



UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE  
ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE  
POLITEHNICA BUCUREȘTI



Școala Doctorală de Inginerie Chimică și Biotehnologii

Decizie nr. \_\_\_\_ din.....

# TEZĂ DE DOCTORAT

## REZUMAT

*Modificarea suprafețelor implantabile de titan cu structuri bioinspirate*  
*Titanium implant surfaces modification with bioinspired structures*

**Autor:** Ing. Angela Gabriela OLARU (căs. PĂUN)

**Conducător de doctorat:** Prof.Dr. Ing. Cristian Pîrvu

### COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof. Dr. Ing. Ileana RĂU	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București
Conducător de doctorat	Prof. Dr. Ing. Cristian PÎRVU	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București
Referent	Prof. Dr. Cristina PÎRVU	de la	Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București
Referent	Conf. Dr. Elena VULPAȘU	de la	Universitatea Tehnică de Construcții București
Referent	Conf. Dr. Simona POPESCU	de la	Universitatea Națională de Știință și Tehnologie Politehnica București

## CUPRINS

<b>PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU</b>	<b><u>1</u></b>
<b>INTRODUCERE</b>	<b><u>1</u></b>
<b>CAPITOLUL I.</b>	<b><u>8</u></b>
<b>BIOMATERIALE METALICE UTILIZATE ÎN IMPLANTOLOGIA ORALĂ</b>	<b><u>8</u></b>
I.1. Noțiuni generale	<u>8</u>
I.2. Utilizarea titanului în aplicații dentare	<u>12</u>
I.3. Riscul infecției în implantologia orală	<u>13</u>
I.3.1. Generalități	<u>13</u>
I.3.2. Compuși antibacterieni pentru prevenirea infecției	<u>15</u>
<b>CAPITOLUL II.</b>	<b><u>18</u></b>
<b>METODE DE MODIFICARE A SUPRAFEȚEI BIOMATERIALELOR METALICE</b>	<b><u>18</u></b>
II.1. Tipuri de modificare a suprafeței	<u>18</u>
II.2. Metode de modificare a suprafeței biomaterialelor metalice din titan și aliaje de titan prin nanostructurare	<u>20</u>
II.2.1. Metoda electrofilării	<u>20</u>
II.2.2. Metoda oxidării anodice	<u>21</u>
II.3. Biopolimeri naturali utilizați pentru modificarea suprafețelor de titan	<u>26</u>
II.3.1. Fibroina din mătase	<u>26</u>
II.3.2. Dopamina	<u>27</u>
<b>CAPITOLUL III.</b>	<b><u>30</u></b>
<b>METODE DE CARACTERIZARE A BIOMATERIALELOR</b>	<b><u>30</u></b>
III.1. Analize structurale și de compoziție	<u>30</u>
III.2. Metode electrochimice de investigare	<u>36</u>
<b>OBIECTIVUL GENERAL AL TEZEI</b>	<b><u>41</u></b>
<b>PARTEA II. CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>	<b><u>45</u></b>
<b>CAPITOLUL IV.</b>	<b><u>45</u></b>
<b>MATERIALE ȘI METODE UTILIZATE</b>	<b><u>45</u></b>
IV.1. Materiale utilizate	<u>45</u>
IV.2. Metode de modificare utilizate	<u>46</u>
IV.2.1. Depunerea electrochimică a nanostructurilor de TiO <sub>2</sub> pe suprafața titanului	<u>46</u>

