# **Studiul unor biomateriale composite**

# Rezumat

Facultatea de Fizica

Doctorand: Adriana Vulpoi Coordonator ștințific: Prof. Dr. Viorica Simon Cuprins

Introdu	Introducere				
1	Compozite pe bază de sticlă bioactivă și argint	4			
1.1	Prepararea sticlelor bioactive	4			
1.2	Caracterizarea sticlelor bioactive obținute	5			
1.2.1	DTA/TG	5			
1.2.2	XRD	7			
1.2.3	IR	7			
1.2.4	Studii de suprafață specifică și porozimetrie	8			
1.2.5	UV-vis	10			
1.2.6	TEM	12			
1.3	Studii de bioactivitate	13			
1.3.1	XRD	13			
1.3.2	FTIR	14			
1.3.3	SEM/EDS	15			
1.3.4	XPS	16			
1.4	Studii antibacteriene	19			
1.5	Functionalizare cu protein a sticlelor bioactive	19			
1.5.1	RES	20			
1.5.2	XPS	22			
2	Compozite de polimeri și sticle bioactive cu Ag	24			
2.1	Fabricarea textilului din polimeri	24			
2.2	Obținerea compozitelor de polimer cu sticle bioactive	24			
2.3	Caracterizarea	25			
2.3.1	SEM	25			
2.3.2	DTA/TG	27			
2.4	Bioactivitatea	29			
2.4.1	SEM	29			
2.4.2	XRD	32			
2.4.3	XPS	32			
2.4.4	IR	34			
2.5	Efectul antimicrobian	34			
CONCLU	CONCLUZII				
Concluz	Concluzii generale				
Referin	leferințe				
Mulțumiri					

## INTRODUCERE

Scopul acestei teze este de a sintetiza biomateriale compozite pentru eventuale aplicații în recontrucția țesuturilor. Ingineria țesutulrilor este un domeniu interdisciplinar, care aplică principiile științelor exacte și ale inginerie pentru dezvoltarea de substitute biologice care au ca scop menținerea, restaurarea sau imbunătațirea funcției țesuturilor. Materialele biodegradabile și-au găsit o întrebuințare foarte importantă ca și suporturi pentru creșterea naturală a țesuturilor, aceste suporturi disparand odată cu trecerea timpului din locul unde au fost implantate, lăsând in urmă un sprijin pentru regenerarea țesuturilor. Prin urmare, această teză se bazează pe pregătirea și caracterizarea unor compozite biodegradabile, bioactive si cu proprietăți antibacteriene formate din polimeri și sticle bioactive cu conținut de argint.

Proprietatea bioactivă a acestor compozite este data de sticla bioactivă având formula  $56SiO_2 \cdot (40-x)CaO \cdot 4P_2O_5 \cdot xAg_2O$ , cu x = 0, 2, 4, 6, 8 respectiv 10 mol%. Metoda de preparare utilizată pentru obținerea sticlelor bioactive a fost metoda sol-gel deoarece aceasta permite prepararea acestora la temperaturi scăzute precum și o controlabilitate mai bună a structurii și morfologiei sticlelor bioactive. Această metodă de preparare a permis de asemenea introducerea agentului antibacterian în sctructura sticlei, conferindui acsteia un caracter de compozit, conținând în matricea aproape amorfă de sticlă nanoparticule de argint ca fază dispersată.

Componenta biodegradabilă este dată der copolimerul Poly-96L/4 D-lactide cu o structura poroasa. S-a folosit metoda slurry dipping pentru obtinerea compozitelor de polimer cu biosticlă.

Teza este structurată pe patru capitole precedate de preyenta introducere și finalizată cu concluzii. Fiecare capitol in parte este urmat de referințe.

Partea de introducere contine motivatia si principalele obiective ale acestei teze. Primul capitol este dedicat biomaterialelor incepand cu o definire a acestora si o privire generala asupra acestui vast domeniu insinstant pe sticle bioactive, polimeri si compozite ale acestora ca s biomateriale. Capitolul doi cuprinde o descriere scurta a technicilor utilizate pentru analiza acestor materiale. In capitolul trei sunt descrise metodele experimentale folosite atata pentru prepararea cat si pentru analiza probelor. In capitolul patru sunt prezentate rezultatele experimentale si discutii pe seama acestora.

# 1 COMPOZITE PE BAZĂ DE STICLĂ BIOACTIVĂ ȘI ARGINT

Una din scopurile acestei teze a fost evaluarea specilor de argint incorporate in matricea de biosticlă atât inainte cât și după incubarea în lichid biologic simulat (SBF), precum si a vedea modificările structurale și morfologice induse de adiția argintului. O atentie speciala a fost acordată și determinării felului in care conținutul de argint influențeaza bioactivitatea sticlelor și investigarea abilității proteinelor de a se atasa de sticlele bioactive cu continut de argint.

### **1.1** Prepararea sticlelor bioactive

Probele care fac parte din sistemul de  $56SiO_2 \cdot (40-x) CaO \cdot 4P_2O_5 \cdot xAg_2O$  cu x = 0, 2, 4, 6, 8 şi 10 % molare au fost pregătite prin metoda sol-gel.Gelurile au fost obținute prin hidroliza și condensarea tetraetil orthosilicatului (TEOS), azotat de calciu tetrahidrat (Ca (NO<sub>3</sub>) <sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O) fosfat de amoniu dibazic ((NH<sub>4</sub>) 2HPO<sub>4</sub>) și nitrat de argint (AgNO<sub>3</sub>).

În primul rând a fost preparată matricea de sticlă bioactivă având compoziția  $56SiO_2 \cdot 40CaO \cdot 4P_2O_5$ . Acesta a fost notată în continuare proba cu x = 0. Penttru acest scop, s-a amestecat TEOS cu etanol într-un raport de greutate de 1:1 și s-a lasă pe un agitator magnetic la temperatura camerei timp de o oră. În acest timp precursorii pentru P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> și Ca<sub>2</sub>O au fost dizolvați în apă distilată fiecare și lăsați pe agitatoare magnetice pentru 30 de minute, de asemenea, la temperatura camerei. După o oră, cele trei soluții clare au fost amestecate între ele. PH-ul soluției finale a fost ajustat la 1.5 cu acid azotic (HNO<sub>3</sub>), și si lasat pe un agitator magnetic pentru alte două ore după care soluția a fost transferata intr-un incubator și ținută acolo timp de șapte zile, în scopul de a obține gel, respectiv maturarea acestuia. Gelurile astfel obținute au fost pe o sticle de ceas și uscate într-un cuptor la 110 ° C timp de 24 de ore în scopul eliminării excesului de apă și de alcool obținute din hidroliza.

Probele care conțin argint au fost pregătite similare cu proba fără argint. Acest probe au fost numite x = 2, x = 4, x = 6, x = 8 si x = 10, respectiv, în strânsă legătură cu concentrația de argint adăugată. Ag<sub>2</sub>O a fost introdus prin substituirea parțială de CaO. Precursorul pentru Ag2O a fost, de asemenea, dizolvat în apă distilată, dar de data aceasta pH-ul soluției a fost ajustată la 2 cu acid azotic, pentru a evita precipitarea. În acest caz, prima soluție adăugată la soluția de TEOS solutia care continea argint. Restul protocolului de pregătire a fost același cu cea pentru proba fără argint.

După uscare, toate probele au fost fost tratate termic la 580 ° C timp de 1/2h. Probele au fost introduse în cuptorul preîncălzit și scoase după 30 de minute.

#### **1.2** Caracterizarea sticlelor bioactive obținute

Metodele de analiză termica diferențiată (DTA) și termogravimetrică (TGA) au fost folosite pentru a înțelege modul în care prezența argintului influențează evenimentele termice, în timp ce difracția de raze X (XRD), spectroscopiia în infrarosu (FTIR) au fost aplicate pentru a determina atât fazele cristaline dezvoltate cât și schimbările structurale generate în interiorul matricei de sticla odata cu adaugarea cantităților mari de argint. Particularitățile texturale ale probelor investigate au fost determinate prin efectuarea de măsurători de adsorbție de N<sub>2</sub>. Forma și distribuția dimensiunilor particulelor de argint situate în interiorul matricei de sticlă au fost studiate cu ajutorul microscopului electronic in transmisie (TEM)si al spetroscopiei UV-VIS.

