

UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCURESTI  
ȘTIINȚA ȘI INGINERIA MATERIALELOR



*REZULATUL TEZEI  
PENTRU TITLUL DE DOCTOR  
ÎN INGINERIA MATERIALELOR*

**Biofuncționalizarea suprafețelor dispozitivelor biomedicale**

Tran Thi Thanh  
Februarie, 2021

Coordonat de  
**Prof. Dr. Ing. M. TÂRCOLEA**

București – 2021

# **Biofuncționalizarea suprafețelor dispozitivelor biomedicale**

**Tran Thi Thanh**

Această disertație este propusă pentru un doctorat în Știința Materialelor

Facultatea de Științe și Inginerie a Materialelor  
Universitatea POLITEHNICA din București

Aprobat de

**Prof. Dr. Ing. M. TÂRCOLEA**

**Consilier**

**București – 2021**

## Declarație

Această lucrare este propusă pentru un doctorat în Ingineria Materialelor la Universitatea POLITEHNICA din București. Studiul a fost realizat sub îndrumarea prof. dr. Ing. Mihai TARCOLEA, în perioada 2015 – 2020.

Această teză este originală, cu excepția cazului citărilor menționate din literatura de specialitate. Această cercetare nu are similitudini cu altă lucrare care a fost acceptat pentru o diplomă sau alt certificat la orice universitate.

Părți din această lucrare a fost prezentat în următoarele publicații:

**1. *Bio-active and antibacterial coatings obtained by pulsed electrochemical deposition***, M. Tarcolea, D.M. Vranceanu, A. Vladescu, M. Dinu, T. Tran, C.M. Cotrut, 7th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” - BIOMMEDD’2016, 15-17 September 2016, Constanta, Romania – poster

**2. *Single-step electrochemical deposition of bio-active and antibacterial coatings for medical applications***, D.M., Vranceanu, A. Vladescu, M. Dinu, T. Tran, C.M Cotrut, EMRS 2017 – Spring Meeting, 2017, 22-26 May, 2017, Strasbourg, France

**3. *Pulsed electrochemical deposition of Ag doped hydroxyapatite bio-active coatings on Ti6Al4V for medical purposes***, D.M. Vranceanu, T. Tran., E. Ungureanu, V. Negoiescu, M. Tarcolea, M. Dinu, A. Vladescu, C.M. Cotrut, Scientific Bulletin U.P.B 2018, Series B - Chemistry and Materials Science, Vol. 80, Iss.1, pp. 173 – 184.

**4. *Studies of micro-structure and composition of the modified HAp coating via SEM investigations***, TRAN Thi Thanh, Cosmin Mihai COTRUT, Maria Diana VRANCEANU, Elena UNGUREANU, Mihai TARCOLEA, Scientific Bulletin U.P.B 2020, Series B - Chemistry and Materials Science, Vol. 82, Iss.1, pp. 145 – 154.

**5. *In vitro biocompatibility investigation of silver and zinc modified hydroxyapatite deposited on implant materials***, Thi Thanh TRAN, Norica Beatrice NICHITA, Mihaela-Olivia DOBRICA, Cosmin Mihai COTRUT, Maria Diana VRANCEANU, Mihai TARCOLEA, Scientific Bulletin U.P.B 2020, Series B - Chemistry and Materials Science, Vol. 82, Iss.3, pp. 231 – 248.

**Tran Thi Thanh**

***București, 2021***

## Cuprins

# Biofuncționalizarea suprafeței dispozitivelor biomedicale

Capitolul 1: Introducere

Capitolul 2: Teorii conexe

- 2.1 Modificarea suprafeței Ti și Ti6Al4V prin tehnica de depunere electrochimică
- 2.2 Depunere de hidroxiapatită dopată cu argint pe Ti și Ti6Al4V
- 2.3 Depunere de hidroxiapatită dopată cu zinc pe Ti și Ti6Al4V
- 2.4 Metoda de caracterizare a depunerilor de hidroxiapatită
- 2.5 Teste de biocompatibilitate pentru dispozitivele medicale: studiu documentar
- 2.6 Coroziunea și comportamentul electrochimic
- 2.7 Bioactivitate *in vitro*

Capitolul 3 – Rezultate experimentale

3.1 - Caracterizarea stratului de fosfat de calciu obținut prin procedeul electrochimic

- Studii de suprafață și morfologie
- Compoziția acoperirilor depuse

3.2 – Microstructura și compoziția elementală a acoperirilor HAp, HAp-Ag

- Studii de microstructură ale acoperirilor
- Compoziția elementală a acoperirilor

3.3 - Studii de microstructură și compoziție a acoperirilor HAp, HAp-Ag și HAp-Zn

- Examinare morfologică
- Compoziția elementală
- Rugozitatea suprafeței
- Grosimea acoperirilor

3.4 – Determinarea caracteristicilor de coroziune, bioactivitate și biocompatibilitate ale acoperirilor HAp, HAp-Ag și HAp-Zn

- Evaluarea bioactivității
- Analiza comportării electrochimice
- Evaluarea biocompatibilității
  - + Morfologia celulelor
  - + Proliferarea celulară

Capitolul 4: Concluziile și orientarea lucrărilor viitoare

- 4.1 Concluzii
- 4.2 Contribuții personale
- 4.3 Direcții de cercetare viitoare

*Referințe bibliografice (selecție)*

## Capitolul 1: Introducere

Această cercetare are ca scop investigarea dezvoltării microstructurii acoperirilor HAp pe Ti și aliajele sale. A fost aplicată tehnica de depunere electrochimică pentru a obține acoperiri de HAp pure, acoperiri de HAp-Ag, acoperiri de HAp-Zn cu respectarea cerințelor privind microstructurii, biocompatibilității, bioactivității, rezistenței la coroziune, etc.

În capitolul 2, se face un studiu documentar bazat pe literatura de specialitate privind cunoștințele actuale asupra posibilităților de modificare a suprafeței Ti și Ti6Al4V prin tehnica electrodepunerii (ED), acoperirea Ti și Ti6Al4V cu HAp prin tehnica ED, acoperirea cu HAp dopată cu Ag și cu HAp dopată cu Zn pe Ti și Ti6Al4V, metodele de caracterizare a acoperirilor de HAp, testele de biocompatibilitate pentru dispozitivele medicale și testul de coroziune.

Capitolul 3 prezintă materialele, metodele și echipamentele pe care autorul le-a ales pentru a efectua experimente în procesul de cercetare.

Capitolul 4, 5, 6, 7 este dedicat detaliilor experimentale. Această secțiune a tezei reunește multe dintre subiectele abordate în capitolele anterioare. Rezultatele obținute duc la concluzia că acoperirea cu HAp corespunde cerințelor de omogenitate, biocompatibilitate, bioactivitate și rezistență la coroziune. În plus, autorul a studiat, de asemenea, adăugarea de ioni de argint ( $\text{Ag}^+$ ), ioni de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) în acoperirea de HAp pentru a explora proprietățile non-citotoxice și biocompatibile. Probele au fost inspectate prin tehnica SEM/EDS pentru caracterizarea morfologică și compozițională. Rugozitatea suprafeței a fost măsurată prin metoda profilometriei (cu stylus) pe o lungime de 3 mm, iar grosimea acoperirilor a fost determinată prin scanare cu stylus de profilometrie (cu raza stylusului de 2,5  $\mu\text{m}$ ) la marginea acoperirii, cu o lungime de 3 mm. Ambele măsurători au fost efectuate pe un DEKTAK 150 (Veeco Instruments, Plainview, NY, SUA). Mai mult decât atât, acoperirile erau de așteptat să ofere o mai bună înțelegere privind biocompatibilitatea materialului. În acest sens, au fost utilizate culturi celulare (celulele utilizate sunt celule HEK 293T) pe o acoperire HAp pe Ti (HAp/Ti), HAp dopată cu Ag pe Ti (HAp-Ag/Ti), HAp dopată cu Zn pe Ti (HAp-Zn/Ti); acțiunea celulelor a evaluată prin tehnica *in vitro*. Performanțele de bioactivitate ale acoperirilor au fost, de asemenea, evaluate prin imersare lor în soluție SBF. În plus, comportamentul electrochimic a fost investigat la temperatura corpului uman ( $37,0 \pm 0,5$  °C) în (SBF) cu o valoare a pH-ului de 7,4 utilizând un PARSTAT 4000 Potentiostat/Galvanostat.

În cele din urmă, observațiile finale și orientările viitoare de lucru sunt menționate la capitolul 8 al tezei.

## Capitolul 2: Teorii conexe

### 2.1 Modificarea suprafeței Ti și Ti6Al4V prin tehnica de depunere electrochimică

**Substrat:** Detaliile etapelor pentru pregătirea substratului au fost ilustrate în [Tabelul 2.1].

Substratul	Tratamentul substratului	Refs
Ti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie SiC la 400 grit</li> <li>- Atacat cu către soluție de acid mixt de HNO<sub>3</sub>, HF și H<sub>2</sub>O pentru 20s, raportul de volum 3:1:10</li> <li>- Anodizare în 5.0 wt.% HF, U = 20 V, în termen de 60 min, la temperatura camerei, anod Ti și catod folie Pt</li> <li>- Se spală cu apă deionizată, se usucă la temperatura camerei</li> <li>- Tratată termic în aer la 450°C în 3h, rata de încălzire este de 15°C/min</li> </ul>	[1]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie SiC de la 400 grit la 1200 grit</li> <li>- Metoda de decapare utilizată cu 4% HF în 2 minute</li> <li>- Metoda de baie cu ultrasunete a fost aplicată printr-o serie de soluții, inclusiv de soluție de acetonă, soluție de alcool etilic, și apă ultrapură în 15 minute, respectiv, se spală cu apă deionizată, uscată la aer</li> </ul>	[2]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie SiC (gama de grit de 400-1200)</li> <li>- Ultrasonare de acetonă, alcool etilic și apă distilată.</li> <li>- Atacat cu amestec de 3ml HNO<sub>3</sub>, 1ml HF și 10 ml apă purificată în 20 de secunde, apoi clătită cu apă purificată, după cea uscată în aer</li> <li>- Anodizare cu 5 wt.% Soluție HF în termen de 60 min, U = 20 V, Ti utilizate pentru anod și folie Pt utilizate ca catod</li> <li>- Clătită cu apă purificată și uscată în aer.</li> </ul>	[3]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie cu gama de grit de 400- 1200</li> <li>- Atacat cu soluție acidă cu 10% HF și 30% HNO<sub>3</sub> în 20 secunde</li> <li>- Ultrasonically în soluție de acetonă și soluție de alcool etilic în 15 minute, se spală cu apă deionizată, uscată în aer</li> <li>- Anodizare în 0,5 wt.% HF la temperatura camerei, U = 20V, în 60 min, se spală în apă deionizată și se usucă la aer</li> <li>- Tratată termic la 500°C pentru 2h</li> </ul>	[4]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie SiC de la 400 grit la 1200 grit</li> <li>- Metoda de decapare funcționează cu soluție HF 4% în termen de 2 min</li> <li>- Ultrasonare într-o serie de soluții de acetonă, soluție de alcool etilic, și apă deionizată în termen de 15 min</li> <li>- Apoi uscate în mod natural în aer</li> </ul>	[5]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie de 120 de grit și 1200 grit.</li> <li>- Anodizare în 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, U = 180V, la temperatura camerei</li> </ul>	[6]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie SiC de la 400, 600 la 1200 grit</li> <li>- Lustruire cu suspensie de alumină de 1 μm</li> <li>- Ultrasonare în apă distilată, apoi uscat în aer</li> <li>- Anodizare în electrolit de gel HAp, U = 14,5V, timp de 1 zi</li> </ul>	[7]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie SiC de la 400 grit la 1200 grit</li> <li>- Spălate cu apă purificată, degresate cu acetonă, uscate în aer.</li> </ul>	[8]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gravată în 12M HCl la 80°C timp de 1h</li> </ul>	[9]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire umedă pe hârtie 600 Grit SiC, spălate cu apă distilată și acetonă.</li> </ul>	[10]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire umedă pe hârtie 800 Grit SiC, clătit într-un amestec de apă distilată și acetonă</li> <li>- Se scufundă în 0,1 M NaOH la temperatura camerei timp de 1 zi, se clătește cu apă distilată și se usucă la temperatura camerei.</li> <li>- Tratată termic la 600°C într-o atmosferă inertă cu rata de 10° C/min</li> </ul>	[11]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie SiC de tip 100 grit și 600 grit</li> <li>- Metoda de decapare cu 4% HF în 2 min</li> <li>- Metoda de ultrasonare a fost aplicată în amestec de soluție de acetonă și soluție de alcool etilic în termen de 15 minute, spălate cu apă purificată și uscate în aer</li> </ul>	[12]
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lustruire cu hârtie de 300 de grit și 600 de grit</li> <li>- Gravată cu amestecul de HF și HNO<sub>3</sub> (raportul de volum este de 1:3), în 30 min, spălate cu apă purificată, apoi uscate în aer</li> </ul>	[13]

	- Anodizare în electrolit cec conține 0,5M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> și 5,79g/l NaF, U = 20V, timp de 60 min, se clătește cu apă distilată și se usucă la aer	
	- Metoda de decapare a fost aplicată prin modul în care se amestecă HF, HNO <sub>3</sub> , iar H <sub>2</sub> O cu raportul este 1: 3: 10	[14]
Ti6Al4V	- Lustruire cu șmirghel, curățați cu un amestec de soluție de acetonă și soluție de alcool, spălați în apă purificată și apoi uscați în aer. - Imersie în 8M NaOH la 60°C timp de 2 zile, se spală în apă distilată și se usucă la 40°C timp de 1 zi în aer	[15]
	- Lustruire mecanică cu hârtie SiC (interval de 600 - 1500 grit), lustruire cu pastă de diamant (tip de 1,5 μm) - Ultrasonare în acetonă, uscate - Tratament cu fascicul de electroni de mare energie, U = 700 keV, I = 1,5 mA, f = 100Hz, viteza de 20m/min	[15]
	- Măcinare mecanică, curățată - Tratat prin anodizare timp de 2 min în soluție 1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , U = 100V - Înmuiat în soluție NaOH	[17]
	- Măcinare mecanică, sablare cu grit - Gravată în soluție HF/HNO <sub>3</sub> - Imersare în 5M NaOH la 60°C timp de 24h	[18]
	- Măcinare mecanică și lustruire cu hârtie SiC cu interval de 400 - 1200 grit, spălare cu apă deionizată - Ultrasonare în acetonă	[19]
	- Lustruire cu hârtie abrazivă grit de 180, se spală în apă distilată	[20]

Tabelul 2.1 – Tratarea substratului de Ti și Ti6Al4V

### Formarea stratului de HAp pe Ti și Ti6Al4V

Deși precursorii folosiți în tehnica ED pentru a obține acoperiri pure de HAp au fost Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> și NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, de fapt, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> poate fi înlocuit cu Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O sau CaCl<sub>2</sub> și NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> poate fi înlocuit cu K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Tabelul 2.2].