IV.2.2. Extracția fibroinei de mătase (SF)	<u>50</u>
IV.2.3. Depunerea SF pe suprafața titanului	<u>51</u>
IV.2.4 Depunerea dopaminei pe suprafața de titan prin autopolimerizare	<u>53</u>
IV.2.5. Funcționalizarea soluției SF cu nanoparticule de oxid de zinc (SF-nZnO)	<u>54</u>
IV.2.6. Depunerea nZnO pe suprafața titanului	<u>54</u>
IV.2.7. Depunerea amoxicilinei pe suprafața titanului	<u>55</u>
IV.3. Metode de caracterizare utilizate	<u>55</u>
<b>CAPITOLUL V.</b>	<u>57</u>
<b>MODIFICAREA SUPRAFETEI MATERIALELOR IMPLANTABILE CU FIBROINĂ DIN MĂTASE ȘI POLIDOPAMINĂ PENTRU ÎNCAPSULAREA AMOXICILINEI</b>	<u>57</u>
V.1. Introducere	<u>57</u>
V.2. Metode utilizate	<u>57</u>
V.3. Caracterizarea suprafețelor	<u>57</u>
V.3.1. Analiza morfologiei suprafeței Ti modificată cu PD, SF și Amx	<u>57</u>
V.3.2. Analiza topografiei și umectabilității suprafeței Ti modificată cu PD, SF și Amx	<u>58</u>
V.3.3. Microduritatea Vickers pentru suprafața Ti modificată cu PD, SF și Amx	<u>60</u>
V.3.4. Analiza FT-IR pentru suprafața Ti modificată cu PD, SF și Amx	<u>61</u>
V.3.5. Caracterizare electrochimică a suprafeței Ti modificată cu PD, SF și Amx	<u>65</u>
V.3.6. Studii de eliberare pentru suprafața Ti modificată cu PD, SF și Amx	<u>71</u>
V.3.7. Activitatea antibacteriană in vitro a suprafețelor modificate	<u>74</u>
V.4. Concluzii	<u>77</u>
<b>CAPITOLUL VI.</b>	<u>79</u>
<b>MODIFICAREA SUPRAFETELOR IMPLANTABILE DE TITAN CU NANOSTRUCTURI DE TiO<sub>2</sub> PENTRU ELIBERAREA AMOXICILINEI</b>	<u>79</u>
VI.1. Introducere	<u>79</u>
VI.2. Metode utilizate	<u>79</u>
VI.3. Caracterizarea suprafețelor	<u>79</u>
VI.3.1. Analiza morfologiei suprafeței Ti modificată cu TNT, TNT <sub>r</sub> și Amx	<u>79</u>
VI.3.2. Analiza FT-IR pentru suprafața Ti modificată cu TNT, TNT <sub>r</sub> și Amx	<u>81</u>
VI.3.3. Analiza umectabilității suprafeței Ti modificată cu TNT, TNT <sub>r</sub> și Amx	<u>81</u>
VI.3.4. Caracterizare electrochimică a suprafeței Ti modificată cu TNT, TNT <sub>r</sub> și Amx	<u>82</u>
VI.3.5. Studii de eliberare pentru suprafața Ti modificată cu TNT, TNT <sub>r</sub> și Amx	<u>86</u>
VI.3.6. Activitatea antibacteriană a suprafețelor modificate	<u>89</u>