#### 1.2.1 DTA/TG

Curbele TGA / DTA pe probele uscate la 110°C sunt prezentate în Fig. 1. Primul eveniment endoterm, ce apare la toate probele, în jurul valorii de 60-80 ° C asociat cu pierdere de masă corespunde la eliminarea de apă și a lichidului rezidual din pori [1]. Evenimentul exoterm cu un debut în jurul valorii de 277 ° C ar putea fi asociat eliminarii reziduurilor organice. Un semnal relativ intens endoterm apare în curbele DTA în jurul valorii de 485 ° C pentru probele cu x = 4 și x = 6 și ar putea fi asociat cu descompunerea oxidului de argint și, eventual cu formarea de nanoparticule de argint metalic. Prezența acestui eveniment nu poate fi exclus nici in cazul probelor cu conținut mai mare de argint (x = 8 si x = 10), atâta timp cât evenimentul situat în jurul valorii de 500 ° C devine mai pronunțat și poate acoperi evenimentul de la 485 ° C. Evenimentele endoterme dinintervalul 540-550 ° C, care apar pentru probele cu  $0 \le x \le 6$ , sunt, în principal din cauza dehidroxilării și sunt asociate cu pierderi de masă precum se observă în curbele TGA [2]. Evenimentele termice corespunzătoare formarii nanocristalelor de argint metalic și dehidroxilării se suprapun odata cu cresterea cantității de argint (x = 8 si x = 10) avnand un maxim în jurul valorii de 500 ° C.



**Fig. 1** Curbele TG/DTA ale probelor 56Si0<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O samples. Curba DTA reprezentată de linia de deasupra (negru), iar linia de jos semnalul TG (roșu)

#### 1.2.2 XRD

Difractogramele XRD a probelor investigate sunt prezentate în Fig. 2. Acestea au un caracter predominat amorf specific sticlelor, dar prezintă și faze incipiente de cristalizare a fosfatului tricalcic (TCP) faza de identificată ca fiind Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>) <sub>2</sub> centrat la 2  $\theta$  = 32 ° [1, 2].



Fig. 2 Difractograme XRD aleprobelor 56Si0<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O

Acest rezultat sugerează faptul că încorporarea unei asemenea cantități mari de argint in matricea  $SiO_2$ -CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nu compromite bioactivitatea acesteia. Difractogramele XRD ale probelor cu continut de argint mai mare de 4 % molar prezinta un caracter de compozit, avand ca farză dispersată in matricea de sticlă argint metalic. Aceste probe prezinta de asemenea, faze cristaline de Ag<sub>2</sub>O constând din cristalite foarte mici, care sunt mai puțin vizibil pe măsură ce crește conținutul de argint. Acest lucru este în acord cu ipoteza dată mai susla analiza DTA cu privire la evenimentul endoterm situat în jurul valorii de 485 ° C, care a fost asociată cu formarea nanoparticulelor de argint. Deasemenea, se observă că creșterea conținutului de argint duce la creșterea cantității de argint metalic din proba așa cum era preconizat.

#### 1.2.3 IR

Spectrele IR prezentate în Fig. 3 arată existența unor unități Q4 (1200-1260 cm-1) în toate probele. Nu se pot observa schimbari semnifivcative in spectrele IR ale sticlelor bioactive odata cu adaugarea argintului.



Fig. 3 FTIR spectra of the  $56Si0_2 \cdot (40-x)CaO \cdot 4P_2O_5 \cdot xAg_2O$  samples

În intervalul 550-610 cm<sup>-1</sup> pot fi observate semnale spectrale de absorbție asociate cu vibrații PO. Un puternic semnal IR situat între 850 și 1250 cm<sup>-1</sup> domina spectrele și este dat de modurile vibrationale de intindere ale tetraedrelor SiO<sub>4</sub> și PO<sub>4</sub>. Umărul situat în jurul valorii de 1233 cm<sup>-1</sup> poate fi atribuită vibrației se întindere a grupării Si-O-Si [7]. Semnalul de absorbție situat la 1090 cm<sup>-1</sup> este atribuit la modulului de intindere Si-O (Q<sub>3</sub>), în timp ce umăr centrat la 930 cm<sup>-1</sup> este dat de vibratie a doi atomi de oxigen nepuntati în rețeaua Si-O-Si (unități Q2) [8, 10]. Vibrațiile gruparii silanol dau naștere la un semnal la 960 cm<sup>-1</sup>, care esteconvolutionat cu semnalul dat de vibrațiile unitătilor Q<sub>2</sub> [11, 12]. Semnalul IR la aproximativ 1034 cm<sup>-1</sup> pot fi asociat cu modului de intindere a unitatilor PO din tetraedrul PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Un alt semnal de absorbție intens se observa la 470 cm<sup>-1</sup> și poate fi atribuit la mișcări de rotație a atomilor de oxigen perpendicular pe planul Si-O-Si [7]. Banda de adsorbtie centrata in jurul valorii de 800cm<sup>-1</sup> se poate asocia vibrației de intindere a oxigenilor puntați perpendiculari pe bisectoarea grupului Si-O-Si [7]. Un dublet corespunzător vibratieii asimetrice de îndoire a grupării PO din tetraedrul PO<sub>4</sub> se poate oobserva la 567 respeciv 601 cm<sup>-1</sup> [13].

#### 1.2.4 Studii de suprafață specifică și porozimetrie

Pentru o mai bună înțelegere a distribuției argintului în matricea de sticlă, au fost efectuate si masuratori de porozimetrie. În conformitate cu clasificarea IUPAC izotermelor obținute pe probele analizate sunt de tip IV și izoterme de tip II, ceea ce înseamnă că fiecare dintre aceste probe conține

mesopori, și anume pori cu diametre în intervalul 2-50 nm [14] (a se vedea Fig. 4), și prezintă bucle de histereză de tip H<sub>1</sub> pentru probele cu  $0 \le x \le 6$ , bucle tipice matricei de siliciu cu pori mari si ordonați și bucle de tip H<sub>3</sub> pentru probele cu x = 8 respectiv x = 10 (fig. 5) [15].



Fig. 4 Distribuția de pori pe probele 56Si0<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O

Acest comportament morfologic ar putea fi cauzat de prezența nanoparticulelor de Ag care pot fi depozitate pe pereții porilor blocând intrarea acestora. Un alt motiv care ne duce la această ipoteză că porii sunt treptat umpluți cu nanoparticule de argint este faptul că suprafața specifică a probelor scade cu creșterea concentrației de argint. Datele sunt raportate în Tabelul 1.

x (wt %)	Pore volume (cm <sup>3</sup> /g)	BJH maximum pore radius (nm)	BJH median pore radius (nm)	BET Surface area (m <sup>2</sup> /g)
0	0.26	3.05	3.82	118.37
2	0.22	4.05	4.39	76.16
4	0.16	4.96	4.57	63.21
6	0.13	5.92	5.75	37.19
8	0.05	4.11	5.59	16.53
10	0.03	3.87	4.42	12.30

Table 1 Proprietați structurale a probelor 56Si0<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O

Se observa si o scădere progresivă a volumului total de pori , valoarea fiind diminuata de aproximativ opt ori, de la 0.26 la 0.03 cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup> odata cu creșterea conținutului de argint. Aceste modificări, care apar ca rezultat al creșterii concentrației de Ag<sub>2</sub>O, ar putea fi cauzate și de scaderea progresiva a vâscozitații, care este de așteptat să apară odata ce conținutul de argint devine mai mare. Fig. 4.7 prezinta izotermele de adsorbție / desorbție a probelor cu diferite concentrații de argint sinterizate la 580 °C

Proprietățile structurale exprimate în termeni de distribuții dupa dimensiunea porilor obținute din ramura de desorbție a izotermelor utilizând metoda BJH sunt ilustrate în Fig. 4 în funcție de conținutul de argint. Se poate vedea o lărgire progresivă a distribuției mesoporilor odata cu creșterea conținutul de argint. Acest comportament devine mai vizibil pentru proba cu  $x \ge 4$ .