Soluție electrolitică		Aditiv		pH	Temperatura (°C)	Soluția de corectare a pH-ului	Refs
Componentă	Concentrația (M)	Soluție	Concentrația (M)				
Ca(NR <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.042 0.025						[6]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Ca(NR <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O		KNO <sub>3</sub>	0.2	10			[7]
Ca(NR <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0-2 wt. % Nanotuburi de carbon	0.042 0.025			4.7		HCl sau NH <sub>4</sub> OH	[8]
CaCl <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.167 0.1	NaCl	0.1	6.0		NaOH	[9]
Ca(NR <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.042 0.025			4.5-5.5		NaNO <sub>3</sub> și NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O	[10]
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 0.3	N <sub>2</sub>		4.5	65	HCl sau NH <sub>4</sub> OH	[16]

Tabelul 2.2 – Soluții electrolitice pentru acoperirea cu HAp pe Ti și Ti6Al4V

### Tehnici de depunere electrochimică a impulsurilor

Cercetările actuale arată că cercetătorii mai interesați de tehnica PED au scopul de a oferi acoperiri HAp cu beneficii semnificative, cum ar fi utilizarea ușoară, puritatea ridicată a acoperirilor, modificarea ușoară a condițiilor de experiment și costul redus [21-24]. Metoda PED

permite caracterizarea iar structurile de acoperire pot fi ajustate și îmbunătățite prin modificarea factorilor: ciclul on-off (aceasta înseamnă timpul pentru puls on și timpul pentru puls off) și densitatea curentului [25]. PED este o metodă benefică, scopul de a elimina bulele de H<sub>2</sub> și sporește aderența acoperirilor HAp pe substraturi; această tehnică a fost detectată în diferite rapoarte. De exemplu, atunci când se aplică curentul pulsat, acoperirea HAp va fi afectată de aspecte precum aderența și cristalitatea, care au fost investigate în [9].

### Tratament ulterior

La metoda alcalină se utilizează soluția NaOH cu concentrație în intervalul 0,1 – 0,25 M, la temperatura cuprinsă între 60 – 80°C, curățarea (cu apă distilată mai întâi și apoi cu apă ultrapură) și uscarea cu temperatură în intervalul 60 – 450°C. Astfel, acoperirea Ca-P va fi transformată în acoperire HAp pură.

Tratamentele termice recomandate ca tehnică post-tratament pentru acoperire HAp sunt încă investigate. Această metodă este utilizată pentru a spori aderența a acoperirilor HAp pe suprafața probelor.

## 2.2 Hidroxiapatită dopată cu Ag depusă pe substraturile Ti și Ti6Al4V

Soluție electrolitică	Concentrație soluție electrolitică	valoarea pH-ului	T(°C)	Aditivi	Refs
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> AgNO <sub>3</sub>	0,042 mol/l 0,025 mol/l 0,1 mmol/l	4.2 (ajustat cu amoniac)	65		[26]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> AgNO <sub>3</sub>	5.00mmol/l 3,00 mmol/l 0, 0,5 și 1 mmol/l	4.0 (ajustat cu amoniac și acid azotic)	40	Cisteina (Ag <sup>+</sup> :cisteina = 2:1)	[27]

Tabelul 2.3 - Condițiile soluției electrolitice înainte de procesul de electrodepunere a HAp dopate cu Ag

Soluție electrolitică	Concentrare Soluție electrolitică	valoarea pH-ului	T (°C)	Aditivi	Refs
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AgNO <sub>3</sub> ZnNO <sub>3</sub>	0,49 M 0,29 M 10 ml/l 10 <sup>-3</sup> M 10 <sup>-3</sup> M	4.0 – 4.5	70	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[10]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AgNO <sub>3</sub>	3,78x10 <sup>-2</sup> M 2,5x10 <sup>-2</sup> M 2,52x10 <sup>-3</sup> M 1,68x10 <sup>-3</sup> M	4.5	65		[11]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Cs AgNO <sub>3</sub>	0,042 mol/l 0,025 mol/l 0,036 g/l 0,1 mmol/l	4.3 (ajustat cu amoniac)	50		[12]

Tabelul 2.4 - Condițiile soluției electrolitice înainte de procesul de electrodepunere a HAp dopate cu unii ioni



Pentru a obține acoperirea HAp-Ag, ca resursă de Ag a fost adăugat  $\text{AgNO}_3$  în soluția electrolică [Tabelul 2.3]. Soluțiile electrolice utilizate pentru depunerea electrochimică a HAp dopate cu alți ioni sunt prezentate în [Tabelul 2.4].

### 2.3 Zinc dopat în stratul de hidroxiapatită pe Ti și Ti6Al4V

Pentru a folosi Zn ca o substituție cationică pentru Ca în structura HAp, în toate studiile, acoperirile HAp-Zn au fost obținute prin utilizarea  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  [28],  $\text{ZnCl}_2$  [29] și  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [30].

### 2.4 Metoda de caracterizare a straturilor depozitate cu hidroxiapatită

- Tehnici fotonice: FTIR, Spectroscopie Raman, XPS și XRD.
- Tehnici de microscopie: SEM/EDX, TEM.
- Tehnici de caracterizare mecanică: determinarea aderenței, determinarea rugozității, metoda unghiului de contact.

### 2.5 Testul de biocompatibilitate pentru dispozitivele medicale: studiu documentar

- Teste *in vitro* pentru biocompatibilitate: culturile celulare utilizate sunt de mai multe tipuri [Tabelul 2.5] [31].

Cultura celulară	Descrie	Refs
Celule L929 (celule de șoarece, de tip fibroblaste)	- Celulele au fost cultivate în mediu conține 2,0 g/L $\text{NaHCO}_3$ , 4,5 g/L $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , 11 g/L $\text{C}_3\text{H}_7\text{NaO}_3$ , 2,383 g/L HEPES și 10% FBS. - Toate celulele au fost incubate într-un incubator în condiții de mediu: 37°C, 95% aer și 5% $\text{CO}_2$ . - Mediul a fost schimbat după fiecare 2 zile. - Celulele au fost colectate cu 0,25% tripsină	[37]
Celule MG 63 (celule umane, de tip osteoblaste)	- Celula a fost cultivată în DMEM conține 10% FBS și 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicină - 36.000 de celule (densitate de 10.000 celule/ $\text{cm}^2$ ) au fost adăugate în mediu de 2 ml pentru fiecare bine. - Toate celulele au fost incubate într-un incubator în condiții de mediu: 37°C, 95% aer și 5% $\text{CO}_2$ timp de 1, 3 și 7 zile	[32]
MG63 (celulă umană, de tip osteoblaste)	- Celulele au fost cultivate în DMEM completate cu 10% FCS și 1% penicilină și streptomycină. - Toate celulele au fost incubate într-un incubator în condiții de mediu: 37°C, 95% aer și 5% $\text{CO}_2$	[33]
SD (celule de șoarece, de tip osteoblaste)	- Celulele au fost cultivate în $\alpha$ -MEM completate cu 15% FBS - Toate celulele au fost incubate într-un incubator în condiții de mediu: 37°C, 95% aer și 5% $\text{CO}_2$	[27]
MC3T3-E1, (celule mouse-ului, de tip calvariale)	- Celulele au fost cultivate în mediu conține MEM completate cu 10% FBS și 1% penicilină / streptomycină - Toate celulele au fost incubate într-un incubator în condiții de mediu: 37°C, 95% aer și 5% $\text{CO}_2$ - Mediul a fost schimbat după fiecare 2 zile.	[26]
MG63 (celule umane, de tip osteoblaste)	- Celulele au fost cultivate într-un mediu care conține 10 ml MEM, 10% FCS, 2 mM l-glutamină, 1% penicilină/streptomycină. - Toate celulele au fost incubate într-un incubator în condiții de mediu: 37°C, 95% aer și 5% $\text{CO}_2$ - Mediul a fost schimbat după fiecare 3 zile.	[34]
MC3T3-E1, (celulă de șoarece, tip de osteoblaste)	- Celulele au fost cultivate în $\alpha$ -MEM completate cu 10% FBS, și 1% penicilină/streptomycină. - Densitatea celulară a fost de $2 \times 10^4$ celule/probă. - Mediul a fost schimbat după fiecare 2 zile.	[35]

Tabelul 2.5 – Culturi celulare

- Teste *in vivo* pentru biocompatibilitate: scopul acestui experiment este de a verifica nivelul de vătămare dat de dispozitivului medical pentru gazdă prin evaluarea aspectelor precum toxicitatea, genotoxicitatea, hemocompatibilitatea, biodegradarea etc. [36].

## 2.6 Încercarea de coroziune

Testul de polarizare a fost aplicat pentru a studia comportamentul de coroziune al acoperirilor la 37°C în fluidul corporal simulat (SBF) cu o stație de lucru electrochimică. Probele acoperite sau neacoperite au fost electrodul de lucru (WE) cu o suprafață de expunere de 1 cm<sup>2</sup>, foia de platină (Pt) a fost utilizată ca electrod contor (CE) și, respectiv, SCE ca electrod de referință (RE). Înainte de testare, fiecare probă a fost păstrată în SBF până la echilibrarea sistemului.

## 2.7 Bioactivitate *in vitro*

Bioactivitatea acoperirilor a fost investigată prin studierea capacității de formare a apatitei într-un fluid sanguin simulat (SBF) cu concentrații ionice egale cu plasma sanguină umană. SBF (fluid corporal simulat), cu pH = 7,42, a fost folosit ca soluție pentru testul *in vitro*.

## Capitolul 3: Rezultate experimentale

Rezultatele experimentelor sunt explicate în lumina teoriilor descrise în capitolul 2. În concluzie, acestea sunt rezumate în Tabelul 3.1

No	Pregătirea pentru substrat	Pregătirea pentru electrolit	Parametru	Rezultatul
3.1 Depunerea Ca-P a fost obținută prin procedeu electrochimic	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Substrat: Ti6Al4V, forma probei cu 2 cm diametru și 0,05 cm grosime.</li> <li>- Lustruire mecanică cu mașina PHOENIX BETA.</li> <li>+ Discul de șlefuire cu diamant avea dimensiunea de 74 μm (viteză în 300 RPM, în 3 min), 15 μm (viteză în 250 RPM, în 3 min).</li> <li>+ Hârtie SiC cu 320 și 600 grit (viteza în 200 RPM, în 3 min), 800 și 1000 grit (viteza în 200 RPM, în 4 min)</li> <li>+ Micro-pânză tip de 10" PSA 10/PK și lustruire cu suspensie de diamante policristaline de 9 μm (viteza în 100 RPM, 10 min)</li> <li>- Curățarea cu aparatul cu ultrasunete în iso-propanol timp de 20 min la 55°C cu frecvență 15kHz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> și 3 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> în apă distilată.</li> <li>- agitarea magnetică amestecă cu o viteză constantă de aproximativ 300 rpm în timpul procesului de depunere</li> <li>- pH = 3,990 (a fost ajustat cu 1M HNO<sub>3</sub>).</li> <li>- N<sub>2</sub> gaz a fost utilizat în baia electrolit în 20 min</li> <li>- Temperatura: 50°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NOI: Ti6Al4V</li> <li>- CE: Pt.</li> <li>- RE: Ag/KCl</li> <li>- U = -2 V până la 0 V,</li> <li>- Rata de scanare: 100 mV/s</li> <li>- Pauză: 100s</li> <li>- Numărul de cicluri: 36</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acoperirea uniformă Ca-P acoperă comparativ substratul specimenului cu morfologie asemănătoare microstructurii, care se adună pe suprafața substratului aliajului de titan și formează în mod uniform clustere</li> <li>- Omogenitatea acoperirii Ca-P a fost evaluată utilizând raportul Ca/P, care a variat de la 0,952 la 1,699</li> </ul>
3.2 Microstructura și compoziția acoperirii HAp, HAp-Ag prin investigații SEM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Substrat: Ti6Al4V, forma locului cu 2 cm de diametru și 0,3 cm de grosime.</li> <li>- Lustruire mecanică cu SiC (300-1200 grit).</li> <li>- Curățarea cu aparatul cu ultrasunete în acetona și apă timp de 20 min la 55°C cu frecvența de 15 kHz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O și 3 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>- 5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 4.5 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> și 0.5 mM AgNO<sub>3</sub></li> <li>- pH = 4,0 (a fost ajustat cu 1M HNO<sub>3</sub>).</li> <li>- agitarea magnetică se amestecă cu o viteză constantă de aproximativ 100 rpm în timpul procesului de depunere.</li> <li>- N<sub>2</sub> gaz a fost utilizat în baia electrolit în 20 min</li> <li>- Temperatura: 75°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NOI: Ti6Al4V</li> <li>- CE: Pt.</li> <li>- RE: KCl</li> <li>- U = -2 V până la 0 V,</li> <li>- Rata de scanare: 100 mV/s</li> <li>- Pauză: 100s</li> <li>- Numărul de cicluri: 36</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Realizarea acoperirilor HAp ne dopate și a acoperirilor Ag/HAp dopate obținute.</li> <li>- Morfologia HAp s-a schimbat după dopajul argintiu, dezvăluind o suprafață cu aglomerare a particulelor sferice de Ag.</li> <li>- Vârfulurile s-au deplasat ușor spre stânga, indicând faptul că Ag înlocuiește Ca prezent în zăbrelele HAp.</li> </ul>
3.3 Studii privind microstructura și compoziția acoperirilor HAp, HAp-Ag și HAp-Zn efectuate de investigațiile SEM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Substrat: Ti, forma discului cu diametrul de 14 mm și grosimea de 1 mm.</li> <li>- Lustruire mecanică cu SiC (320, 600, 800 grit).</li> <li>- Curățarea cu mașina cu ultrasunete în 2- propanol timp de 20 min la 55°C cu frecvența 15 kHz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O și 6 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>- 9.975 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> și 0.025 mM AgNO<sub>3</sub></li> <li>- 9.975 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> și 0.025 mM Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</li> <li>- pH = 5,0</li> <li>- agitarea magnetică se amestecă cu o viteză constantă de aproximativ 50 rpm în timpul procesului de depunere</li> <li>- N<sub>2</sub> gaz a fost utilizat în baia electrolit în 20 min</li> <li>- Temperatura: 75°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NOI: Ti</li> <li>- CE: Pt.</li> <li>- RE: KCl</li> <li>- I = 0,6 mA/cm<sup>2</sup></li> <li>- t = 20 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uniforme și groase HAp, HAp-Ag, și acoperiri HAp-Zn au fost depozitate cu succes pe o suprafață Ti.</li> <li>- Microstructurile stratului HAp au fost transformate dintr-o structură asemănătoare plăcii în cristale asemănătoare plăcii, combinate cu o structură albă asemănătoare ramurilor cu flori și o structură interconectată de tip rețea.</li> <li>- Rugozitatea suprafeței s-a dovedit a fi redusă după adăugarea elementelor Ag și Zn la acoperirea HAp (în special, Ra = 1847,36 nm pentru HAp/Ti, Ra = 482,84 nm pentru HAp-Ag/Ti, Ra = 214,79 nm pentru HAp-Zn/Ti)</li> <li>- Grosimea stratului a scăzut, de asemenea, după adăugarea elementelor Ag și Zn (în special, HAp/Ti (12.73 μm), HAp-Ag/Ti (10.60 μm), HAp-Zn/Ti (6.20 μm))</li> </ul>