VI.4. Concluzii	90
<b>CAPITOLUL VII.</b>	<b>93</b>
<b>MODIFICAREA SUPRAFEȚELOR IMPLANTURILOR DE TI CU NANOTUBURI DE <math>TiO_2</math>/ FIBROINĂ DIN MĂTASE /NZNO PENTRU UN EFECT ANTIMICROBIAN ÎMBUNĂTĂȚIT</b>	<b>93</b>
VII.1. Introducere	93
VII.2. Metode utilizate	93
VII.3. Caracterizarea suprafețelor	94
VII.3.1. Analiza morfologiei și compoziției suprafețelor Ti modificate cu TNT, SF, PD și nZnO	94
VII.3.2. Analiza umectabilității și topografiei suprafeței Ti modificată cu TNT, SF, PD și nZnO	96
VII.3.3. Analiza FT-IR pentru suprafața Ti modificată cu TNT, SF, PD și nZnO	98
VII.3.4. Caracterizare electrochimică a suprafeței Ti modificată cu TNT, SF, PD și nZnO	99
VII.3.5. Activitate antibacteriană in vitro a suprafețelor modificate	106
VII.4. CONCLUZII	110
<b>CAPITOLUL VIII.</b>	<b>113</b>
<b>ACOPERIREA HIBRIDĂ A SUPRAFEȚEI TITANULUI CU NANOTUBURI <math>TiO_2</math> REDUSE/ FIBROINĂ DIN MĂTASE/ NZNO PENTRU UN EFECT ANTIBACTERIAN ÎMBUNĂTĂȚIT</b>	<b>113</b>
VIII.1. Introducere	113
VIII.2. Metode utilizate	113
VIII.3. Caracterizarea suprafețelor	113
VIII.3.1. Electrodepunerea SF și SF-nZnO	113
VIII.3.2. Analiza morfologiei și compoziției suprafețelor Ti modificate cu TNT, TNTr, SF și nZn	118
VIII.3.3. Analiza FT-IR pentru suprafața Ti modificată cu TNT, TNTr, SF și nZnO	117
VIII.3.4. Analiza umectabilității și topografiei suprafeței Ti modificată cu TNT, TNTr, SF și nZn	118
VIII.3.5. Caracterizare electrochimică a suprafeței Ti modificată cu TNT, TNTr, SF și nZnO	120
VIII.3.6. Activitate antibacteriană in vitro a suprafețelor modificate	124
VIII.4. Concluzii	129
<b>CAPITOLUL IX.</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE</b>	<b>131</b>
IX.1. Concluzii generale	131
IX.2. Perspective	133
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	<b>134</b>

## **INTRODUCERE**

Una dintre cele mai grave probleme în îngrijirea sănătății umane la nivel mondial este repararea defectelor osoase [1-3]. Acestea sunt cauzate de îmbătrânire, accidente, leziuni sportive, fracturi, tumori osoase, traumatisme externe, deformare osoasă, boli neoplazice, osteoporoză și infecție osoasă [2-12]. În ciuda capacității remarcabile de auto-vindecare a osului, vindecarea defectelor osoase rămâne o provocare, mai ales în absența intervenției medicale. Din punct de vedere clinic, tratamentul de aur pentru a rezolva astfel de defecte osoase la scară mare constă în umplerea defectului cu o grefă osoasă autologă sau alogenă pentru a restabili structura și funcția acestuia [6]. În prezent, grefa osoasă autologă are multe probleme, cum ar fi numărul limitat de grefe osoase, traumatisme secundare la pacienți și morbiditatea la locul donatorului. În plus, osul alogen posedă o serie de limitări, cum ar fi activitatea biologică redusă, respingerea imună și transmiterea agenților patogeni, care afectează formarea osului și determină resorbția osoasă [4, 6, 9, 13]. Prin urmare, a fost dezvoltată ingineria tisulară, care este definită ca „un domeniu interdisciplinar care aplică principiile ingineriei și științelor vieții pentru dezvoltarea de înlocuitori biologici care restabilesc, mențin sau îmbunătățesc funcția țesuturilor” [14, 15]. Scopul acesteia este de a combina materiale ingineresti, interacțiunea lor cu celulele și factori biochimici și fizico-chimici adecvați pentru a promova repararea, înlocuirea sau regenerarea osoasă [5, 14, 16-19]. Biomaterialele sunt factori critici pentru strategiile ingineriei țesutului osos și formează scheletul pentru regenerarea țesuturilor [18]. Disponibilitatea biomaterialelor adecvate pentru suportul cadrului este condiția cheie pentru construirea cu succes a oricărei grefe biologice sau a țesuturilor/organelor modificate. Biocompatibilitatea, rezistența mecanică a țesutului, eliberarea sau inter-comunicarea elementelor sau semnalelor indispensabile și răspunsul imun advers sunt provocările majore în implementarea cu succes a grefei reproduse ca implant în scopuri medicale [17].