#### 1.2.5 UV-vis

Spectre UV-vis de de absorbție (fig. 5) au fost și ele înregistrate, în scopul de a obține mai multe informații cu privire la structura probelor investigate. Banda de absorbție electronica situată între 220 și 300 nm este prezentă în toate probele investigate, dar este clar evidențiată în spectrul de frecvențe a matricei de sticlă, in acest caz maximul fiind la 217 nm. De obicei, semnalul dat de ionii Ag <sup>+</sup> semnătură poate fi văzut în interiorul regiunii spectrale 200 - 250 nm, și, prin urmare, analiza acestui semnal devine dificil.



Fig. 5 Spectre de absorbție UV-vis pe probele 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O

Cu toate acestea, se poate observa o deplasare a valorii maxime a acestei benzi 217 - 221 nm pe măsură ce crește cantitatea de argint. Mai mult decât atât, un semnal de absorbție în jurul valorii de 240 nm crește în intensitate pe măsură ce conținutul de argint devine mai mare de 4% molar. Aceste comportamente spectrale ar putea fi asociate cu creșterea numărului de ioni de argint și recomandă utilizarea acestor probe ca biomateriale cu proprietăți potențial antimicrobiene. Absorbție în jurul valorii de 420 nm în spectrele UV-VIS pe probele cu x = 4, 6, 8 și 10 este atribuită la prezenței de nanoparticulelor de argint [18]. Asimetria acestei benzi largi de absorbție provine de la semnalul convoluționat dat de nanpoarticulele de argint atat individuale căt și al gruparilor farmate din aceste nanoparticlue, a căror semnal apare la lungimi de undă mai mari [19, 20].

Este justificat să se presupună faptul că apariția semnalului de absorbție jurul valorii de 390 nm în spectrul de absorbție al probei, cu 2% Ag<sub>2</sub>O (fig. 5) se datorează în principal existenței nanoparticulelor de argint aproape sferice de dimensiune mică în matricea de sticlă. Ceea ce privește eșantioanele cu un conținut de argint mai mare, maximul de absorbție de la 420-430 nm se datorează particulelor de argint mai puțin sferice sau / și particulelor cu dimensiuni mai mari. Aspectul mai puțin sferic al nanoparticulelor de argint odată cu cresterea concentrației, a fost de asemenea observat anterior [23].

#### 1.2.6 TEM

În scopul validării ipotezei prezenței nanoparticulelor de Ag s-au inregistrat si anlizat imaginile TEM. Aceste imagini dovedesc pentru toate eșantioanele care conțin Ag<sub>2</sub>O faptul că argintul este prezent sub forma de nanoparticule și / sau grupări nanometrice de argint de diferite dimensiuni și forme, în interiorul sticlă compozite matrice, în funcție de conținutul de oxid de argint (Fig. 6).



**Fig. 6** Imagini Tem pe probele 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O (a) x=2, (b) x=4, (c) x=8, (d) x=10



**Fig. 7** Distributia dupa marime a nanoparticulelor de Ag Obținute din analiza imaginilor TEM a probelor 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O (a) x=2, (b) x=4, (c) x=8, (d) x=10

Pentru eşantionul cu conținut de 2% molar  $Ag_2O$  (Fig. 7a) se poate observa o distribuție de particule de argint cu forme aproape sferice și dimensiuni în intervalul 1.5 și 4 nm (Fig7a). Uitandu-ne la distribuțiile particulelor dupa dimensiuni derivate din imaginile TEM a compozitelor de sticlă bioactivă cu argint cu 4, 8 și 10% molar  $Ag_2O$ , care sunt prezentate în figurile 7b, 7c și 7d, se poate remarca o răspândire a unui număr relativ ridicat de particule de argint, cu dimensiuni diferite care apar pe măsură ce crește conținutul de  $Ag_2O$ . Pentru probele cu conținut de argint mai mare (x = 8 si x = 10) se pot vedea particule sferice și nonspherice cu dimensiuni de zeci de nanometrii.

#### **1.3 Studii de bioactivitate**

Bioactivitatea a fost investigată prin imersarea în SBF la 37 ° C aprobelor, pentru a studia formarea de hidroxiapatită / hidroxiapatita carbonatată (HA / HCA) pe suprafața acestora. Metodele de analiză folosite au fost XRD, FTIR, SEM, analiza EDS și XPS. In acest scop au fost selectate 3 probe cu x = 0, x = 2 = x 8 și conținut de argint. Testele in vitro au fost efectuate prin incubarea probelor în SBF în conformitate cu compoziția lui Kokubo până la 14 zile.

#### 1.3.1 XRD

Analizele XRD efectuate după imersia în SBF permite verificarea modului în care conținutul de argint influențează procesul de auto-asamblare pe suprafata probelor induse de schimbul de ioni dintre sticlele bioactive și soluția SBF.





Difractogramele XRD a probelor neimersate prezintă deja un semnal larg dat de matricea fosfocalcosilicatică necristalină (x = 0), cu un maxim centrat la  $2\theta = 32^{\circ}$  și caracteristici slabe a unei faze apatitice cu cristale nanometrice. În scopul de a distinge în mod clar faza de apatită un standard de hidroxiapatită (HA) [25] a fost introdus în Fig. 8. Pentru proba fără argint, numai cele mai puternice linii asociate HA sunt evidente, în timp ce după imersarea în SBF (14 zile) apar noi picuri corespunzătoare fazei HA cristalizată. Pentru proba cu x = 2, se poat observa picuri mici, care poate fi atribuite la argintiu metalic precum si cristale de oxid de argint. După imersia SBF aceste semnale cresc in intensitate, si apar picuri noi atribuite  $Ag_3PO_4$  [26]. Proba cu concentrație mare de argint prezintă același comportament ca și cel cu x = 2, dar în acest caz, formarea noii faze cristline de argint este mai evidentă.

#### 1.3.2 FTIR

Spectrele FTIR ale probelor fără si cu conținut de argint, înainte și după după înmuiere în SBF pentru testele de bioactivitate in vitro sunt ilustrate în Fig.9, împreună cu spectru de HA pură [25]. Prezența benzilor de la 569, 605, 1040 cm<sup>-1</sup> sunt atribuite vibratiilor unități [PO<sub>4</sub>] corespunzătoare HA-ei cristaline. Aceste benzi sunt clar vizibile și în cazul probelor neimersate. Pe langă aceste semnale se poate observa în spectrul probelor neimersate în SBF prezența unei benzi de adsorbție la 1080 cm<sup>-1</sup> atribuită vibrațiiei de întindere a legaturilor Si-O și a unui umăr în jurul valorii de 950 cm<sup>-1</sup>, datorat vibrațiilor grupărilor Si-O-Si. Banda de absorbție puternică din jurul valorii de 470 cm<sup>-1</sup> este atribuită vibrațiilor de torsiune a grupărilor Si-O-Si. Spectrele FT-IR ale probelor incubate în SBF arată, în plus față de benzile de fosfat, o noua bandă de la 870 cm<sup>-1</sup> atribuită ionilor d carbonat care indică formarea de o fază de apatit carbonată Prin analizarea semnalului IR dat de proba cu x = 8, după incubare SBF, se observă o scădere în intensitate a benzilor situate la 569, 605 cm<sup>-1</sup> asociate cu prezența vibrațiilor grupărilor [PO<sub>4</sub>] pot fi observate. Incorporarea ionilor de carbonat în stratul de HA poate să se producă prin mecanismul de schimb de ioni, ionii de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> din SBF înlocuiesc parțial ionii PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>,iar acești ioni fosfat reacționează cu argintul din probe și formează cristale Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> care sunt vizibile în imaginile SEM.



**Fig. 9** Spectre IR a probelor 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O: (a) x=0,(c) x=2 and (e) x=8 prior to SBF soaking; (b) x=0,(d) x=2 and (f) x=8 after SBF soaking.