<p>3.4 Investigarea corozivității, bioactivității și biocompatibilității acoperirilor HAp, HAp-Ag și HAp-Zn</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Substrat: Ti, forma discului cu diametrul de 14 mm și grosimea de 2 mm.</li> <li>- Lustruire mecanică cu SiC (400 -, 800 grit).</li> <li>- Curățarea cu mașina cu ultrasunete în 2- propanol timp de 20 min la 55°C cu frecvența 15 kHz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mM <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math> și 6 mM <math>\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4</math></li> <li>- 9.975 mM <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math>, 6 mM <math>\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4</math> și 0.025 mM <math>\text{AgNO}_3</math></li> <li>- 9.975 mM <math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math>, 6 mM <math>\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4</math> și 0.025 mM <math>\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}</math></li> <li>- pH = 5,0 (1M NaOH)</li> <li>- agitarea magnetică se amestecă cu o viteză constantă de aproximativ 50 rpm în timpul procesului de depunere</li> <li>- <math>\text{N}_2</math> gaz a fost utilizat în baia electrolit în 20 min</li> <li>- Temperatura: 75°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NOI: Ti</li> <li>- CE: Pt</li> <li>- RE: KCl</li> <li>- <math>I = - 0,85 \text{ mA/cm}^2</math></li> <li>- <math>t = 1200 \text{ s}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Morfologia HAp a fost panglica ca cristalele; adăugarea ag în HAp duce la unele aglomerări de particule Ag au fost observate; în cazul acoperirilor HAp-Zn, morfologia a fost o rețea poroasă interconectată</li> <li>- Compoziția elementară a indicat că adăugarea ag și zn îmbunătățește raportul Ca/P de HAp de la o valoare de 1,49 pentru HAp simplu la 1,62 pentru HAp-Zn și 1,67 pentru HAp-Ag.</li> <li>- După 21 de zile de imersiune în SBF, cele mai mari valori au fost înregistrate pentru acoperirile HAp-Ag (7,11 mg), urmate de HAp (4,58 mg) și HAp-Zn (4,38 mg), în timp ce cp-Ti au înregistrat cea mai mică valoare (2,11 mg);</li> <li>- Investigațiile preliminare de cultură celulară au arătat că Ag-HAp și Zn-HAp de acoperire au fost non-citotoxice și biocompatibile și adăugarea generală de Ag și Zn în HAp îmbunătățit comportamentul HAp.</li> <li>- Cea mai mică densitate a curentului de corozivitate și cea mai mare rezistență la polarizare a fost obținută pentru acoperirile HAp-Zn, urmate îndeaproape de cele în care Ag a fost folosit ca element de dopaj.</li> </ul>
---	--	--	--	---

Tabelul 3.1 - Rezumatul rezultatelor obținute

### 3.1 Caracterizarea suprafețelor straturilor de fosfat de calciu obținute prin procedeu electrochimic

- Studii de suprafață și morfologice prin investigații SEM

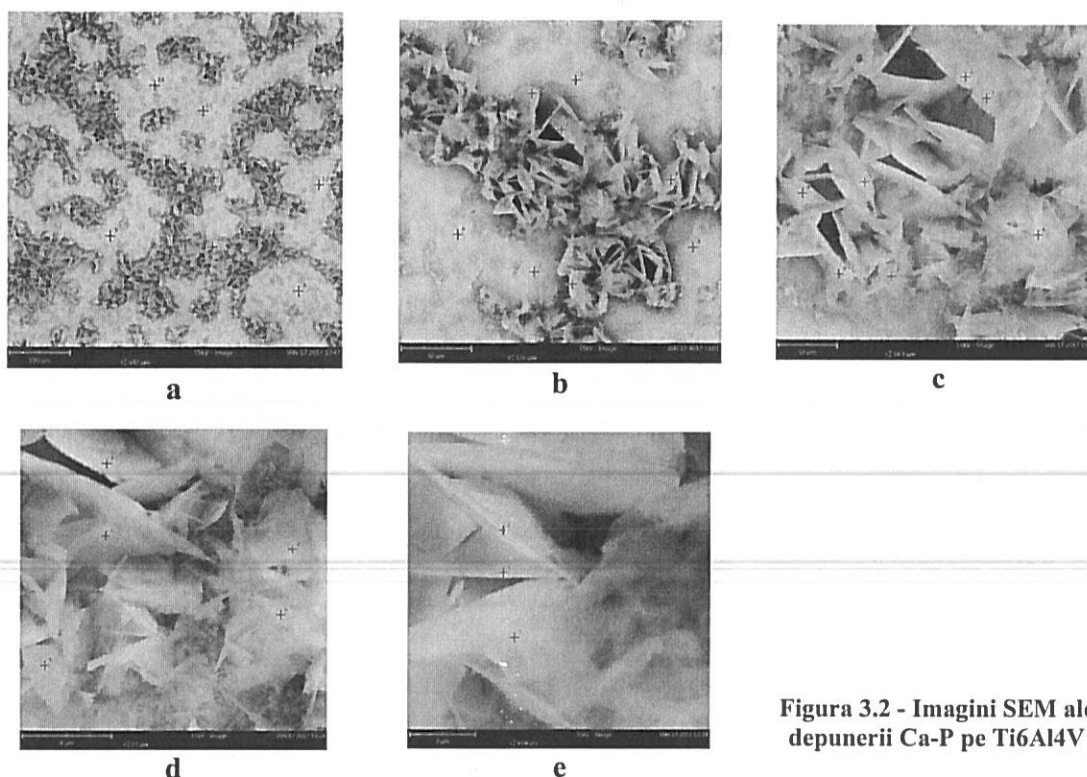


Figura 3.2 - Imagini SEM ale depunerii Ca-P pe Ti6Al4V

## - Compoziția stratului depus

a	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	68.67	47.31
	20	Ca	Calciu	14.17	24.46
	15	P	Fosfor	8.34	11.12
	22	Ti	Titan	7.49	15.43
	13	Al	Aluminiu	1.06	1.23
	14	Si	Siliciu	0.17	0.20
	23	V	Vanadiu	0.11	0.25

b	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	62.42	37.38
	22	Ti	Titan	30.28	54.25
	13	Al	Aluminiu	4.05	4.09
	20	Ca	Calciu	1.56	2.34
	15	P	Fosfor	1.48	1.71
	14	Si	Siliciu	0.21	0.22

c	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	63.26	37.90
	22	Ti	Titan	29.02	52.02
	13	Al	Aluminiu	3.69	3.73
	23	V	Vanadiu	1.77	3.38
	20	Ca	Calciu	1.07	1.60
	15	P	Fosfor	1.02	1.18
	14	Si	Siliciu	0.18	0.19

d	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	68.29	43.68
	22	Ti	Titan	23.57	45.11
	13	Al	Aluminiu	3.43	3.70
	23	V	Vanadiu	1.50	3.06
	20	Ca	Calciu	1.43	2.30
	15	P	Fosfor	1.43	1.77

Tabelul 3.2 Compoziția elementală

a	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	73.28	51.84
	22	Ti	Titan	12.41	26.26
	20	Ca	Calciu	6.77	11.99
	15	P	Fosfor	5.04	6.90
	13	Al	Aluminiu	2.20	2.62
	14	Si	Siliciu	0.31	0.39

b	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	65.07	42.08
	22	Ti	Titan	14.99	29.01
	20	Ca	Calciu	10.37	16.81
	15	P	Fosfor	7.69	9.63
	13	Al	Aluminiu	1.44	1.57
	23	V	Vanadiu	0.44	0.91

c	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	54.02	31.56
	22	Ti	Titan	18.42	32.19
	20	Ca	Calciu	14.64	21.43
	15	P	Fosfor	10.88	12.31
	13	Al	Aluminiu	1.48	1.46
	23	V	Vanadiu	0.56	1.05

d	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	70.10	48.75
	20	Ca	Calciu	11.40	19.86
	22	Ti	Titan	8.90	18.52
	15	P	Fosfor	8.62	11.61
	13	Al	Aluminiu	0.85	1.00
	23	V	Vanadiu	0.12	0.26

e	Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
	8	O	Oxigen	66.19	44.20
	20	Ca	Calciu	13.08	21.88
	22	Ti	Titan	9.75	19.47
	15	P	Fosfor	9.67	12.50
	13	Al	Aluminiu	0.84	0.95
	23	V	Vanadiu	0.47	1.00

Tabelul 3.3 Compoziția elementală

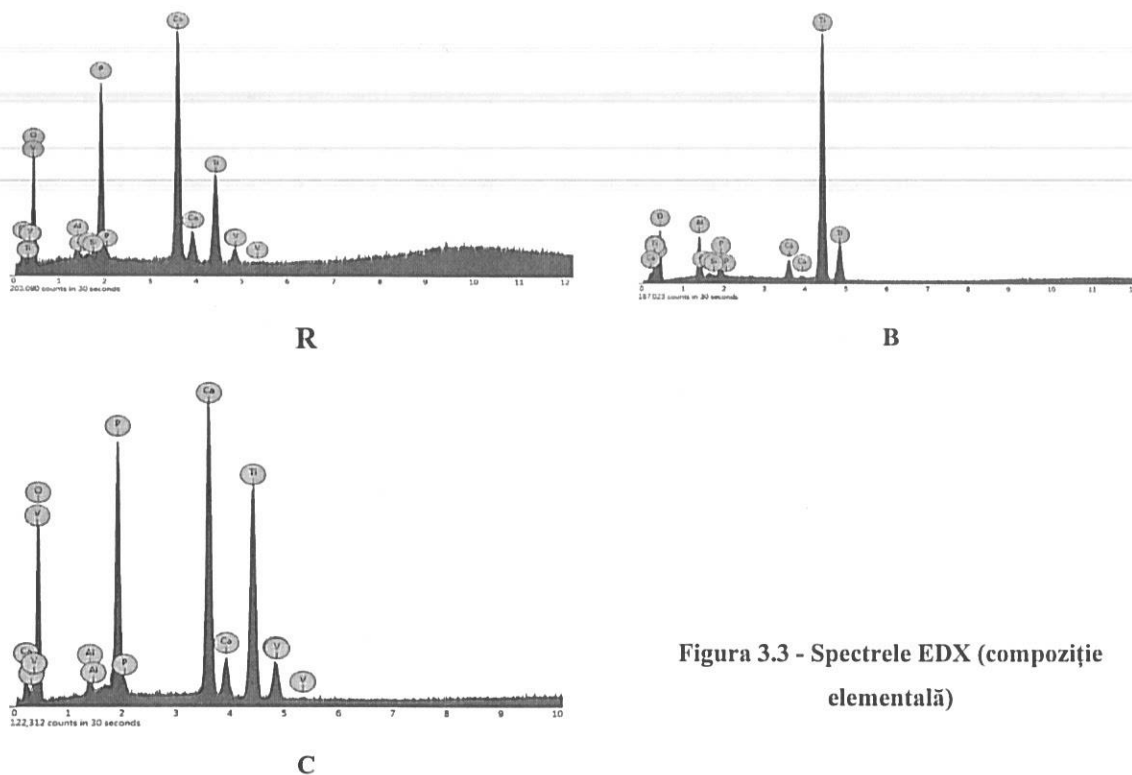


Figura 3.3 - Spectrele EDX (compoziție elementală)