Domeniul biomaterialelor prezintă o evoluție extraordinară în ceea ce privește obținerea de microstructuri și nanostructuri, cu perspective nelimitate în cercetare și în aplicații biomedicale. Biomaterialele sunt folosite tot mai des datorită contactului direct cu materia vie, fapt care determină necesitatea cunoașterii comportării organismelor față de acestea. Răspunsul organismelor se manifestă fie prin respingere, fie prin acceptarea parțială. Pentru a îmbunătăți starea de sănătate a organismelor umane, se utilizează numeroase materiale compozite și diferite modificări de suprafață care determină obținerea unor proprietăți superioare [20].

Materialele metalice au fost utilizate pe scară largă în aplicații biomedicale cu sprijinul intern al organismului și înlocuirea țesutului biologic [21, 22]. Dezvoltarea de implanturi metalice a fost determinată în primul rând de cererile nenumărate pentru refacerea osului, de obicei fixarea fracturii interne a oaselor lungi [20]. Astăzi, astfel de implanturi medicale își pot găsi aplicații în ortopedie, stenturi cardiovasculare, stimulatori cardiace, defibrilatoare, proteze neuronale, stomatologie sau sisteme de administrare a medicamentelor care pot permite funcționarea normală a mai multor părți ale corpului uman [23, 24]. Cu toate acestea, ca orice altă intervenție chirurgicală, implantarea unui dispozitiv medical în corpul unui pacient vine cu propriul set de riscuri și complicații. Colonizarea bacteriană poate apărea pe fiecare dispozitiv medical implantat, afectată de o interacțiune complexă între microorganisme, suprafața implantului și mecanismele de apărare ale gazdei. În prezența unui dispozitiv medical implantat, cum ar fi o proteză ortopedică, un dispozitiv cardiac electronic, o valvă cardiacă artificială sau un cateter permanent, riscul de infecție este semnificativ crescut [25, 26]. Aceste infecții prezintă un risc major pentru sănătatea pacienților și buna funcționare a dispozitivelor medicale. Atașarea, colonizarea și proliferarea bacteriilor la suprafața dispozitivelor medicale sunt considerate o cauză fundamentală. Simpla aderență a bacteriilor planctonice la suprafața dispozitivului implantat are ca rezultat formarea biofilmelor și a celulelor bacteriene care produc o matrice polizaharidică extracelulară. Această matrice le protejează de sistemul imunitar al organismului gazdă și devine extrem de rezistentă la antibiotice și antiinflamatoare [27].

Astfel, pentru obținerea unui biomaterial, este nevoie de o abordare interdisciplinară. Trebuie avute în vedere tipurile de biomateriale utilizate, tipurile de modificări ce pot fi aduse acestora, dar și tipul de aplicație biomedicală. Crearea de dispozitive biomedicale cu suprafețe modificate cu ajutorul unor antibiotice sau a unor materiale antibacteriene, poate preveni apariția infecțiilor sau a inflamațiilor la suprafața dispozitivelor. Aceste dispozitive cu suprafețe modificate sunt capabile să livreze substanțe biomedicale, a căror funcție principală este aceea de a preveni, trata și reduce inflamațiile și infecțiile [27].

**Cuvinte cheie:** *Fibroină din mătase, Polidopamină, Nanotuburi de TiO<sub>2</sub> reduse și nereduse, Amoxicilină, nanoparticule de ZnO.*

**Obiectivul general al tezei:** În această lucrare, se propune îmbunătățirea proprietăților de suprafață a biomaterialilor metalice pe bază de titan atât prin modificarea morfologiei și topografiei suprafeței cu nanostructuri de TiO<sub>2</sub> și polimeri bioinșpirați, cât și prin înglobarea unor materiale cu efect antibacterian (amoxicilină sau nanoparticule de ZnO). Toți factorii care influențează interacția dintre suprafețele modificate și microorganismele testate, precum chimia suprafeței, umectabilitatea și energia de suprafață, sarcina de suprafață, au fost investigați și corelați cu efectul antibacterian al suprafeței.