#### 1.3.3 SEM/EDS

Fig. 10 prezintă imagini SEM a trei eșantioane înainte și după imersie în SBF. Stratul HA/HCA este clar vizibil pe suprafața probelor incubate în SBF (fig. 10b, e, h), iar dimensiunea cristalelor de HA crește odată cu creșterea concentrației de argint (Fig. 10h). Analizand imaginilor SEM, inregistrate cu electroni retroîmprăștiați, se pot observa sub-microcristale de Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bine definite în probele care conțin argint [27]. Această fază cristalină a fost de asemenea observată din analizele XRD a probelor cu conținut de argint imersate în SBF. Pentru o mai bună înțelegere a imaginilor SEM efectuat și analize EDS, rezultatele acestor analize fiind prezentate în tabelul. 2. Se poate observa că raportul Ca: P scade după imersia în SBF și pentru compusul de argint, cu 8% acest raport (1.65) este foarte aproape de valoarea teoretică a pure HA (1.67).



**Fig. 10** Imagini SEM pe sticlele bioactive cu conținut diferit de argint (a) x=0, (d) x=2 și (g) x=8 inainte de imersie în SBF; (b) x=0,(e) x=2 și (h) x=8 după imersie în SBF; (c) x=0,(f) x=2 și (i) x=8 imagini cu electroni retroîmpraștiați după imersie in SBF

**Table 2** Compoziția elementală în procente atomice a probelor  $56SiO_2 \cdot (40-x)CaO \cdot 4P_2O_5 \cdot xAg_2O$  înainte și după imersie în SBF, calculate din analizele EDX



#### 1.3.4 XPS

Spectrele XPS înregistrate pe probele cu diferite concentrții de argint înainte și după imersia în SBF sunt prezentate în Fig. 11. Compoziția elementală înregistrată la suprafața probelor înainte și după

imersia în SBF a fost de asemenea determinată din spectrele XPS, rezultatele fiind prezentate în tabelul 3 cu o incertitudine de  $\pm 0,05$ . Din datele obținute pentru probele incubate în SBF, se poate vedea că cel mai mare raport Ca: P (4.46) a fost determinat pentru compusul cu 2% Ag iar cel mai mic raport (2.33) pentru sticla cu 8% argint. O mențiune specială ar fi faptul că o cantitate mare de argint determină formarea preferentială a HA. Rezultatele arată, de asemenea, o creștere considerabilă a contriției carbonului pentru probele cu argint, care reprezintă o altă dovadă a faptului că argintul din compozitia sticlelor favorizează formarea de apatită carbonatată.



**Fig. 11** Spectre XPS pe probele 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O: (a) x=0,(c) x=2 and (e) x=8 inainte de imersie; (b) x=0,(d) x=2 and (f) x=8 după imersie în SBF

**Table 3** Compoziția elementală în procente atomice a probelor  $56SiO_2 \cdot (40-x)CaO \cdot 4P_2O_5 \cdot xAg_2O$  înainte și după imersie în SBF, calculate din analizele XPS

omic percentage	50 40 30 20 10								
Atc	0	Si	Ca	Р	Ca:P	Ag	0	С	Cl
■ x=C	)	21,79	13,46	1,93	6,97	0	49,93	12,86	0
■ x=C	) SBF	18,74	12,87	3,008	4,27	0	52,57	12,8	0
<b>x=2</b>	<u>)</u>	25,22	12,15	2,27	5,35	1,11	52,16	7,06	0
■ x=2	2 SBF	18,37	11,83	2,65	4,46	1,17	49,65	14,73	1,57
■ x=8	3	21,67	9,74	4,21	2,31	5,78	44,29	14,29	0
x=8 SBF		17,83	7,23	3,09	2,33	3,41	38,91	26,75	2,74

În plus, spectrele XPS de înaltă rezoluție ale Ag 3d devin mai largi și mai asimetrice observânduse un umăr la energii de legătură mai mici care evidențiază apariția unui nou tip de legatură. Deconvoluția picurilor fotoelectronice (Fig. 12) prezinta pentru linia Ag 3d<sub>5/2</sub> două componente la energiile de legătură în jurul valorii de 368.5 eV și 367 eV corespunzătoare argintului metalic respectiv oxidului de argint (fig. 12) [28]. După imersia în SBF, picul corespunzator la Ag 3d<sub>5/2</sub> este bine fitat cu patru componente. Componentele noi apar la 367.9 eV și 364.7 eV. Componenta înregistrată în jurul valorii de 367.9 eV și 364.7 eV. Componenta înregistrată în jurul valorii de 367.9 eV este atribuită la Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [29]. Este de reținut faptul că această faza a fost de asemenea bine evidențiată și in difractogramele XRD precum și in imaginile SEM. Componenta de la energia de legatură mai mica, aproximativ 365 eV, poate fi atribuită formării AgCl, avănd în vedere apariția unui cantități vizibile de clor în spectrul XPS al probelor după imersie în SBF (tabelul 3).



**Fig. 12** Spectre XPS de inaltă rezolutie deconvoluționate pe Ag 3d din probele 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O înainte și după imersie în SBF: (a) x=2 înainteSBF, (b) x=2 după SBF(c) x=8înainte SBF și (d) x=8 după imersie în SBF

#### 1.4 Studii antibacteriene

Testele antibacteriane au fost efectuate prin metoda de difuzie pe pulberi folosind o diluție de 1% probă în mediul de cultură pe Staphylococus aureus și pe Escherichia coli. Activitatea antibacteriană a fost evaluată prin măsurarea zonei de inhibiție pe organismuele de investigate. Rezultatele sunt prezentate în Fig. 13. Proba cu cel mai mare continut de argint (x = 10) a produs cea mai mare zona de inhibiție atât împotriva S.aureus căt și E. coli. Cu toate acestea, bacteriile gram-negative (E. coli) au fost mai puțin sensibile decât cele gram-pozitive (S. aureus), în ceea ce priveste toate probele care conțin argint. În cazul probei fără argint nu se poate observate nici un efect antibacterian.



Fig. 13 Zone de inhibiție pe bacterii date de probele 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O

#### **1.5** Functionalizare cu protein a sticlelor bioactive

Capacitatea de legare a proteinelor la suprafața sticlelor bioactive a fost investigate prin experimente de rezonanța electronică de spin in undă continuă (CW-EPR și măsurători) XPS. Pentru aceste investigații au fost selectate 3 probe: una fară argint (x = 0), una cu concentrație scăzută de argint (x = 2) și o concentrație mare de argint (x = 8). În scopul de a investiga capacitatea de legare a proteinelor pe sticlele bioactive, suprafețele au fost functionalizate cu methemoglobină cabaliă. Această proteină are o masă moleculară de 66,5 kDa și un diametru de circa 5,6 nm (1ZLU, Protein Data Bank). Molecula de hemoglobina este un ansamblu de patru lanțuri de polipeptide (două lanțuri  $\beta$  și două lanțuri  $\alpha$ ), Iarfiecare lanț de proteine contine o grupare hem ale cărei ioni de fier se leagă reversibil cu molecula de oxigen. În methemoglobină de fierul se gasește în starea de oxidare  $Fe^{3+}$ , inhibând capacitatea de legare de oxigen a proteinei.

Methemoglobina cabalină are 2 cysteines native accesibile pentru marcarea cu spini, situate în poziția  $\beta$ -93 ale celor două lanțuri  $\beta$ . Aceste cysteine au fost marcate cu marker-ul de spin (1-oxyl-2, 2,5,5 - tetramethylpyrroline-3-metil) methanethiosulfonate (MTSSL) (vezi figura 14.).



**Fig. 14** Structura methemoglobinei obținuta prin cristalografia de raza X (1ZLU from Protein Data Bank). Lanțurile  $\alpha$  sunt verzi iar lațurile  $\beta$  sunt albastre. Cisteinele native din poziția  $\beta$ -93 sunt roșii.

Pentru aceste măsurători probe sub formă de pulberi au fost incubate timp de 4 ore la 37 ° C întro soluție de 22,5 mg / ml methemoglobină cabalina (300 uM) însoluție tampon de fosfat (0.01M, pH 7,4), cu concentrație scazută de sare (10 mM NaCl). După imersie probele au fost spălate de trei ori cu soluție tampon, pentru a elimina moleculele de proteine detașabile de la suprafață. Înainte de funcționalizare poteina a fost marcată cu spini MTS în poziția  $\beta$ -93.

