials, 16, S1, 55, 2008.