### 3.2 Microstructura și compoziția elementală a acoperirilor HAp, HAp-Ag

- Microstructura acoperirii

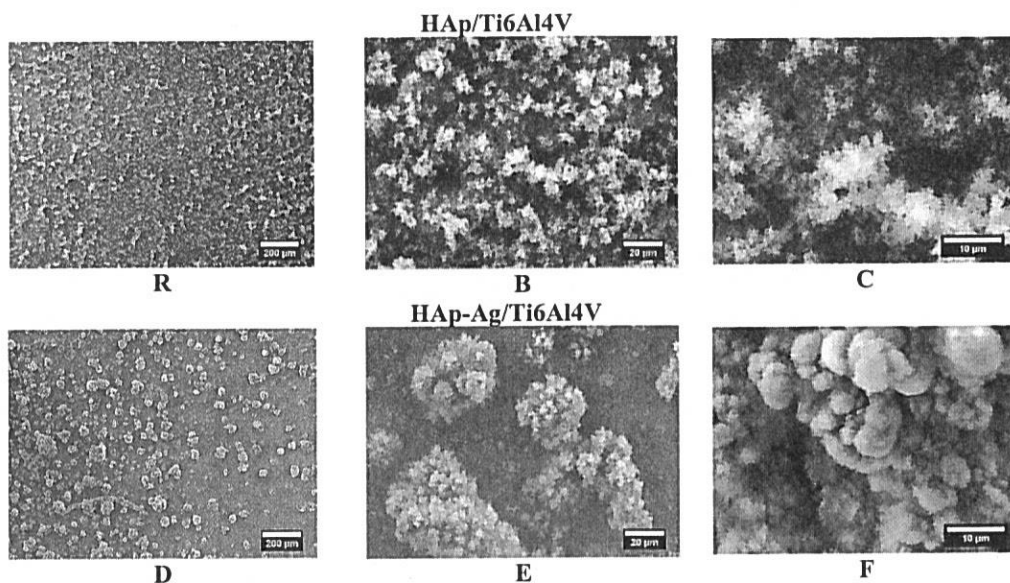


Figura 3.4 Imagini SEM ale acoperirilor HAp/Ti6Al4V și HAp-Ag/Ti6Al4V

- Analiza compoziției elementale

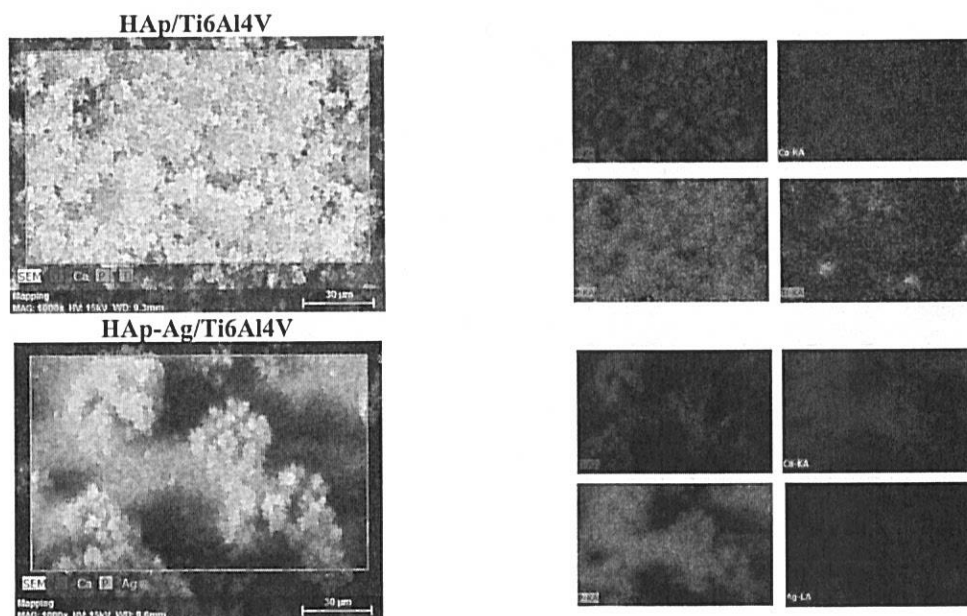


Figura 3.5 - Imagini SEM ale distribuției elementelor pentru acoperirile obținute HAp/Ti6Al4V (a, b) și HAp-Ag/Ti6Al4V (c, d)

Eșantion	HAp/Ti6Al4V				HAp-Ag/Ti6Al4V			
	Zona 1		Zona 2		Zona 1		Zona 2	
	% wt.	% at	% wt.	% at	% wt.	% at	% wt.	% at
Ca	38.04	21.80	38.03	21.6at9	34.55	21.19	33.31	19.40
P	15.77	11.70	15.29	11.29	14.86	11.79	14.53	10.95
O	42.14	60.51	42.59	60.86	39.53	60.72	42.97	62.70
Ti	1.23	0.59	1.13	0.54	-	-	-	-
C	2.82	5.39	2.95	5.62	2.87	4.25	2.87	5.58
Ag	-	-	-	-	8.98	2.05	6.32	1.37
Raportul Ca/P	1.86		1.92		1.97		1.90	

Tabelul 3.4- Compoziția elementală a acoperirilor obținute (EDS)

- Compoziția fazei acoperirilor

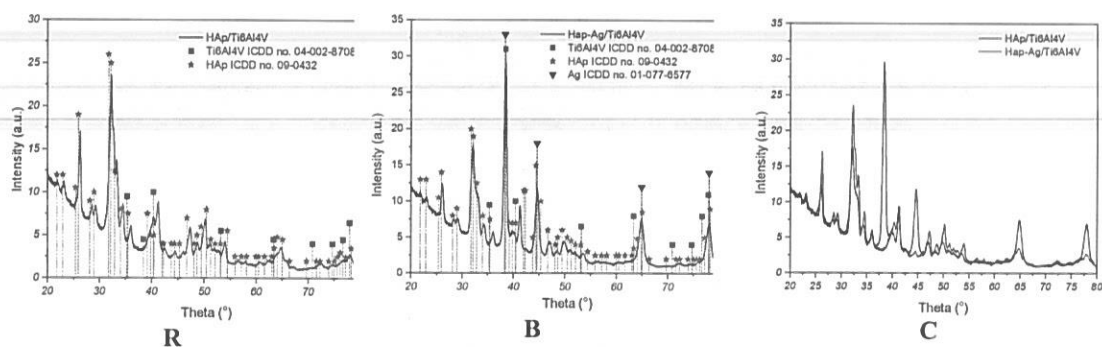
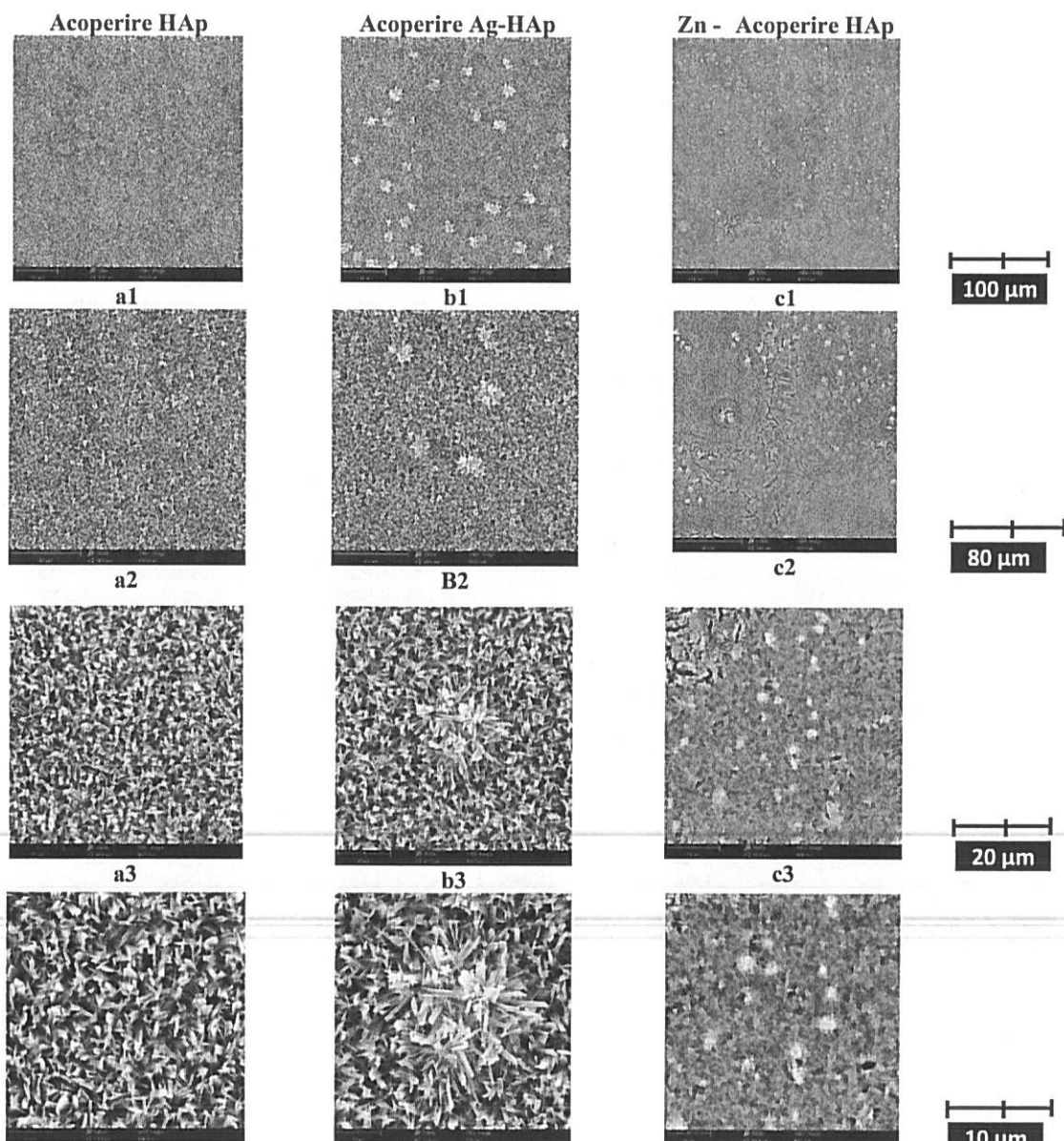


Figura. 3.6 - Spectrul XRD al acoperirilor obținute a) HAp/Ti6Al4V, b) HAp-Ag/Ti6Al4V, c) suprapunerea lor

3.3 Studii privind microstructura și compoziția acoperirilor HAp, HAp-Ag și HAp-Zn

- Investigații morfologice





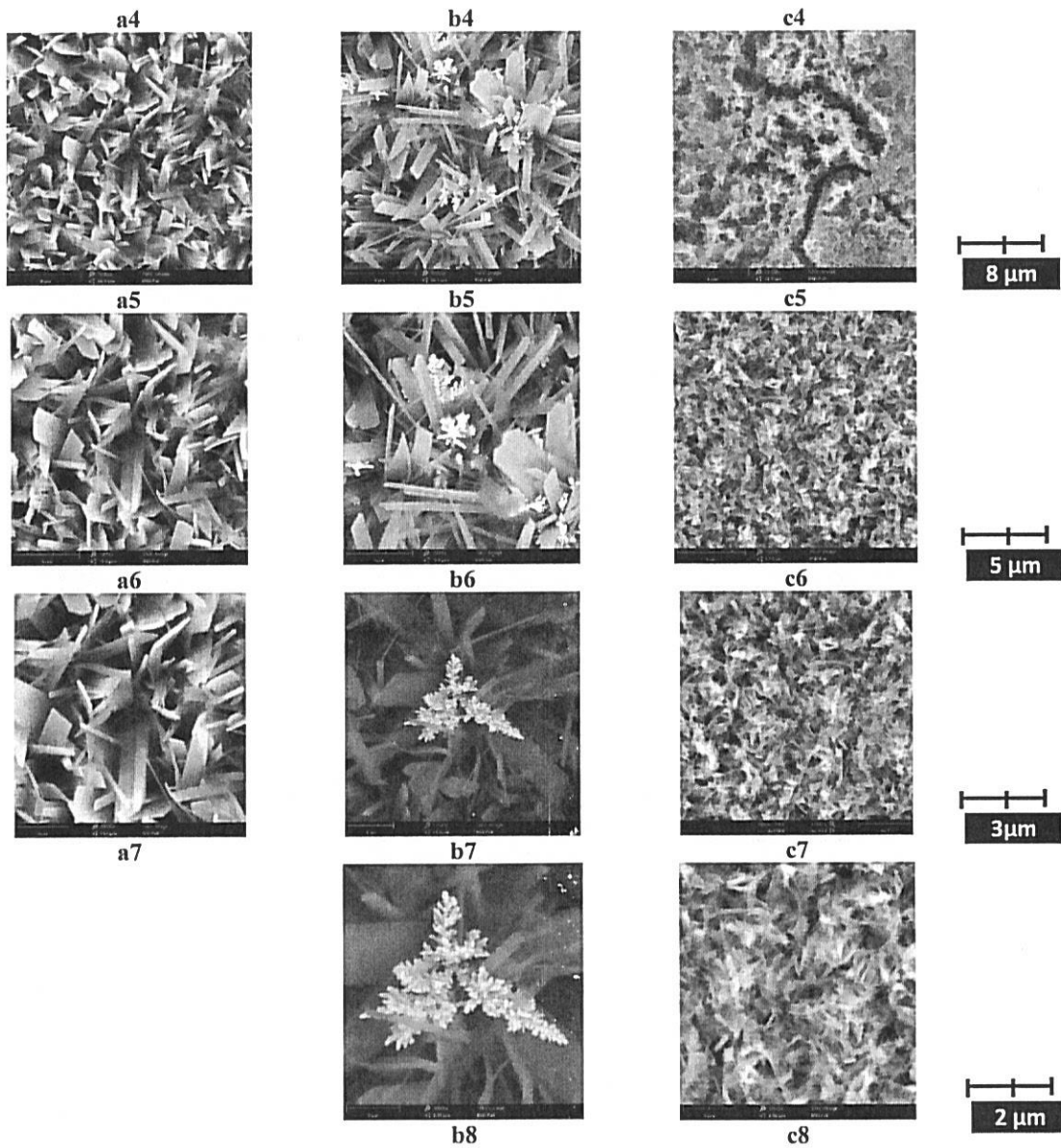


Figura 3.7 - Imagini SEM ale acoperirilor HAp, HAp-Ag, HAp-Zn obținute prin electrodepunere la mărirea  $\times 500$  (a1, b1 c1),  $\times 1000$  (a2, b2, c2),  $\times 3000$  (a3, b3, c3),  $\times 5000$  (a4, b4, c4),  $\times 10000$  (a5, b5, c5),  $\times 15000$  (a6, b6, c6),  $\times 25000$  (a7, b7, c7),  $\times 30000$  (b8, c8)

- Compoziția elementală

Acoperire Compoziția elementară	HAp/Ti		HAp-Ag/Ti				HAp-Zn/Ti			
	Zona 1		Zona 2		Zona 3		Zona 6		Zona 4	
	% wt.	% at.	% wt.	% at.	% wt.	% at.	% wt.	% at.	% wt.	% at.
Ca	32.09	18.10	60.22	58.89	65.67	60.70	67.21	61.41	66.91	61.35
P	16.83	12.28	29.55	37.39	32.27	38.59	32.51	38.43	32.12	38.11
O	48.38	68.35	-	-	-	-	-	-	-	-
Ti	2.70	1.27	-	-	-	-	-	-	-	-
Ag	-	-	10.24	3.72	2.07	0.71	-	-	-	-
Zn	-	-	-	-	-	-	0.29	0.16	0.98	0.55
Raportul Ca/P	1.47		1.67		1.94		1.60		1.62	

Tabelul 3.5 - Compoziția elementală a acoperirilor obținute prin depunere electrochimică