#### 1.5.1 RES

Spectrele RES înregistrate în curent continu (c.c.) și bandă X la temperatura camerei pe methemoglobina în soluție înainte și după adsorbția pe sticlele bioactive cu conținut diferit de argint sunt prezentate în Fig. 15. În toate spectrele RES au fost identificate două componente, care corespund populației markerilor de spin cu mobilitate diferită.



Fig. 15 Spectre RES in c.c. şi bandă X la temperatura camerei a methemoglobinei cabaline marcate cu spini în poziția β-93 inresgistrate în soluție (verde), şi in stare adsorbită imediat după imersia cu sticle bioactive cu 0% (negru), 2% (rosu), respectiv 8 % (albastru) conținut de argint. Componenta mobilă (α) şi cea mobilă (β) vizibile in ampul de jos al linilor spectrale sunt perezentate în inset

În soluție, componenta RES mobilă ( $\alpha$  în Fig. 4.20) rezultă de la markerii de spini expuși la suprafață (permitănd o anumita flexibilitate proteinei), în timp ce componenta imobilă ( $\beta$  în Fig. 4.20) este dată pe markerii de spini din interiorul proteinei.

Această interpretare este în concoordanță cu rezultatele obținute de Moffat [30] pe methemoglobina kabalină marcată cu markerul de spin 4 - (2-Iodoacetamido) -2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinyloxy) în poziția  $\beta$ -93.

În cazul adsorbției proteinelor pe suprafața stivlelor bioactive pe sticla echilibrul dntre cele două conformații este deplasat semnificativ spre componenta  $\beta$  (a se vedea Fig. 4.20). Markerii de spin din această fracțiune interacționeză cu suprafața sticlelor bioactive sau cu parți adiacente pliate ale proteinei iar schimbrea de echilibru observată dintre starea imobilă și mobilă a proteinei sugerează faptul că mediul de reziduuri de  $\beta$ -93 \* este perturbat prin procesul de adsorbție. Creșterea conținutului de argint în sticlele bioactive duce la imobilizarea din ce in ce mai accentuată a proteinelor. Methemoglobina devine mai rigidă, ca o consecință a interacțiunii dintre markerii de spin și ioni de argint, care sunt dispusi la suprafața sticlei bioactive. Explicația ar putea fi data de faptul că ionii de Ag<sup>+</sup> reactionează cu grupările thiol din proteine datorită afinității mari dintre sulfide și metalele moi [31, 32]. Chiar dacă proteinele au fost marcate cu markerul de spin MTS și prin urmare sulful din cisteină este legat de markerii de spin, nefiind teoretic accesibil pentru Ag, această teorie nu poate fi exclusă dacă luam in considare eficiența de marcare care a fost aproximativ 50%. Se presupune că aceste cisteine, care nu poartă markeri de spin interacționează cu Ag, prin urmare moleculele nemarcate cu markeri de spin interacționeză mai ușor decât cele marcate. Această interacțiune poate induce la o împachetare mai densă a methemoglobinei pe suprafața sticlelor, ceea conduce la interacțiunea sporită a lanțulilor markate cu spini cu atomi din proteinele învecine. Capacitatea de atașare a proteinelor pe sticlele bioactive cu conținut de Ag, au fost investigate și prin intermediul analizei XPS, metodă care întăresc concluziile trase din măsuratorile RES.

#### 1.5.2 XPS

Capacitatea de legare a proteinelor de sticlele bioactive cu argint au fost de asemenea investigat prin analiza XPS (Fig. 16). Efectul conținutului de argint privind absorbția de methemoglobină din soluție se reflectată în evoluția noilor peakuri fotoelectronice date de N 1s și S 2p, și prin cantitatea mare de C 1s înregistrat după imersie în soluția cu proteine.



Fig. 16 Spectre XPS pe probele 56SiO<sub>2</sub>·(40-x)CaO·4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·xAg<sub>2</sub>O dupa ataşarea de proteine

S-a observat o creștere semnificativă a ponderii fiecărei dintre aceste odată cu creșterea cantității de argint (tabelul 4), în timp ce ponderea elementelor principale din compoziția sticlei bioactive s-au

redus ca urmare a acoperirii cu proteină a suprafeței acestora. Concentrația de azot a fost, practic, zero, înainte deimersie și a crescut considerabil după, datorită atașarii proteinelor [33, 34].

 Table 4 Compoziția elementală în procente atomice obținute din măsurătorile XPS pe probele

 56SiO2·(40-x)CaO·4P2O5·xAg2O inainte si după atașarea de proteine



Aceste rezultate arată clar o acoperire mai mare cu proteine in cazul probelor cu un conținut de argint mai mare. Pe de altă parte, nu numai cantitatea de proteine, ci și conformația proteinelor adsorbite este importantă in ceea ce privește proliferarea celulelor pe aceste materiale [35]. În acest sens, se poate observa atât dim masurătorile RES cât și XPS faptul că cea mai mare aglomerare de molecule de proteine se găsește pe sticlele bioactive cu conținut de argint de 8%, arătând că, în acest caz, proteinele sunt este "forțate" de către moleculele vecine de a păstra structura lor compactă. În consecință, creșterea concentrației de argint până la 8% ar putea împiedica desfășurarea de proteinelor pe suprafața sticlelor permițând o impachetare mai densă a acestora.

# 2 COMPOZITE DE POLIMERI SI STICLE BIOACTIVE CU AG

Aceste compozite sunt formate dintr-o țesătură de copolimeri format din stereoizomerii D și L al acidului polilactic, care a fost inbracată cu sticlă bioactivă. Textile din polimer au fost făcute din fibră cu 16 filamente de Poly-96L/4D-lactide disponibilă în comerț care in cazul de față a fost furnizat de către Universitatea Tehnica din Tampere, Finlanda iar sticlele bioactive cu și fără conținut de nanoparticule de argint au fost preparate prin metoda sol-gel în sistemul de 56SiO<sub>2</sub> –(40-x)CaO-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-xAg<sub>2</sub>O (mol%). Prepararea sticlelor bioactive a fost descrisă în capitolul anterior.

### 2.1 Fabricarea textilului din polimeri

Pentru fabricarea textilului s-au folosit 4 km de fibră din copolimerul Poly-96L/4D-lactide Aceste fibre au fost uniform pieptănate pe o rola încetul cu încetul și a fost obținut un material cu o orientare paralelă a fibrelor. Materialul a fost tăiat apoi în 4 bucăți și suprapuse doua cate doua pentru a se optine orientări perpendiculare a fibrelor și au fost străpunse de mai multe ori cu o matrice de ace în scopul obținerii unei țesături poroase.



**Fig. 17.** Tapele fabricării țesăturii din fibrele de Poly-96L/4D (A) fibre de Poly-96L/4D-lactide (B) rolă circulară pentru pieptănarea fibrelor, (C) țesătura finală obținută

### 2.2 Obținerea compozitelor de polimer cu sticle bioactive

Mesele obținute din polimeri au fost acoperite cu particule de sticlă bioactivă, folosind ca metodă înmuierea în suspensie apoasă de sticle bioative. Din cauza aderenței scăzute a stratului de sticlă bioactivă pe țesătura de polimer, a fost adăugată o altă componentă în suspensie, care acționeză ca un liant, promovând aderarea particulelor de sticlă pe suprafața rețelei de polimer. Această componentă este alcoolul polivinilic (PVA), care este, de asemenea, un polimer. După mai multe teste, s-a ales ca si compoziție finală suspensia cu conținut de 60% g / v sticlă bioactivă în soluție PVA de 4%. Bucăți de 10x10 mm, din țesătură au fost mai întâi pretratate în etanol timp de 30 de minute pentru a îmbunătăți

capacitatea de inmuiere a acestora, apoi au fost spălate cu apă distilată și introduse in suspensie cu ajutorul unei pensete. Bucățile de polimeri au fost lăsate in suspensie timp de trei mimute agitandu-se lent și continuu pentru a evita precipitarea particulelor de sticlă bioactivă . După retragere, probele au fost lasate pe sticle de ceas la uscat la temperatura camerei. În prima jumătate de compozitele au fost intoarse din două în două minute pentru a se obțină o uscare uniformă după care au fost lăsate să se usuce timp de 3 zile la temperatura camerei.