Obiectivele acestei teze sunt:

- Modificarea suprafeței titanului cu compuși antibacterieni (amoxicilină), folosind polimeri bioadezivi inșpirați din natură (dopamină și fibroină de mătase) și testarea capacității straturilor de fibroină din mătase și polidopamină de a îngloba și elibera amoxicilină, precum și testarea efectului antibacterian al suprafețelor modificate;
- Modificarea morfologiei suprafețelor implantabile de titan prin obținerea nanotuburilor de TiO<sub>2</sub> nereduse și reduse, în electroliți organici ce conțin un compus vâscos (EG), apă distilată/oxigenată și fluorură de amoniu (NH<sub>4</sub>F); Optimizarea nanotuburilor de TiO<sub>2</sub> reduse pentru a obține o morfologie uniformă și o conductivitate crescută; Modificarea nanotuburilor de TiO<sub>2</sub> nereduse și reduse cu amoxicilină pentru îmbunătățirea activității antibacteriene;
- Modificarea suprafețelor implantabile de titan prin nanostructurare (TNT) și înglobarea nanoparticulelor de oxid de zinc prin diferite metode de acoperire, utilizând fibre de fibroină din mătase obținute prin procesul de electrofilare;
- Modificarea suprafețelor de titan acoperite cu nanotuburi de TiO<sub>2</sub> nereduse și reduse prin electrodepunerea fibroinei din mătase funcționalizată cu nanoparticule de oxid de zinc;
- Testarea suprafețelor modificate de titan din punct de vedere al morfologiei, topografiei, umectabilității, stabilității electrochimice și activității antibacteriene;

Lucrarea este structurată în două părți: Partea I. Stadiul actual al cunoașterii în domeniu și Partea II. Contribuții originale.

Partea I este atribuită studiului din literatura de specialitate și cuprinde 3 capitole în care sunt punctate cele mai recente date din domeniul abordat.

1. În capitolul 1 sunt prezentate date din literatură referitoare la necesitatea utilizării implanturilor dentare, proprietățile și caracteristicile titanului și aliajelor sale, precum și compușii antibacterieni utilizați pentru prevenția infecției.
2. În capitolul 2 sunt prezentate metodele de modificare a biomaterialilor metalice în vederea obținerii unor suprafețe cu caracteristici îmbunătățite.
3. În capitolul 3 sunt prezentate metodele de investigare utilizate la caracterizarea suprafețelor obținute.

Partea a II-a este alocată rezultatelor experimentale originale în cadrul a 5 capitole, iar în capitolul 9 sunt prezentate concluziile generale ale tezei.

4. În capitolul 4 sunt descrise atât materiale utilizate pentru partea experimentală, cât și metodele folosite pentru obținerea suprafețelor modificate de titan.

5. În capitolul 5 sunt prezentate rezultate obținute în urma modificării suprafeței de titan cu polimeri bioadezivi precum polidopamina și fibroina din mătase în vederea legării amoxicilinei. Aceste structuri au fost caracterizate din punct de vedere morfologic, topografic, stabilității electrochimice, al eficienței legării amoxicilinei și activității antibacteriene împotriva a trei microorganisme (*Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* și *Limosilactobacillus fermentum*).
6. Capitolul 6 este destinat modificării morfologiei suprafețelor implantabile de titan prin obținerea nanotuburilor de  $TiO_2$  nereduse și reduse și optimizarea acestora pentru a obține o morfologie uniformă și o conductivitate crescută. Aceste structuri sunt funcționalizate cu amoxicilină în vederea îmbunătățirii activității antibacteriene. Aceste suprafețe au fost testate din punct de vedere morfologic, al umectabilității, stabilității electrochimice și eliberării în timp al agentului terapeutic, precum și efectului antibacterian împotriva *Escherichia coli*.
7. În capitolul 7 sunt prezentate rezultatele obținute în urma modificării suprafețelor implantabile de titan prin nanostructurare (TNT) și înglobarea nanoparticulelor de oxid de zinc. Un aspect important de originalitate pentru această lucrare constă în abordarea și optimizarea diferitelor metode de acoperire a procesului de funcționalizare cu  $nZnO$ , ca agent antibacterian. Acest lucru a fost realizat folosind trei metode de acoperire hibridă, iar proprietățile rezultate au fost evaluate comparativ din punct de vedere al morfologiei, topografiei, umectabilității, stabilității chimice și efectului antibacterian împotriva a două microorganisme (*Staphylococcus aureus* și *Enterococcus faecalis*).
8. Capitolul 8 este destinat modificării suprafeței titanului acoperită cu nanotuburi de  $TiO_2$  nereduse și reduse prin electrodepunerea fibroinei din mătase funcționalizată cu nanoparticule de oxid de zinc, contribuind astfel la obținerea de noi suprafețe cu efect antibacterian crescut. Un aspect important de originalitate pentru această lucrare constă în abordarea depunerii electrochimice a fibroinei, un aspect puțin întâlnit în literatura de specialitate. Un alt element de originalitate este obținerea nanotuburilor reduse de  $TiO_2$  prin metoda electrochimică, precum și testarea efectului antimicrobian. Aceste suprafețe au fost caracterizate morfologic, topografic, electrochimic și efectului antibacterian împotriva a două microorganisme (*Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*).