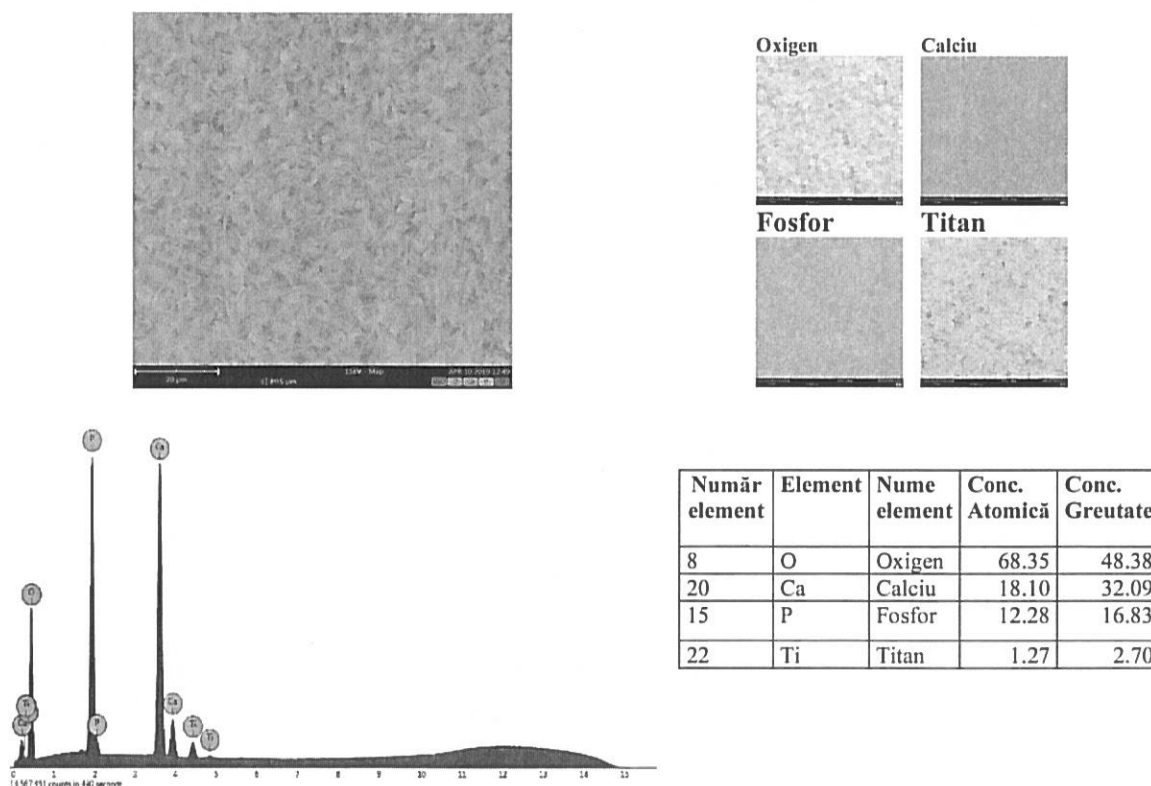
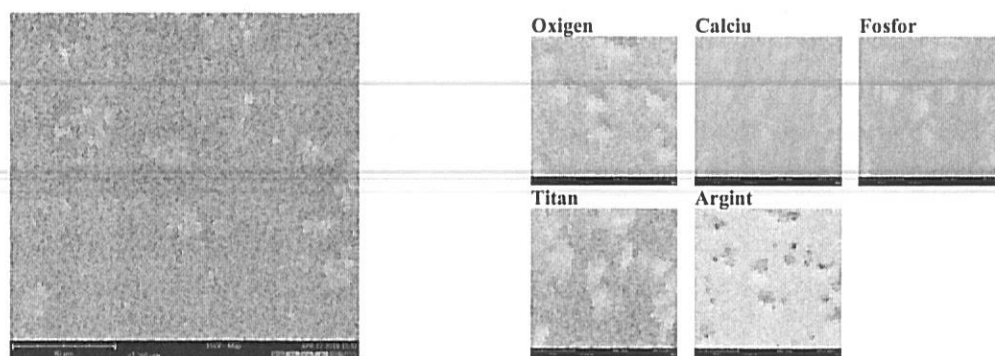


Figura 3.8 a - Compoziția chimică și distribuția elementală pentru acoperirile HAp/Ti examinate prin cartografierea elementală EDS



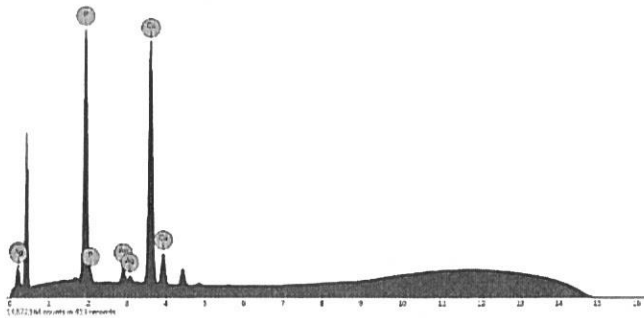


Figura 3.8 b - Compoziția chimică și distribuția elementală pentru acoperirile HAp-Ag/Ti examinate prin cartografierea EDS

Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
20	Ca	Calciu	58.89	60.22
15	P	Fosfor	37.39	29.55
47	Ag	Argint	3.72	10.24

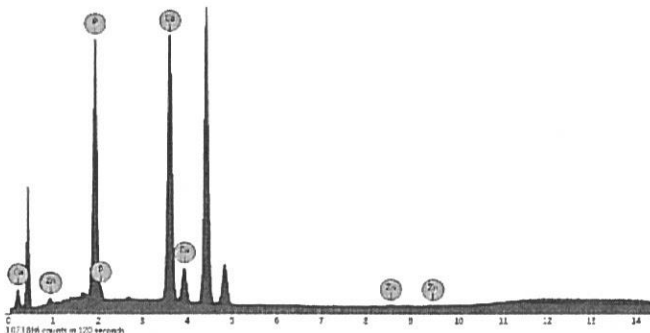
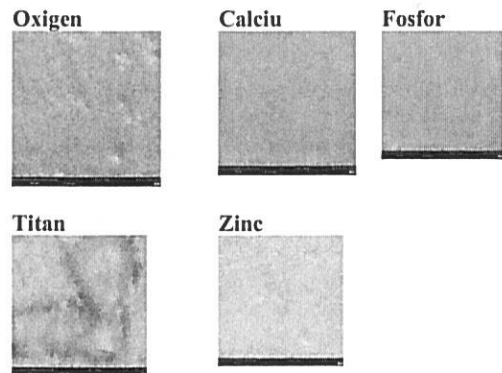
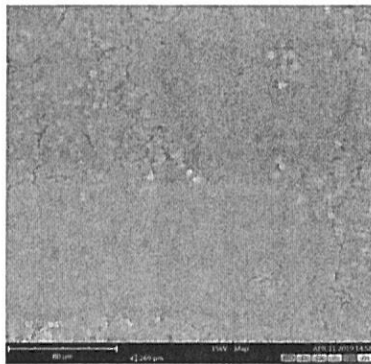
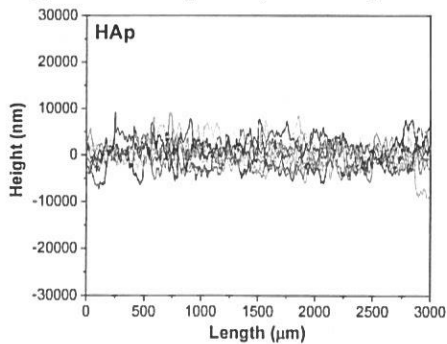


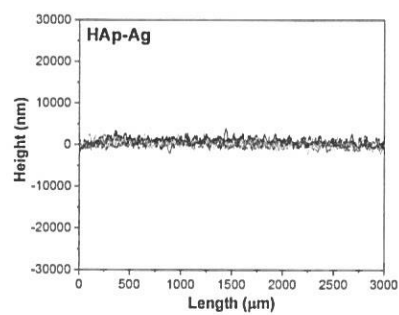
Figura 3.8 c - Compoziția chimică și distribuția elementală pentru acoperirile HAp-Zn/Ti examinate prin cartografierea elementală EDS

Număr element	Element	Nume element	Conc. Atomică	Conc. Greutate
20	Ca	Calciu	61.35	66.91
15	P	Fosfor	38.11	32.12
30	Zn	Zinc	0.55	0.98

**Rugozitatea suprafețelor acoperirilor**



a



b

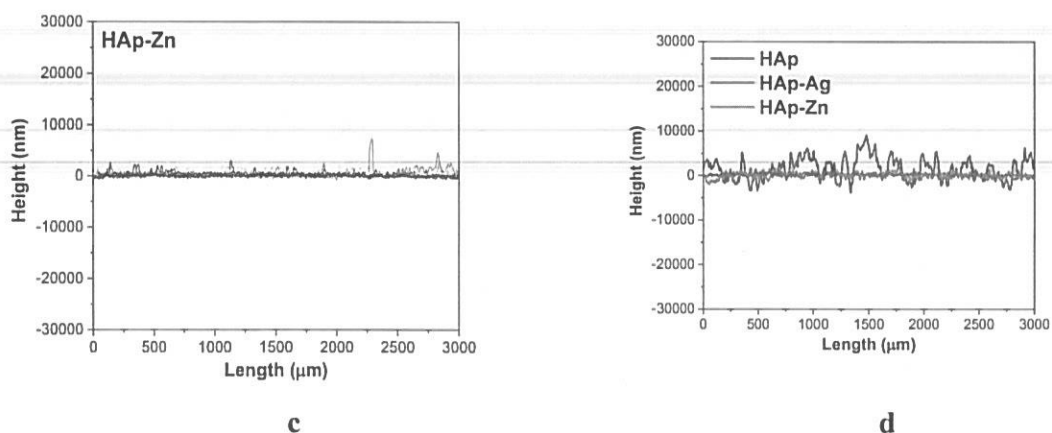


Figura 3.9 - Liniile de profil specifice pentru fiecare suprafață a grupului (a-c) și d) suprapunerea liniilor de profil reprezentative specifice fiecărui material

Probe	Ra (nm)	Sd	Rq (nm)	Sd	Skew	Sd
HAp	1847.36	± 277.07	2258.69	± 303.65	0.50	± 0.23
HAp-Ag	482.84	± 35.17	608.72	± 43.75	0.17	± 0.10
HAp-Zn	214.79	± 46.31	278.65	± 63.96	0.82	± 0.25

Tabelul 3.6 - Parametrii de rugozitate caracteristici

(Ra - rugozitate medie, Rq-rădăcină medie pătratică, Skew-încalinare)

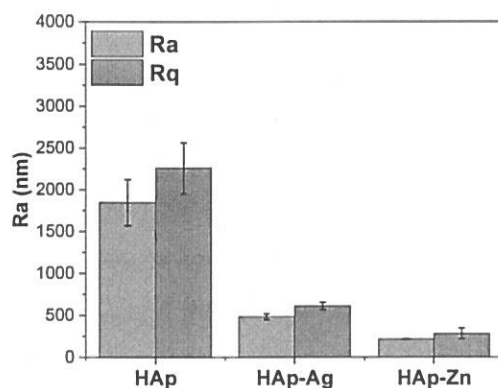
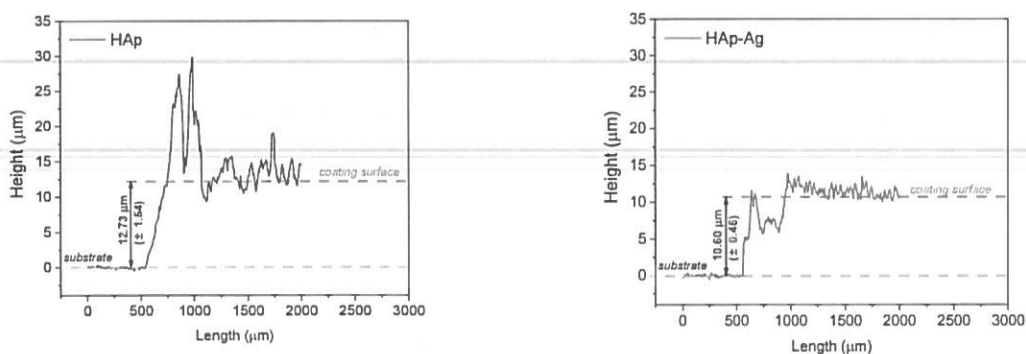


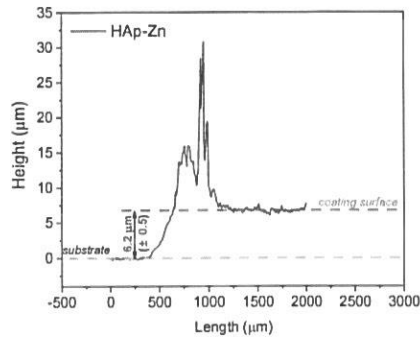
Figura 3.10 - Rugozitatea acoperirii (Ra și Rq)

### Grosimile acoperirilor



R

B



C

Figura 3.1 0 - Grosimea acoperirii HAp/Ti (a), HAp-Ag/Ti (b) și HAp-Zn/Ti (c)

Probe	Grosime (μm)	Sd
HAp	12.73	± 1.54
HAp-Ag	10.60	± 0.46
HAp-Zn	6.20	± 0.51

Tabelul 3. 11 - Grosimea acoperirii HAp/Ti (a), HAp-Ag/Ti (b) și HAp-Zn/Ti (c)

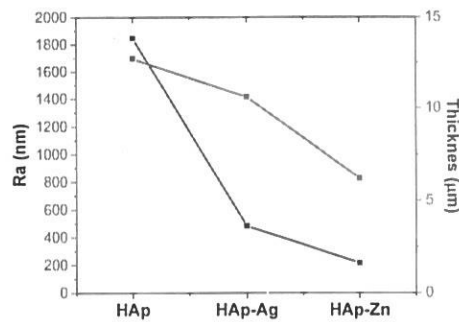


Figura 3.12 - Dependența dintre valorile rugozitate (Ra) și grosimea acoperirilor investigate