### 2.3 Caracterizarea

Microstructura compozitelor obținute a fost studiată prin analize SEM. Analiza termică diferențială (DTA) și analiză termogravimetrică (TG) au fost utilizate pentru a verifica temperaturile de degradare termică a acestor materiale compozite și totodata pentru estimarea conținutul de sticle bioactive din compozit.

#### 2.3.1 SEM

Morfologia suprafatei de polimerilor și compozitelor de polimeri cu sticle bioactive cu și fără argint sunt prezentate în Fig. 18. După cum se poate vedea proba PLA prezintă goluri intre fibrele polimerice, care arată o structură generală poroase. Esantionul hibrid format din cei doi polimeri PLA+PVA prezintă o peliculă subțire între fibrele PLA asociate cu PVA. Particulele de sticle bioactive se prezintă colțuroase și sunt prinse cu PVA între fibrele de PLA.



**Fig. 18** Imagini SEM pe polimeri, respectiv pe composite polimer/sticlă bioactiva la o mărire de 500 respectiv 40μm și spectrele EDS corespunzătoare

#### 2.3.2 DTA/TG

Analiza termică diferențială (DTA) și analiză termogravimetrică (TG) au fost utilizate pentru a verifica temperaturile termică de degradare a acestor materiale compozite și pentru a cuantifica conținutul de sticlă bioactivă din aceste compozite [37]. Procentul de greutate al sticlelor bioactive a fost estimat din diferența de mprocente de masă a compozitelor de la începutul și la sfârșitul fiecărei masurători DTA, în cazul în care se presupune faptul ca polimerul se degradeza termic complet. În scopul de a sprijini această ipoteză s-au efectuat analize DTA / TG și pe cele două tipuri de polimeri utilizați pentru prepararea compozitelor atât individual cât și împreună.

Prin inspectarea curbei DTA (Fig. 19 B) a probei din fibre PLA se poate observa temperatura de tranziție vitroasă Tg în jurul valorii de 73° C, care este urmată de topire în jurul valorii de 159 ° C. Tg și temperatura de topire Tm depind foarte mult de greutate moleculară. Este important de reținut faptul că Tg este influențat de gradul de cristalinitate în PLA [38]. Descompunere PLA-ului începe în jurul valorii de 260 ° C. Descompunere este rapidă la această temperatură și se completează la 380 ° C. Curba DTA pe PLA este prezentată in figura 4.25B și prezintă două evenimente exotermice nu foarte bine separate în jurul valorii de 364 respectiv 384° C, asociate cu o căderede masă masivăprecum se observă în curba TG, asociat cu descompunerea completă a PLA. S-a observat o pierdere totala de 97 % pentru această proba [39].

Dacă ne uităm la curba TG (Fig. 19A) corespunzătoare polimerului PVA simplu, se pot observa două caderi de masa bine definite asociate cu doua evenimente in curba DTA. Prima etapă de descompunere (250-350 °C) corespunde în principal, la reacția de eliminare a grupurilor adverse hidroxil, în timp ce a doua etapa de degradare (peste 380 ° C) este dominată de scindarea lanțurilor de polimeri [40, 41]. Prima etapă de degradare este asociată cu o pierdere de masă de 60%, iar etapa a doua cu o pierdere de masa de 32%. Evenimentele corespunzătoare tranziției vitroase si punctului de topire nu pot fi observate in cazul acestui polimer. O masă moleculară mai mare cauzează o complexitate mai mare a procesului de degradare, pe cand gradul de hidrolizare mai mare reduceus temperatura de descompunere a PVA [42-44].

În cazul probei PLA + PVA poate fi observat un model de degradare format din două etape ca și în cazul probei de PVA, și pot observa de asemenea și evenimentele de la temperaturi mai mici care apar în cazul probei PLA (punctul Tg la în jurul valorii de 73 ° C și punctul de topire în jurul valorii de 159°C).

Ditre toate aceste probe cea mai mică temperatură de degradare se observă in cazul probei PVA,

in timp ce la proba PLA are valoarea cea mai mare, temperatura de degradare hibridului format din acești doi polimeri afalandu-se undeva intre temperaturile de degradare ale celor doi polimeri luați individual, fapt care este consemnat și în literatură [41].



Semnalul DTA dat de compozitelele care conțin sticle bioactive manifestă același comportament ca și proba PLA+PVA doar că evenimentele corespunzătoare au loc la temperaturi mai mici așa cum se vede în Fig. 20. Aceste devieri de temperatură pot fi atribuite conductivității termice mai bune a sticlelor, respectiv al argintului. Conținutul de sticlă bioactivă din compozite în procente de masă s-a estimat a fi de fi de 6.5% in cazul sticlei fara argint repectiv14,7% în cazul sticlei cu argint, sugerând o aderență mai bună a sticlelor cu continut de argint pe structura polimerică, lucru ce poate fi observat și din îmaginile și din imaginile SEM.

#### 2.4 Bioactivitatea

Această parte a studiului a fost efectuată cu utilizănd procedura acelulară standard în vitro descrisă de către Kokubo și colegii. Bucăți de 5x 5 mm din polimer respectiv compozite au fost imersate în 25 ml de SBF în recipiente de plastic conice, care au fost anterior spalate acid clorhidric și apă distilată. Procesul de incubare a avut loc în sistem dinamic intr-o etuvă la 37 °C prevăzută cu un agitator orbital cu frecvență de rotație de 100 rpm. Probele au fost extrase din soluția SBF după de 1, 7, 14, respectivi 21 de zile. SBF-ul a fost înlocuit de două ori pe săptămână, deoarece concentrația de cationi scade în timpul experimentelor, ca urmare a modificărilor chimice a probelor. Odată scoase din tuburilede incubare, probele au fost spălate ușor, mai întâi în etanol și apoi cu apă distilată și lăsate să se usuce la temperatura ambientală.

Formarea de HA pe suprafața compozitelor după imersia în SBF a fost investigată cu instrumente analitice, cum ar fi SEM, XRD, XPS si spectroscopie IR, pentru a evalua reactivitatea chimică a materialelor.

#### 2.4.1 SEM

Fig. 21 și Fig. 22 arată imagini SEM pe compozitele cu polimer și BG0 respectiv AgBG înainte și după imersie timp de până la 21 de zile în SBF. Primele cristale de s-au HA dezvoltat deja din prima zi de imersie dinamică în SBF. În plus față cristalele specifice de HA, pe compozitul cu AgBG se observă și formarea de cristale de fosfat de argint de asemenea după prima zi de imersie și nu inhibă formarea cristalelor de HA. Această fază cristalină a fost identificată și in difractogramele de raze X. Cum era de asteptat, cantitatea de cristale HA a crescut cu timpul de imersie. Acest lucru este vizibil, de asemenea și în imaginile SEM ale probelor imersate în SBF timp de 21 de zile [50]. Imaginile SEM cu magnificare mare demonstra faptul că HA s-a format si pe structura polimerică nu numai pe faza de sticlă bioactive din compozit. Aceste rezultate sunt confirmate prin măsurători EDX precum se vede în tablul 5. de unde se poate observa și fatul că nu se observă formarea HA si nici altei faze cristaline pe suprafața polimerilor fară conținut de sticle bioactive.



Fig. 22 Imagini SEM pe polymer+BG0 după incubare în SBF: A-0, B-1, C-7, D-14, E-21 zile



Fig. 23 Imagini SEM pe polymer+AgBG după incubare în SBF: A-0, B-1, C-7, D-14, E-21 zile

#### 2.4.2 XRD

Rezultatele XRD au arătat faptul că picuri de difracție caracteristice HA apar după doar o zi de imersie în SBF, unul la 26 ° (2  $\theta$ ) și al doilea între 2  $\theta$  = 31 ° și 33 °, așa cum se vede în Fig. 24. Formele peakurilor relativ inguste indică o cristalinitate ridicată a apatitei formate in vitro (Fig. 24A), la acest stadiu incipient de imersie în SBF. Intensitatea acestor semnale pare să crească odata cu creșterea timpul de imersie ca ceea ce sugerează o creștere a numărului de cristale HA formate pe suprafața compozitului PLA+ PVA+BG0. Ceea ce privește compozitul PLA+PVA+AgBG, se poate observa apariția unor linii de cristalizare suplimentare atribuite formării de fosfat de argint pe proba în după imersia SBF (Fig. 24B).