Această teză de doctorat se finalizează cu Capitolul 9, "Concluzii și perspective", în cadrul căruia sunt sintetizate principalele rezultate originale discutate pe parcursul capitolelor din partea a doua a tezei, și perspectivele de cercetare ulterioară.

În anexă este prezentată diseminarea rezultatelor originale în cadrul unor conferințe internaționale și sunt menționate articolele publicate în Buletinul Științific al U.P.B. și cele acceptate la reviste ISI.

## CAPITOLUL IV. MATERIALE ȘI METODDE UTILIZATE

### IV.1. MATERIALE UTILIZATE

În acest subcapitol s-au prezentat toate materialele utilizate pentru partea experimentală.

### IV.2. METODE UTILIZATE

#### IV.2.1. Depunerea electrochimică a nanostructurilor de $TiO_2$ pe suprafața titanului

##### IV.2.1.1. Obținerea nanotuburilor de $TiO_2$ (TNT)

##### Depunerea TNT

Procesul de anodizare a fost efectuat în celula electrochimică cu doi electrozi: Ti ca anod și electrodul de Pt, catod. Folosind o sursă MATRIX MPS-7163, tensiunea a fost crescută de la 0 la 40V sau 80V, cu o viteză de 2V/10 secunde și apoi menținută constanta la temperatura camerei. Probele au fost denumite **TNT-40V** și **TNT-80V**. Compoziția soluției a fost aleasă pe baza studiilor anterioare din grupul nostru [1, 2]. După anodizare, probele au fost spălate și caldate la 450°C timp de 2 ore.

#### IV.2.1.2. Obținerea nanotuburilor de TiO<sub>2</sub> reduse (TNTr)

##### a. Depunerea TNTr

Ulterior, probele anodizate și caldate au fost supuse unui proces de reducere electrochimică. Probele au fost denumite **TNTr2** și **TNTr4**.

##### b. Optimizarea TNTr

Comparând morfologia, conductivitatea suprafeței și energia band gap, TNT-40V, TNT-80V și probele TNTr2, TNTr4 reduse corespunzătoare au fost selectate pentru a fi funcționalizate în continuare cu diferiți agenți antibacterieni.

#### IV.2.2. Extracția fibroinei de mătase (SF)

Procedura de extracție a fibroinei a fost efectuată conform protocolului prezentat în literatură [3, 4]. Pe scurt, coconii de *B. mori* au fost tăiați și fierți în carbonat de sodiu 0,02 M timp de 30 de minute și clătiți cu apă distilată de 3 ori timp de 20 minute. După uscare, SF a fost dizolvată în 9,3M LiBr la 60°C, timp de 4h. Apoi, soluția a fost dializată în apă ultrapură folosind o membrană de dializă din celuloză timp de 48h. Soluțiile de fibroină de mătase rezultate a fost depozitate la 4°C, având o concentrație între 6% și 7,5%.