### 3.4 Investigarea coroziunii, bioactivității și biocompatibilității acoperirilor HAp, HAp-Ag și HAp-Zn

- Evaluarea bioactivității

Eșantion	Masa [mg]				
	Ziua 1	Ziua 3	Ziua 7	Ziua 14	Ziua 21
cp-Ti	0,01 (±0,01)	-0,01 (±0,01)	0,01 (±0,01)	0,01 (±0,01)	2.62 (±0.01)
HAp	0,51 (±0,01)	0,71 (±0,01)	1.19 (±0.01)	2.08 (±0.01)	4.58 (±0.01)
HAp-Ag	0,41 (±0,01)	1.25 (±0.01)	2.59 (±0.01)	3.60 (±0.01)	7.11 (±0.01)
HAp-Zn	0,17 (±0,01)	1.11 (±0.01)	2.48 (±0.01)	3.41 (±0.01)	4.38 (±0.01)

Tabelul 3.8 - Evoluția masei stratului apatitic nou pe substrat după imersiunea în SBF

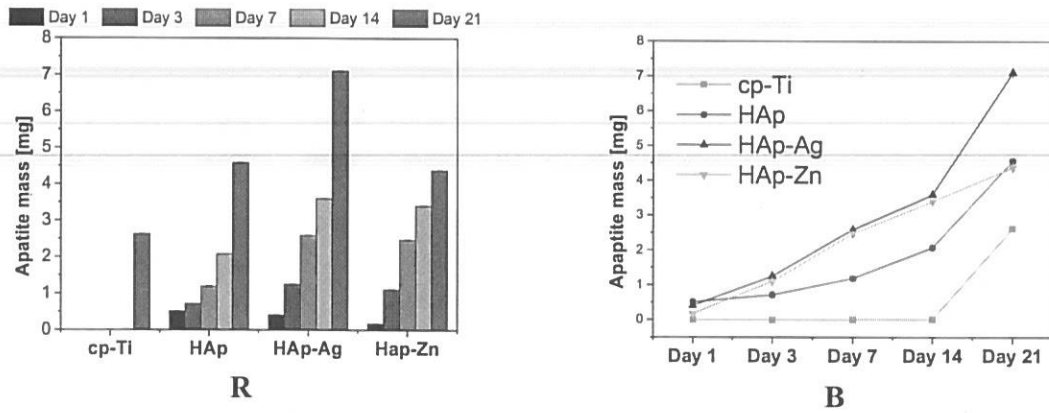


Figura 3.13 - Creșterea de masă a stratului apatitic pe Ti

- Analiza coroziunii electrochimice

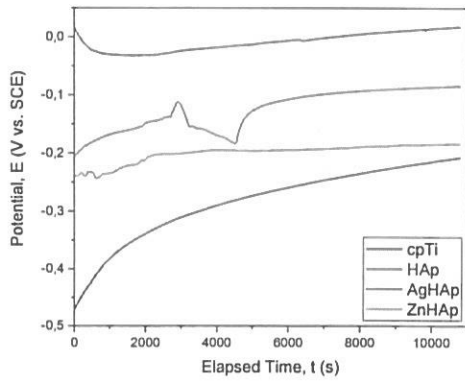


Figura 3.14 - Potențialul circuitului deschis al cp Ti și acoperirilor HAp

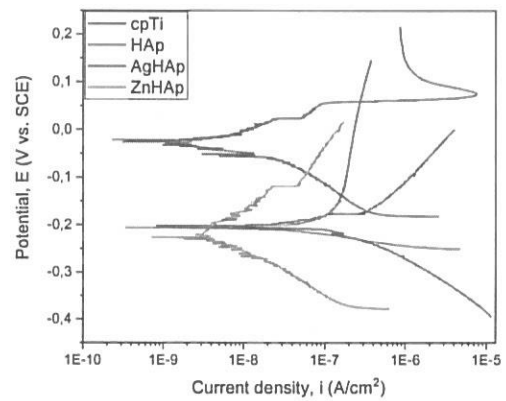


Figura 3.15 - Graficele Tafel ale cp Ti și acoperirilor HAp

Nr.crt.	Proba	$E_{oc}$ (mV)	$E_{corr}$ (mV)	$i_{corr}$ (nA/cm <sup>2</sup> )	$\beta_c$ (mV)	$\beta_a$ (mV)	$R_p$ (k $\Omega$ cm <sup>2</sup> )
1	cp Ti	-209.50	-201.25	246.15	112.12	160.20	116.50
2	HAp	-82.45	-207.21	128.40	45.24	777.85	144.78
3	HAp-Ag	18.54	-18.48	9.12	94.87	64.12	182.35
4	HAp-Zn	-184.02	-225.99	7.91	107.63	175.42	366.33

Tabelul 3.9 - Principali parametri electrochimici

- Evaluarea biocompatibilității

+ Morfologia celulelor

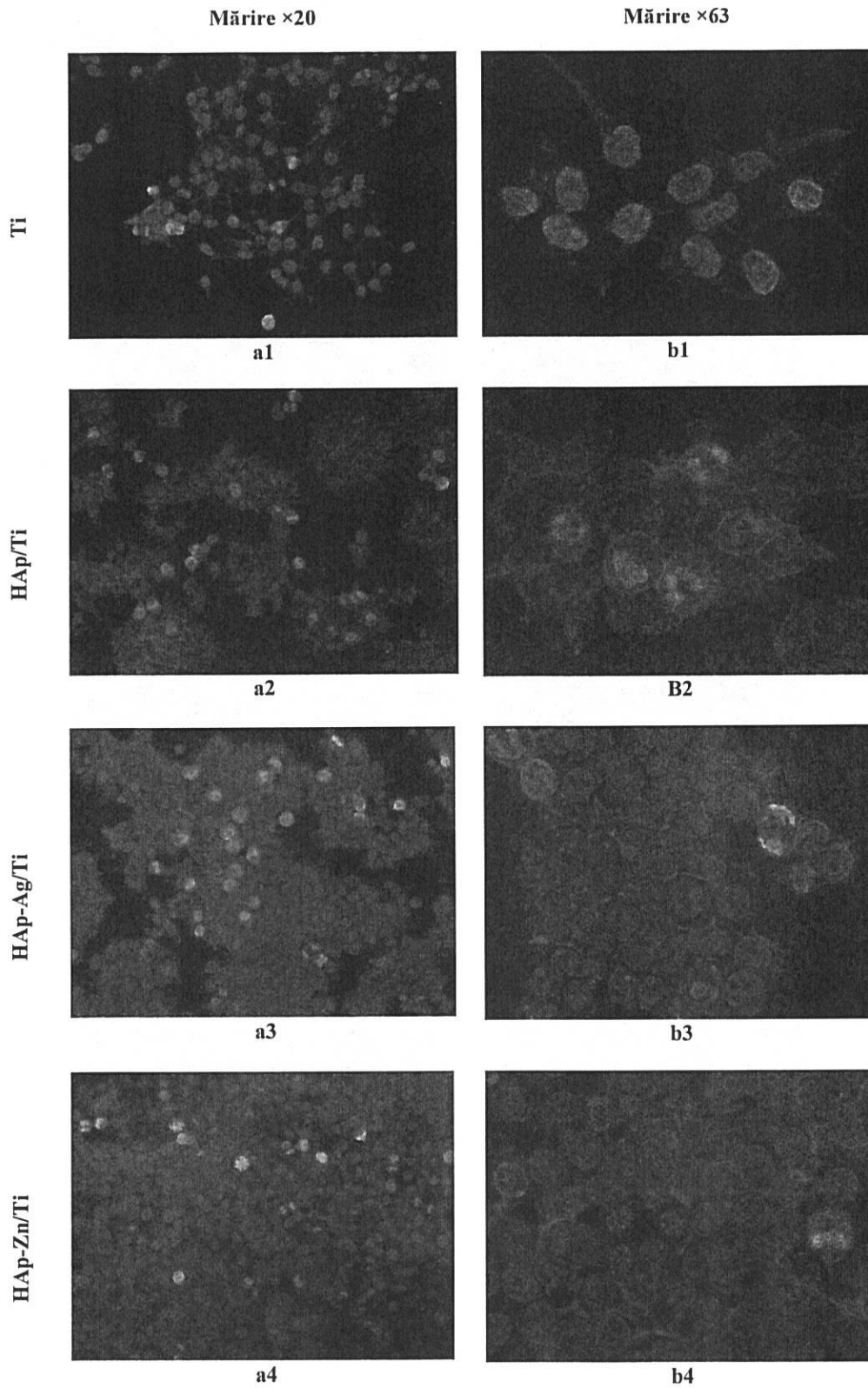


Figura. 3.16 - Rezultatele colorării pentru Actin și Ki67 a celulelor HEK 293T (Actin-roșu, Ki67-verde)

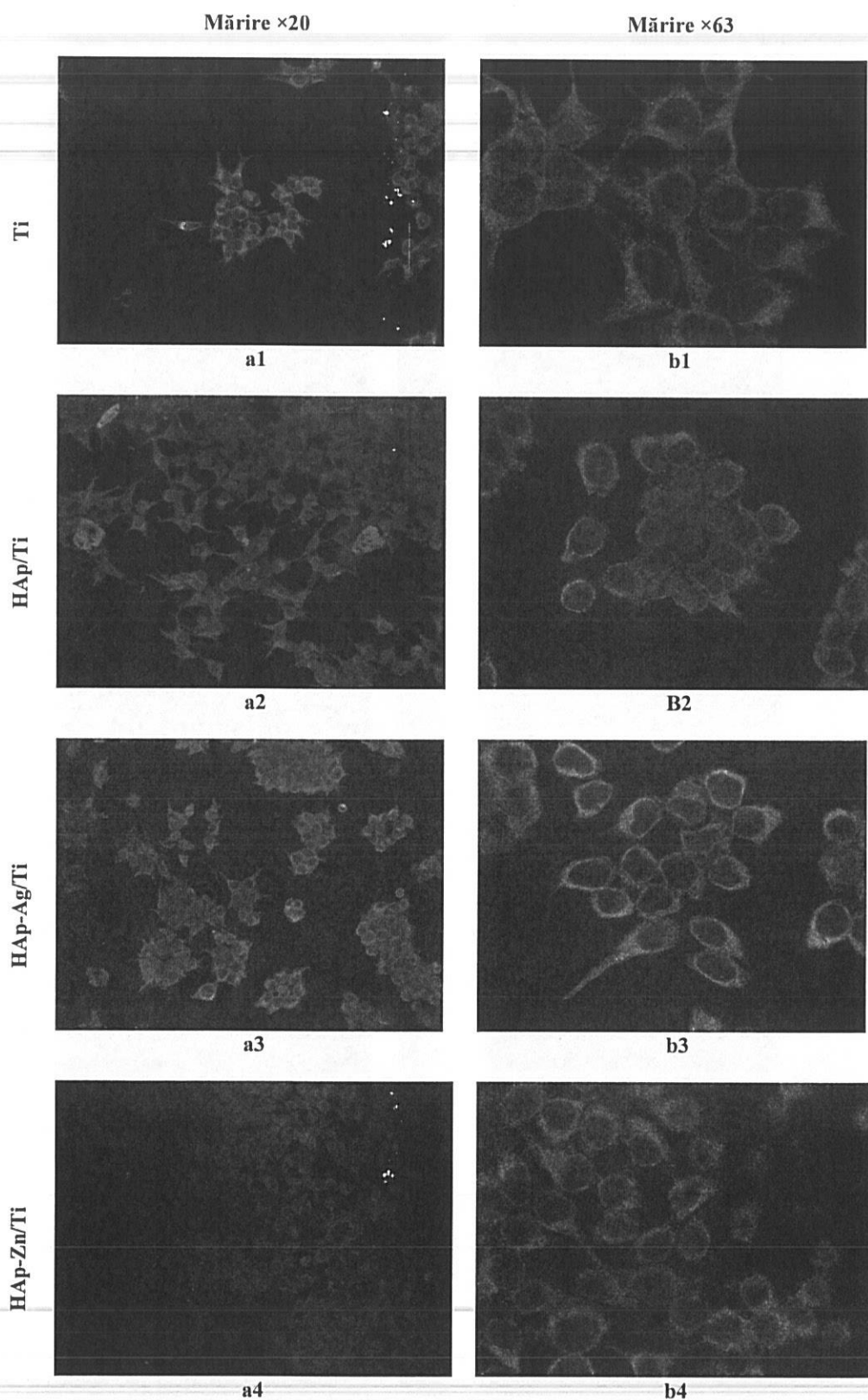


Figura 3.17 - Rezultatele colorării pentru Tubulin și PDI a celulelor HEK 293T (Tubulin-roșu, PDI-verde)