**Fig. 24** Difractigrame XRD pe compozitele Polimer/BG0 (A) și Polimer/AgBG (B) (a) înainte, (b) după 1 zi, (c) 7 zile, (d) 14 zile (e) 21 zile, de imersie in SBF

#### 2.4.3 XPS

Compoziția elementală înregistrată la suprafața polimerilor puri cât și pe compozite de polimeri cu sticle bioactive înainte și dupa imersia în SBF a fost determinată prin analiza XPS (Fig. 25) iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.



**Fig. 25** Spectre XPS pe PLA (a), PLA+PVA (c), PLA+PVA+BG0 (e), PLA+PVA+AgBG (g) inainte de imersie în SBF respectiv după 21 zile imersie in SBF SBF (b), (d), (f), (h)

Din datele obținute pentru probele incubate în SBF, se poate vedea faptul că nu există nici o formare de HA pe suprafața probelor din polimeri, PLA și PLA + PVA. În cazul probelor cu conținut de sticlă bioactivă cu și fara argint se poate observa o crestere considerabila a ponderii atomilor de calciu și fosfor pe suprafața compozitelor după SBF, și o scădere a contribuției date de atomii de carbon, siliciu respectiv argint. Acest rezultat sugerează formarea unui strat de HA pe suprafața acestorcompozite, strat care este vizibilă în mod clar și în imaginile SEM.

**Table 5** Compoziția elementală la suprafată obținută din analiza XPS survey inainte Si după incubare in SBF timp de 21 de zile



#### 2.4.4 IR

În Fig. 26 sunt prezentate spectrele IR a polimerilor cu și conținut de sticlă bioactivă, înainte și după imersia în SBF timp de 21 zile. Spectrele polimerilor puri (PLA si PLA + PVA) după 21 de zile în SBF sunt similare cu cea observată înainte de imersie. Spectrele IR ale polimerilor cu sticla bioactivă atâtBG0 cât și AgBG prezintă o variație în forma benzii de la 1035 cm<sup>-1</sup>. Această variație este datorata apariției unei noi noi benzi de absorție care se suprapune parțial cu cele deja existente banda atribuită vibratilor antisimetrice anti-simetrice ale gruparilor PO, acesta fiind o caracteristică spectrală a hidroxiapatitei.



**Fig. 26** Spectrele IR ale probelor PLA (a), PLA+PVA (c), PLA+PVA+BG0 (e), PLA+PVA+AgBG (g) inainte de imersie in SBF respectiv după 21 de zile imersie în SBF (b), (d), (f), (h)

#### 2.5 Efectul antimicrobian

Două bacterii clasice patogene Escherichia coli, o bacterie gram pozitivă și Staphylococcus epidermidis, o bacterie gram negativ, ambele surse potențiale de infecție în vindecarea ranilor, au fost utilizate în studiul de față. Bacteriile folosite au fost modificate genetic pentru a emite lumină, și metoda de testare a fost inregistrarea intensității emisiei de luminoase al acestor bacterii in contact cu compozitele , folosind un aparat de fotografiat sensibil la lumina. Bioluminescența acestor organisme incubate cu compozitele a fost inregistrată timp de 24 de ore pentru a se determina efectul antibacterian al respectivelor compozite. Testul de bioluminescență a fost efectuat din 2 in 2 ore în triplicate folosinduse bucăți de PLA ca și control respectiv câte trei probe formate din compozite cu polimeri cu sticlă bioactivă cu și fară conținut de argint.

Aşa cum se poate vedea în fig. 27 ambele compozite care conțin sticle bioactive (PLA+ PVA + BG0 și PLA + PVA+ AgBG au inhibat cresterea bacteriilor. Timpul necesar pentru observarea acestui efectul variaza în funcție de compozitia probelor analizate. Se observă diferențe și in funcție de speciile de bacterii. În ceea ce privește compozitul cu conținut de argin, acesta prezintă un efect bactericidal nu numai efect bacteriostatic. Această afirmație este susținută de faptul că gradul de luminescență este proporțional cu metabolismul bacteriilor, în concluzie, dacă acestea nu prezintă luminescență nu produc nici metabolismu si prin uramare mor. În cazul compozitului PLA+PVA+BG0 se poate observa din Fig. 27 faptul că la timpul zero avem o creștere in bioluminescență, cel mai probabil se datorează recunoașterii prezenței corpului străin și incercarea eliminării acestuia prin creșterea metabolismul lor.



Fig. 27 Antibacterial test results

# CONCLUZII

• Metoda sol-gel a fost folosita cu succes pentru a obține noi compozite de sticla bioactivă cu continut ridicat de argint.

• Nanoparticulele de argint încorporate în matrice, evidențiate de TEM și UV- IS, probabil se depun pe pereții porilor așa cum se observa din mauratorile de suprafață specifică și porosimetrie

• XRD, FTIR, SEM și datele XPS arată că adăugarea de argint la matricea  $SiO_2$ -CaO- $P_2O_5$  favorizează formarea de HA/HCA, și de asemenea, a cristalelor  $Ag_3PO_4$  pe suprafața probelor imersate în SBF

• Rezultatele RES și XPS arată că un conținut ridicat de argint încorporat în sticla bioactivă are un efect important în îmbunătățirea afinitatii proteinelor față de acest tip de materiale sugerând o aglomerare a proteinelor la suprafata probei

• Cum era de asteptat proprietățile antibacteriene, a sticlelor bioactive au crescut cu concentrația de argint pe ambele bacterii gram pozitive și gram-negative

• Copolimerii sintetici biodegradabili Poly-96L/4D-lactide au fost fabricați din fibre de același compozitie

• Analiza SEM a relevat structura poroasa a compozitelor obținute, în timp ce cantitatea de sticlă bioactivă din compozite a fost estimate din analizele termice

• Tehnica scufundarii in suspensie de soluTie PVA cu sticlă bioactivă s-a dovedit a fi o tehnică corespunzatoare pentru acoperirea polimerilor cu sticle bioactive

• Reactivitatea chimică ridicată a compozitelor a fost confirmata prin detectarea de cristale de HA încă după prima zi de imersie în SBF chiar și pe componenta polimerică posibil și din cauza conditilor dinamice

• Compozitele cu continut de argint prezintă un efect bacteriostatic marcat pe ambele bacteriilor Gram negative (Escherichia coli) și gram pozitive (Staphylococcus epidermidis)

### Concluzii generale

Materialele compozite formate dinpolimeri biodegradabili, sticlă bioactivă ca și fază anorganica, și un agent antibacterian au fost obținute cu succes. Aceste compozite par a fi o abordare promițătoare pentru aplicatii in ingineria tesuturilor: sticlele silicatice bioactive având capacitatea de a stimula ostegeneza și prin urmare promovarea creșterii oaselo; argintul, un agent antibacterian puternic, care e formeaza cristale de  $Ag_3PO_4$  pe suprafața sticlelor, permițând eliberarea îndelungată în timp a agentului antibacterian; structura de polimeri biodegradabila și cu porozitate ridicată (PLA + PVA), care este un suport pentru formarea de os, care să permițând vascularifarea țesutului osos nou format.