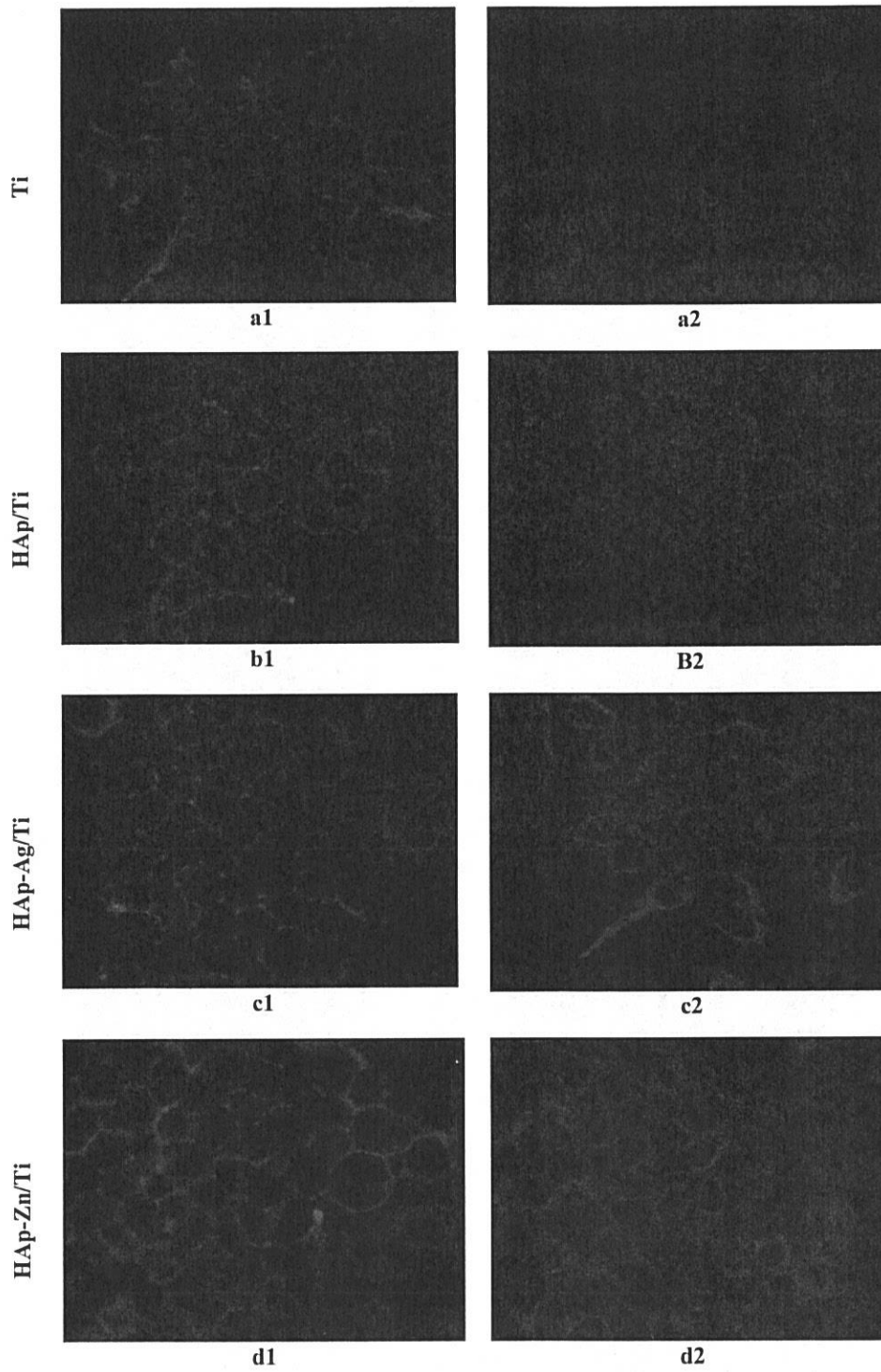


Figura 3.18a - Colorarea pentru Actin a stratului la mărire  $\times 63$  (a1, b1, c1, d1)

Figura 3.18b - Colorarea tubulinei stratului la mărire  $\times 63$  (a2, b2, c2, d2)

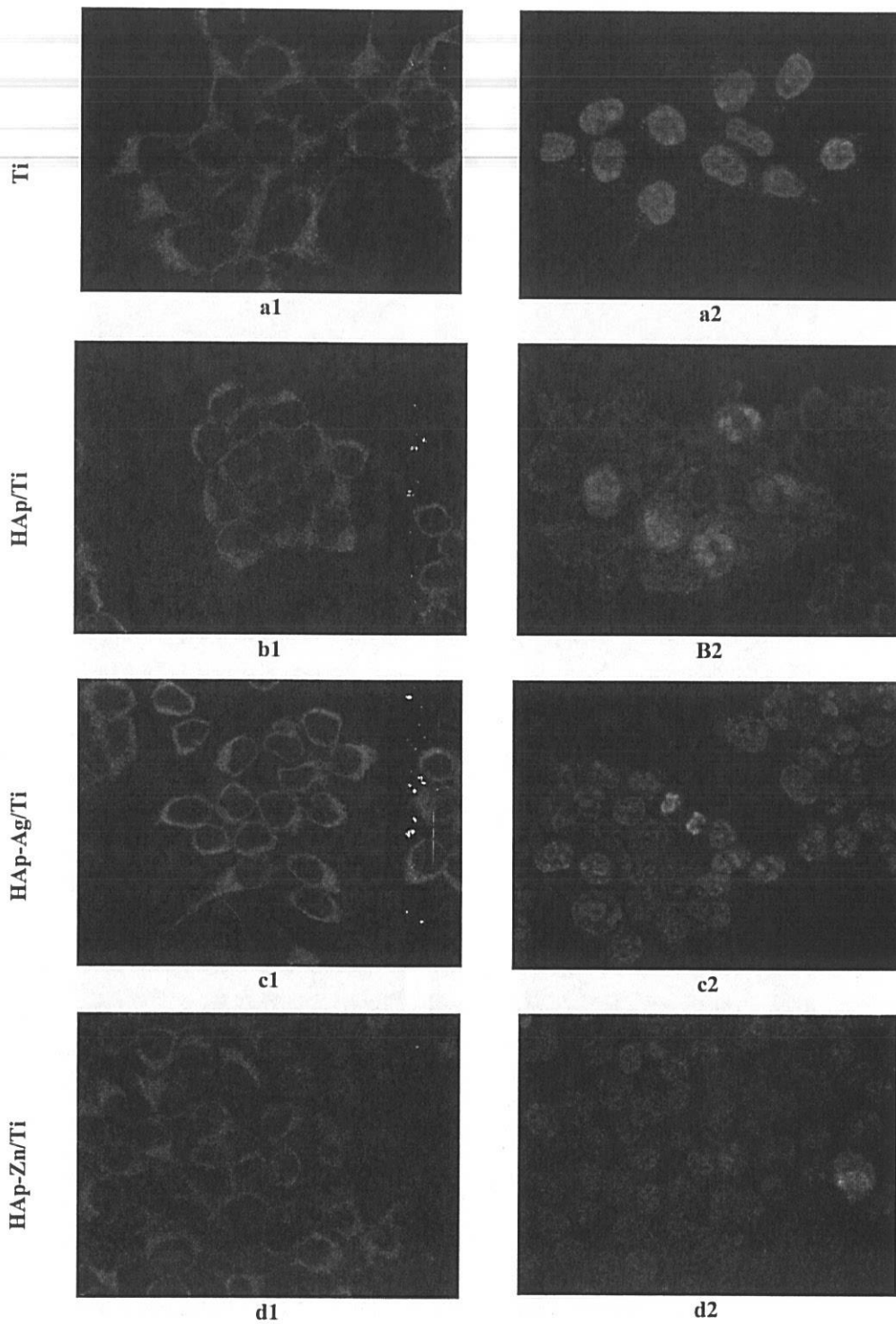


Figura 3.19 a - Colorarea pentru PDI a stratului de acoperire la mărire  $\times 63$  (a1, b1, c1, d1)

Figura 3.19 b - Colorarea pentru Ki67 a stratului la mărire  $\times 63$  (a2, b2, c2, d2)

+ Proliferarea celulară

Zile	Ti ( $\times 10^4$ )	HAp/Ti ( $\times 10^4$ )	HAp-Ag/Ti ( $\times 10^4$ )	HAp-Zn/Ti ( $\times 10^4$ )	Control ( $\times 10^4$ )
1	56.625	64.625	78.125	78.875	99
3	128.75	173.375	252.5	279.75	506.75
4	529.125	565.25	687	694.25	1526.625

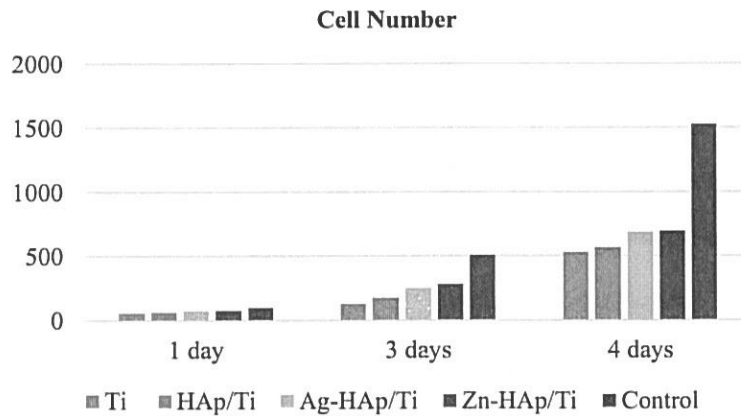


Fig 3.20 - Numărul de celule pe acoperire după 1, 3 și 4 zile.

Zile	Ti (%)	HAp/Ti (%)	HAp-Ag/Ti (%)	HAp-Zn/Ti (%)	Control (%)
1	77.73555	80.65162	83.10838	85.61191	88.29663
3	81.87358	84.37174	85.95683	86.34199	88.38133
4	82.09835	85.14409	86.19814	86.41666	89.15922

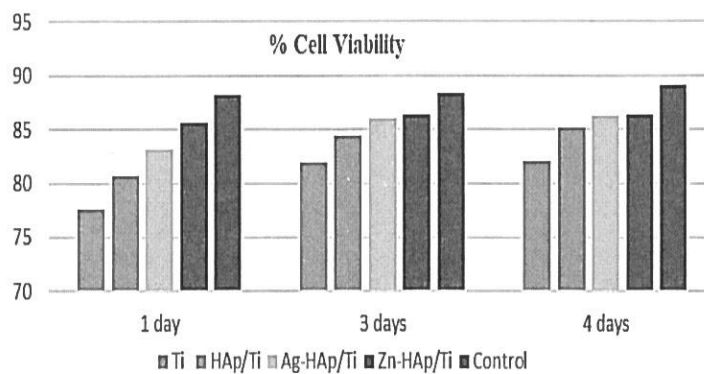


Fig. 3.21 - Viabilitatea celulară a acoperirilor după 1, 3 și 4 zile

## Capitolul 4: Concluzii și orientări ale activităților viitoare

### 4.1 Concluzii

Există o mulțime de metodologii de acoperire, cum ar fi: depunere spray cu plasmă, acoperiri sol-gel derivate, depunere fizică de vaporilor cu laser pulsant, ED, fascicul de ioni asistat, magnetron sputtering, oxidare micro-arc, etc. În teza mea, eforturile au fost axate pentru a prezenta un rezumat al principiilor de bază ale tehnicilor ED. Acesta conține caracterizări benefice, cum ar fi comportamentul de bioactivitate și proprietatea de biocompatibilitate legate de aceste acoperiri pentru modificările de suprafață ale Ti și Ti6Al4V.

Următoarele concluzii sunt trase scopul de a prezenta cercetarea mea:

1. depunerea Ca-P pe substraturi Ti6Al4V prin procesul ED a fost realizat cu succes. Acoperirea uniformă Ca-P are morfologie asemănătoare unui fulgilor, care se adună pe suprafața substratului Ti6Al4V și creează clustere uniforme. Omogenitatea acoperirii Ca-P a fost evaluată utilizând raportul molar Ca/Ti, care a variat de la 0,952 la 1,699 în regiunea examinată a suprafeței de acoperire prezentată de imaginea SEM.
2. Procesul ED a fost aplicat în mod eficient pentru realizarea de acoperiri HAp nedopate și acoperirilor dopate HAp-Ag, care au caracteristică antibacteriană. Datele analitice de la XRD, SEM și EDX au arătat că această metodă este benefică în producerea acoperirii cu HAp. Microstructura fazei HAp-Ag și rezultatele XRD au arătat că există modificări nesemnificative ale morfologiei acoperirii în acoperirea dopată. Caracteristicile morfologice ale HAp s-au modificat după dopajul cu ioni de  $Ag^+$ , suprafața prezentând aglomerări de particule sferice de ioni  $Ag^+$ . Compoziția acoperirilor HAp s-a schimbat prin adăugarea de ioni  $Ag^+$ , vârfurile s-au mutat spre stânga din cauza substituției ionilor  $Ca^{+2}$  cu  $Ag^+$  în cristalele HAp.
3. Acoperirile HAp, HAp-Ag și HAp-Zn s-au depus eficient pe suprafața Ti prin tehnica ED la temperaturi de aproximativ  $75^{\circ}C$ , densități scăzute ale curentului ( $0,6 \text{ mA/cm}^2$ ) și timp de 20 min. S-au obținut acoperiri uniforme și groase. Rugozitatea suprafeței s-a dovedit a fi mai redusă după adăugarea elementelor Ag și Zn la acoperirea HAp (în special,  $Ra = 1847,36 \text{ nm}$  pentru HAp/Ti,  $Ra = 482,84 \text{ nm}$  pentru HAp-Ag/Ti,  $Ra = 214,79 \text{ nm}$  pentru HAp-Zn/Ti). Grosimea stratului de acoperire a scăzut, de asemenea, după adăugarea elementelor Ag și Zn (în special, HAp/Ti (12.73), HAp-Ag/Ti (10.60), HAp-Zn/Ti (6.20)). Diferențele de grosime pot fi asociate cu rata de depunere care este influențată de elementul de dopaj, Ag sau Zn, adăugat în electrolit. Având în vedere că toți parametri implicați în depunerea electrochimică au fost menținuți

constanți, se poate presupune că elementele de dopare afectează rata de depunere și/sau germinarea și creșterea HAp.

4. Morfologia HAp a fost de cristale de tip panglică subțire; adăugarea Ag în HAp nu a indus modificări majore ale morfologiei panglicilor, au fost observate dar unele aglomerări de particule Ag; în cazul acoperirilor HAp-Zn, morfologia a contat din cristale foarte subțiri care au format o rețea poroasă interconectată. După perioada de 21 de zile de imersie în soluția SBF, cele mai mari valori au fost înregistrate pentru acoperirile HAp-Ag (7,11 mg), urmate de HAp (4,58 mg) și HAp-Zn (4,38 mg), în timp ce pe cp-Ti au înregistrat cea mai mică valoare (2,11 mg). Investigațiile preliminare de cultură celulară au arătat că acoperirile Ag-HAp și Zn-HAp au fost non-citotoxice și biocompatibile, iar în general adăugarea Ag și Zn în HAp a îmbunătățit comportamentul HAp. Chiar dacă ambele acoperiri dopate au îmbunătățit rezistența la coroziune a substratului cp-Ti și comportamentul electrochimic al HAp, este demn de menționat faptul că cea mai mică densitate a curentului de coroziune și cea mai mare rezistență la polarizare a fost obținută pentru acoperirile HAp-Zn, urmată îndeaproape de cele în care Ag a fost folosit ca element de dopaj.

#### 4.2 Contribuții personale

- Teza a contribuit cu succes la modificarea suprafeței Titanium și Ti6Al4V prin adăugarea a două elemente Argint și Zinc în acoperirile hidroxiapatitelor prin metoda de depunere electrochimică (acoperiri Ag-HAp și acoperiri Zn-HAp). Rezultatele obținute îndeplinesc cerințele suprafeței pentru materiale biomedicale, cum ar fi uniformitatea acoperirilor, proprietățile privind activitatea biologică, biocompatibilitatea și capacitatea de a rezista coroziunii;

- Teza contribuie, de asemenea, la identificarea cu succes a parametrilor metodei de depunere electrochimică, care creează suprafețele materialelor biomedicale pentru a depăși dezavantajele inițiale ale Ti și Ti6Al4V, cum ar fi: biocompatibilitate slabă, bioactivitate scăzută; se consolidează rezistența la coroziune și prezintă proprietăți non-toxice;

- Cu parametrii depunerii electrochimice stabiliți, au fost menționate constatările privind morfologia acoperirilor:

- + Într-adevăr, adăugarea Zn și Ag este cauza pentru a transforma morfologia acoperirilor HAp pe probele de Ti. Apar diferențe semnificative de morfologii pe suprafața acoperirilor HAp, HAp-Ag și HAp-Zn: cristale asemănătoare plăcilor, cristale asemănătoare plăcilor combinate cu cristale de tip înflorire asemănătoare ramurilor și, respectiv, structură de tip rețea interconectată.

+ Morfologia HAp a fost de cristalele tip panglică subțire; adăugarea Ag în HAp nu a indus modificări majore de morfologie ale panglicii, dar au fost observate unele aglomerări de particule Ag; în cazul acoperirilor HAp-Zn, morfologia a fost realizată din cristale foarte subțiri care au format o rețea poroasă interconectată, sugerând că Zn modifică cinetica germinării;

- Compoziția elementală a indicat că adăugarea Ag și Zn îmbunătățește raportul Ca/P al HAp. Teza contribuie, de asemenea, la identificarea compoziției atomice: adăugarea Ag și Zn îmbunătățește raportul Ca/P al HAp. Acoperirile HAp-Ag/Ti, HAp-Zn/Ti cu un raport Ca/P mai bogat decât acoperirea HAp.

- Rezultatele analizei microstructurii fazei Ag-HAp: compoziția este, de asemenea, schimbată prin adăugarea de ioni  $Ag^+$ , vârfurile fiind deplasate ușor spre stânga din cauza substituției ionilor  $Ag^+$  pentru  $Ca^{+2}$  în rețeaua HAp;

- Aspectele privind rugozitatea suprafeței și grosimea au fost, de asemenea, menționate: rugozitatea suprafeței s-a dovedit a fi redusă după adăugarea elementelor Ag și Zn în acoperirea HAp, în timp ce grosimea acoperirii a scăzut după adăugarea elementelor Ag și Zn;

- Măsurarea rezistenței la coroziune a stratului: atât acoperirile dopate (acoperirile Ag-HAp cât și acoperirile Zn-HAp) au îmbunătățit rezistența la coroziune a substratului cp-Ti și comportamentul electrochimic al HAp;

- În plus, testul *in vitro* arată că acoperirile Ag-HAp și Zn-HAp au fost netoxice și biocompatibile.

Pe scurt, teza a avut o contribuție semnificativă la modificarea suprafeței Ti și Ti6Al4V. Ca urmare, teza va avea direcții de dezvoltare și extindere în viitorul apropiat.

### 4.3 Orientarea lucrărilor viitoare

Pe baza studiilor teoretice și experimentale au fost făcute identificate mai multe căi promițătoare de cercetare viitoare:

- Îmbunătățirea în continuare prin studii privind acoperirea cu HAp co-dopată cu Ag și Zn (acoperire HAp-Ag-Zn) prin tehnica de depunere electrochimică. Influența acoperirii HAp co-dopate se va manifesta asupra aspectelor privind proprietățile mecanice, proprietățile fizico-chimice ale HAp. De asemenea, acoperirea HAp co-dopată va fi caracterizată în continuare în ceea ce privește morfologia structurii cristaline, grosimea, aderența, etc.

- Următoarele cercetări vor fi concentrate pentru a investiga caracterizarea antibacteriană a acoperirilor produse pe Ti și Ti6Al4V.

*Referințe bibliografice (selecție)*

- [1] Yajing Yan, Xuejiao Zhang, Huanhuan Mao, Yong Huang, Qiongqiong Ding, Xiaofeng Pang, Hydroxyapatite-gelatin functionalized graphene oxide composite coatings deposited on TiO<sub>2</sub> nanotube by electrochemical deposition for bio-medical applications, *Applied Surface Science* 329 (2015), 76–82
- [2] Yongxiang Zeng, Xibo Pei, Shuying Yang, Han Qin, He Cai, Shanshan Hu, Lei Sui, Qianbing Wan, Jian Wang, Graphene oxide-hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrochemical deposition, *Surface & Coatings Technology*, (2015),
- [3] Yajing Yan, Xuejiao Zhang, Caixia Li, Yong Huang, Qiongqiong Ding, Xiaofeng Pang, Preparation, and characterization of chitosan-silver-hydroxyapatite composite coatings on TiO<sub>2</sub> nanotube for bio-medical applications, *Applied Surface Science* 332, 62–69, (2015)
- [4] Yajing Yan, Qiongqiong Ding, Yong Huang, Shuguang Han, Xiaofeng Pang, Magnesium substituted hydroxyapatite coating on titanium with nanotubular TiO<sub>2</sub> intermediate layer via electrochemical deposition, *Applied Surface Science* 305, 77–85, (2014),
- [5] Xibo Pei, Yongxiang Zeng, Rui He, Zhongjie Li, Lingyang Tian, Jian Wang, Qianbing Wan, Xiaoyu Li, Hong Bao, Single-walled carbon nanotubes-hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition, *Applied Surface Science*, (2014).
- [6] Kang Lee, Yong-Hoon Jeong, Yeong-Mu Ko, Han-Cheol Choe, William A. Brantley, Hydroxyapatite coating on micropore-formed titanium alloy utilizing electrochemical deposition, *Thin Solid Film*, (2013)
- [7] M.A. El Mhammedi, M. Achak, M. Bakasse, Evaluation of a platinum electrode modified with hydroxyapatite in the lead (II) determination in a square wave voltammetric procedure, *Arabian Journal of Chemistry* 6, 299–305, (2013).
- [8] D. Gopi, E. Shinyjoy, M. Sekar, M. Surendiran, L. Kavitha, T.S. Sampath Kumar, Development of carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite composite coatings on titanium by electrodeposition method, *Corrosion Science* 73, 321–330, (2013).
- [9] Nik Norziehana Che Isa, Yusairie Mohd and Norjanah Yury, (2012), Electrochemical Deposition and Characterization of Hydroxyapatite (HAP) on Titanium Substrate, *APCBEE Procedia* 3, 46 – 52, (2012)
- [10] D.J. Blackwood, K.H.W. Seah, Galvanostatic pulse deposition of hydroxyapatite for adhesion to titanium for biomedical purposes, *Materials Science and Engineering C* 30 561–565, (2010).
- [11] D.J. Blackwood, K.H.W. Seah, Electrochemical cathodic deposition of hydroxyapatite -Improvements in adhesion and crystallinity, *Materials Science and Engineering C* 29, 1233–1238, (2009).
- [12] Jian Wang, Yonglie Chao, Qianbing Wan, Zhimin Zhu, Haiyang Yu, Fluoridated hydroxyapatite coatings on titanium obtained by electrochemical deposition, *Acta Biomaterialia* 5, 1798–180, (2009)
- [13] Zhao Xuhui, Yang Lingfang, Zuo Yu and Xiong Jinping, Hydroxyapatite Coatings on Titanium Prepared by Electrodeposition in a Modified Simulated Body Fluid, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(4) 667- 671, (2009)
- [14] Ming-[28]Jie Jiao, Xiao-Xiang Wang, Electrolytic deposition of magnesium-substituted hydroxyapatite crystals on titanium substrate, *Materials Letters* 63, 2286–2289, (2009)
- [15] Dai-Hua He, Pu Wang, Ping Liu, Xin-Kuan Liu, Feng-Cang Ma, Jun Zhao, HA coating fabricated by electrochemical deposition on modified Ti6Al4V alloy, *Surface & Coatings Technology*, (2015)
- [16] D. Gopi, El-Sayed M. Sherif, D. Rajeswari, L. Kavitha, R. Pramod, Jishnu Dwivedi, S.R. Polaki, Evaluation of the mechanical and corrosion protection performance of electrodeposited hydroxyapatite on the high energy electron beam treated titanium alloy, *Journal of Alloys and Compounds* 616, 498–504, (2014)
- [17] Lidia Benea, Eliza Mardare-Danaila, Jean-Pierre Celis, Increasing the tribological performances of Ti–6Al–4V alloy by forming a thin nanoporous TiO<sub>2</sub> layer and hydroxyapatite electrodeposition under lubricated conditions, *Tribology International* 78, 168–175
- [18] N. Metoki, L. Leifenberg-Kuznits, W. Kopelovich, L. Burstein, M. Gozin, N. Eliaz, Hydroxyapatite coatings electrodeposited at near-physiological conditions, *Materials Letters* 119, 24–27, (2014)
- [19] Dhanaraj Gopi, Arumugam Karthika, Subramani Nithiya, Louis Kavitha, In vitro biological performance of minerals substituted hydroxyapatite coating by pulsed electrodeposition method, *Materials Chemistry and Physics* 144, 75 – 85, (2014).
- [20] M. Saremi and B. Mottaghi Golshan, Electrodeposition of nano size hydroxyapatite coating on Ti alloy, *Iranian Journal of Materials Science and Engineering*, Vol. 3, Numbers 3 and 4, Summer and Autumn 2006
- [21] R. Drevet, H. Benhayounea, L. Worthama, S. Potirona, J. Dougladeb, D.L. Maquina, Effects of pulsed current and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount on the composition of electrodeposited calcium phosphate coatings, *Mater. Charact.* 61 (2010), 786-795
- [22] T. Frade, V. Bouzon, A. Gomes, M.I.S. Pereira, Pulsed-reverse current electro-deposition of Zn and Zn-TiO<sub>2</sub> nanocomposite films, *Surf. Coat. Technol.* 204 (2010), 3592-3598

- [23] H. Adelhani, M.R. Arshadi, J. Alloys Compd. Properties of Fe–Ni–Cr alloy coatings by using direct and pulse current electro-deposition, 476 (2009) 234-237
- [24] R. Drevet, H. Benhayoune, Pulsed electro-deposition for the synthesis of strontium-substituted calcium phosphate coatings with improved dissolution properties, Mater. Sci. Eng. C 33 (2013) 4260-4265
- [25] V. Sergio, O. Sbaizero, D.R. Clarke, Mechanical and chemical consequences of the residual stresses in plasma sprayed hydroxyapatite coatings, Biomaterials, 18 (1997), p. 477
- [26] Yajing Yan, Xuejiao Zhang, Yong Huang, Qionqiong Ding, Xiaofeng Pang, Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO<sub>2</sub> nanotube composite coatings on titanium, Applied Surface Science 314 (2014) 348–357
- [27] Xiong Lu, Bailin Zhang, Yingbo Wang, Xianli Zhou, Jie Weng, Shuxin Qu, Bo Feng, Fumio Watari, Yonghui Ding and Yang Leng, Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition J. R. Soc. Interface (2011) 8, 529–539
- [28] F. Ren, R. Xin, X. Ge, Y. Leng, Characterization and structural analysis of zinc substituted hydroxyapatites, Acta Biomater. 5 (2009) 3141–3149
- [29] Y. Tang, H.F. CHAppell, M.T.Dove, R.J.Reeder, Y.J.Lee, Zinc incorporation into hydroxylapatite, Biomaterials 30(2009) 2864–2872
- [30] H. Hu, W. Zhang, Y. Qiao, X. Jiang, X. Liu, C. Ding, Antibacterial activity, and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO<sub>2</sub> coatings on titanium, Acta Biomaterialia 8 (2012) 904–915
- [31] Zhen Geng, Zhenduo Cui, Zhaoyang Li, Shengli Zhu, Yanqin Liang, Yunde Liu, Xue Li, Xin He, Xiaoxu Yu, Renfeng Wang, Xianjin Yang, Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating, Materials Science and Engineering C 58 (2016) 467–477
- [32] Andrea Ewald, Daniel Hösel, Sarika Patel, Liam M. Grover, Jake E. Barralet, Uwe Gbureck, Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity, Acta Biomaterialia 7 (2011) 4064–4070
- [33] Jinhua Li, Xuanyong Liu, Yuqin Qiao, Hongqin Zhu, Chuanxian Ding, Antimicrobial activity and cytocompatibility of Ag plasma-modified hierarchical TiO<sub>2</sub> film on titanium surface, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 113 (2014) 134–145
- [34] Chao-Ming Xie, Xiong Lu, Ke-Feng Wang, Fan-Zhi Meng, Ou Jiang, Hong-Ping Zhang, Wei Zhi, and Li-Ming Fang, Silver Nanoparticles and Growth Factors Incorporated Hydroxyapatite Coatings on Metallic Implant Surfaces for Enhancement of Osteo-inductivity and Antibacterial Properties, Applied materials & Interfaces
- [35] Buddy D. Ratner, 'The Biocompatibility of Implant Materials', Host Response to Biomaterials, the Impact of Host Response on Biomaterial Selection 2015, Pages 37–51.
- [36] Chao Shi, Jianyong Gao, Ming Wang, Jingke Fu, Dalin Wang, Yingchun Zhu, Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity, Materials Science and Engineering C 55 (2015) 497–505
- [37] D.M. Vrăceanu, **T. Tran**, E. Ungureanu, V. Negoiescu, M. Tarcolea, M. Dinu, A. Vladescu, C.M. Cotrut, Pulsed electrochemical deposition of Ag doped hydroxyapatite bio-active coatings on Ti6Al4V for medical purposes, Scientific Bulletin U.P.B 2018, Series B - Chemistry and Materials Science, Vol. 80, Iss.1, pp. 173 – 184
- [38] **Tran Thi Thanh**, Cosmin Mihai COTRUT, Maria Diana VRANCEANU, Elena UNGUREANU, Mihai TARCOLEA, Studies of micro-structure and composition of the modified HAp coating via SEM investigations, Scientific Bulletin U.P.B 2020, Series B - Chemistry and Materials Science, Vol. 82, Iss.1, pp. 145 – 154
- [39] **Thi Thanh TRAN**, Norica Beatrice NICHITA, Mihaela-Olivia DOBRICA, Cosmin Mihai COTRUT, Maria Diana VRANCEANU, Mihai TARCOLEA, In vitro biocompatibility investigation of silver and zinc modified hydroxyapatite deposited on implant materials, Scientific Bulletin U.P.B 2020, Series B - Chemistry and Materials Science, Vol. 82, Iss.3, pp. 231 – 248