# Referințe

- 1. M. Vallet-Regi, J. Roman, S. Padilla, J.C. Doadrio, F.J. Gil Bioactivity and mechanical properties of SiO2–CaO–P2O5 glass-ceramics, J. Mater. Chem. 15 (2005) 1353-1359
- B.S. Lee, S. H. Kang, Y.L. Wang, F.H. Lin, C.P. Lin, In Vitro Study of Dentinal Tubule Occlusion with Sol-gel DP-bioglass for Treatment of Dentin Hypersensitivity, Dent. Mat. J. 26 (2007) 52-61.
- A. Chrissanthopoulos, N. Bouropoulos, S.N. Yannopoulos, Vibrational spectroscopic and computational studies of sol-gel derived CaO-MgO-SiO<sub>2</sub> binary and ternary bioactive glasses, Vib. Spectrosc. 48 (2008) 118–125.
- 4. R.S. Pryce, L.L. Hench, Tailoring of bioactive glasses for the release of nitric oxide as an osteogenic stimulus, J. Mater. Chem. 14 (2004) 2303–2310.
- T. Wenzel, J. Bosbach, F. Stietz, F. Träger, In situ determination of the shape of supported silver clusters during growth, Surface Science, 432 (1999) 257-264 + J R Osiecki, K Takusari, H Kato, A Kasuya, S Suto, The atomistic growth of silver clusters on a Si(111)7x7 surface, J. Phys.: Conference Series 61 (2007) 1107–1111
- 6. F. Domine, B. Piriou, Study of sodium silicate melt and glass by infrared reflectance spectroscopy, J Non-Cryst. Solids 55 (1983) 125–130.
- 7. R.H. Stolen, G.E. Walrafen, Water and its relation to broken bond defects in fused silica J. Chem. Phys. 64(1976) 2623-2632.
- G. Melinte, L. Baia, V. Simon, S. Simon, Hydrogen peroxide versus water synthesis of bioglassnanocrystalline hydroxyapatite composites, J. Mater. Sci. 2011, DOI: 10.1007/s10853-011-5700-8.
- 9. M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite formation on Gel-Silica Surface, J. Am. Ceram. Soc. 78 (1995) 2463–2468.
- 10. K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, et al. Reporting physisorption data for gas/solid systems, Pure Appl. Chem. 57 (1985) 603–619
- 11. J.R. Jones, L.M.Ehrenfried, L.L. Hench, Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering, Biomaterials 27 (2006) 964-973
- 12. P. Chakraborty, J. Mater Sci 33 (1998) 2235
- 13. ] G. Le Saout, P. Simon, F. Fayon, A. Blin, Y. Vaills, J. Raman Spectrosc. 33, 740 (2002),
- 14. Mie, G., Ann. Physik, [4] 25, 377(1908)
- 15. L. Baia, S. Simon, UV-VIS and TEM assessment of morphological features of silver nanoparticles from phosphate glass matrices, Modern Research and Educational Topics in Microscopy, pp. 576-783, 2007.

- 16. http://rruff.info/hydroxylapatite/display=default/R050512
- 17. M. Shirkhanzadeh, M. Azadegan. Formation of carbonate apatite on calcium phosphate coatings containing silver ions. J Mater Sci Mater Med 1998;9:385-391.
- Y. Bi, S. Ouyang, J. Cao, J. Ye, Facile Synthesis of Rhombic Dodecahedral AgX/Ag3PO4 (X=Cl, Br, I) Hetero-crystals with Enhanced Photocatalytic Properties and Stabilities. Phys Chem Chem Phys 2011;13:10071-10075.
- 19. P. A. Kumar, M.P. Reddy, L. K. Ju, H. H. Phil, Novel Silver Loaded Hydroxyapatite Catalyst for the Selective Catalytic Reduction of NO<sub>x</sub> by Propene, Catal Lett 2008;126:78-83.
- 20. J.J. Buckley, A.F. Lee, L. Olivic, K. Wilson, Hydroxyapatite supported antibacterial Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> nanoparticles. J Mater Chem 2010;20:8056-8063.
- 21. JK. Moffat, Spin-labelled haemoglobins: a structural interpretation of electron paramagnetic resonance spectra based on X-ray analysis. J Mol Biol 1971;55:135-146.
- 22. A. Simchi, E. Tamjid, F. Pishbin, A.R. Boccaccini, Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. Nanomed-Nanotechnol 2011;7:22–39.
- 23. Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Biomed Mater Res 2000;52:662-668.
- 24. A. Arvidsson, F. Currie, P. Kjellin, Y.T. Sul, V. Stenport, Nucleation and growth of calcium phosphates in the presence of fibrinogen on titanium implants with four potentially bioactive surface preparations. An in vitro study. J Mater Sci Mater Med 2009;20:1869-1879.
- 25. E. Vanea, V. Simon, XPS study of protein adsorption onto nanocrystalline aluminosilicate microparticles. Appl Surf Sci 2011;257:2346-2352.
- 26. L.J. Gauckler, K. Rezwan, Adsorption of biomolecules on ceramic particles and the impact on biomedical applications. Adv Sci Tech 2006;45:741-751
- 27. J.J.Blaker, A.R. Boccaccini, S.N. Nazhat, Thermal Characterizations of Silver-containing Bioactive Glass-coated Sutures, J Biomater Appl 1(2005) 81-98
- B. Gupta, N. Revagade, J. Hilborn, Poly(lactic acid) fiber: An overview, Progress in Polymer Science, Volume 32, Issue 4, 2007, 455-482
- 29. S.S. Ray, M. Bousmina, Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites in greening the 21st century materials world. Prog. Mater. Sci., 50 (2005) 962-1079.
- 30. D. Brizzolara, H.J. Cantow, K. Diederichs, E. Keller, A.J. Domb, Mechanism of the stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactide)s. Macromolecules 29 (1996), 191– 197

- 31. J.T. Yehabc, M.C. Yanga, C. J Wua, X. Wub, C.S. Wud, Study on the Crystallization Kinetic and Characterization of Poly(lactic acid) and Poly(vinyl alcohol) Blends, Polymer-Plastics Technology and Engineering, 47 (2008) Issue 12, 1289-1296
- 32. M. Popa, C. Vasile, I. A. Schneider Thermoxidative degradation of poly(vinyl alcohol) under dynamic thermogravimetric conditions I. Influence of heating rate and of molecular weight, J Polym Sci Part A-1: Polym Chem 10 (1972) 3679- 3684
- 33. C. Vasile, E.M. Călugăru, S. F. Bodonea Thermoxidative degradation of poly(vinyl alcohol) under dynamic thermogravimetric conditions. II. Influence of the hydrolysis degree J Polym Sci Polym Chem Ed 19 (1981), 897–905
- 34. S. P. Vijayalakshmi, Giridhar MadrasThermal Degradation of Water Soluble Polymers and Their Binary Blends, Journal of Applied Polymer Science, 101 (2006) 233 240
- 35. J. Olsen-Claire, J. J. Blaker, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, G. Schmack, K. Gliesche, Bioglass® Coatings on Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) Meshes for Tissue Engineering Scaffolds, Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 37 (2006) 577–583

## MULŢUMIRI

In primul rănd doresc să imi exprim recunoștința față de doamna Prof. Dr. Viorica SIMON, conducătorul meu de doctorat, pepentru că mi-a oferit onoarea onoarea și privilegiul de a lucra în grupul dumneaei de cercetare. Sunt foarte recunoscătoare pentru ințelegerea, sprijinul și coordonarea pe care am primito in delungul celor trei ani de doctorat.

Aș dori să mulțumesc si domnului Prof. Dr. Simion SIMON pentru discuțiile ineresante utile și valoroase din această perioadă

Recunoștința mea sinceră este adresată și distinșilor membri ai comisiei de doctyorat pentru corectarea tezei: domnului Prof. Dr. Heimo Ylanen de la Universitatea Tehnică din Tampere Finlanda, domnului Prof. Dr. Ing.. Cătălin Popa de la Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca, domnului Conf. Univ. Dr. Lucian Baia de la Universitatea Babes - Bolyai, Cluj – Napoca.

Mai mult decât atât, vreau să le mulțumesc tuturor colegilor mei de la Facultatea de Fizică în special la Dr. Emilia Vanea, Dr. Oana PONTA, dr. Monica TĂMĂŞAN și Cristina GRUIAN.

Mulțumirile mele se indreaptă de asemenea către familia mea pentru sprijinul lor permanent, înțelegere și încurajare pentru a îmi urmări interesele mele, precum și către soțul meu iubit pentru acordarea necondiționată de sprijin, inspirație și energie.

În cele din urmă doresc să îmi exprim recunoștința pentru sprijinul financiar oferit de programele co-finanțate prin Programul Operational Sectorial de Dezvoltarea a Resurselor Umane, Contract POSDRU 6/1.5/S/3 - "CURSURI DE DOCTORAT: PRIN ȘTIINȚĂ CĂTRE SOCIETATE".