#### IV.2.3. Depunerea SF pe suprafața titanului

##### IV.2.3.1. Depunerea SF pe suprafețele Ti, TNT sau TNTr prin metoda electrochimică

Pentru procesul de electrodepunere a fost utilizată o soluție apoasă de SF 3%. Fibroina a fost depusă prin metoda crono-amprometrică, într-o celulă electrochimică cu 2 electrozi, pe trei substraturi (Ti, TNT-40V și TNTr2). A fost aplicată o tensiune de 10 V timp de 10 minute. După electrodepunere, probele au fost imersate într-o soluție de metanol 90% timp de 15 minute, pentru a obține straturi de fibroină de mătase insolubile în apă. Apoi, probele au fost clătite cu apă distilată. Ulterior, probele au fost depozitate în congelator peste noapte, generând un film poros. Probele au fost denumite **Ti/SFech**, **TNT/SFech** și **TNTr/SFech**.

##### IV.2.3.2. Depunerea SF pe suprafețele TNT prin metoda electrofilării

##### a. Depunerea SF

Inițial s-a obținut o soluție SF/PEO prin combinarea unui raport volumic 4:1 soluție apoasă de SF de 6,45 % cu 5,0 % oxid de polietilenă (PEO).

##### Optimizarea SF

Fibrele de mătase au fost depuse prin metoda electrofilării utilizând ca parametri experimentali: **15kV, 15 cm, 0.75mL/h, 10 minute**. Astfel utilizând acești parametri au fost depuse fibre pe suprafețele nanostructurate. Acestea au fost denumite **TNT/SFef**.

#### IV.2.4 Depunerea dopaminei pe suprafața de titan prin autopolimere

Inițial s-a preparat Tampon TRIS (pH 8,5), amestecând soluția bazică de Trizma® 0,2M cu soluție de HCl 0,2M și apă distilată.



#### IV.2.4.1. Depunerea dopaminei pe suprafața titanului

Într-un recipient steril, probele de Ti au fost imersate în 10 mL soluție de polidopamină (9,45 g dopamină/L tampon TRIS pH 8,5), timp de 24h, la temperatura camerei. Probele au fost clătite cu apă distilată. Substratul de Ti modificat rezultat a fost denumit **Ti/PD**.

#### IV.2.4.2. Depunerea dopaminei pe suprafața TNT

Într-un recipient steril, probele TNT/SFef au fost imersate în 10 mL soluție de polidopamină (2 g dopamină/L tampon TRIS pH 8,5), timp de 8 ore la întuneric la temperatura camerei sub agitare constantă. Probele au fost spălate cu apă distilată. Acestea au fost denumite **TNT/SFef/PD**.

### IV.2.5. Funcționalizarea soluției SF cu nanoparticule de oxid de zinc (SF-nZnO)

Inițial a fost obținută o soluție ce conține nanoparticule de ZnO (0,02% procente masice), surfactantul Triton X (0,01% v) și apă distilată.

Această soluție a fost adăugată într-o concentrație de 0,125% vol în soluția apoasă de SF sau SF/PEO cu o concentrație 3%, fiind denumită **SFech-nZnO** sau **SFef-nZnO**.

### IV.2.6. Depunerea nZnO pe suprafața titanului

#### IV.2.6.1. Depunerea nZnO prin spin coating

Din soluția de nZnO preparată anterior s-au extras 100  $\mu$ L. Pentru a depune această soluție pe suprafața TNT-40V sau TNT/SFef/PD s-a utilizat metoda spin coating. Substraturile TNT-40V sau TNT/SFef/PD au fost fixate pe un dispozitiv de acoperire prin rotație. Parametri utilizați: 3000 rpm, 30 sec. După aceea, probele au fost calcinate timp de 10 minute la 180°C. Probele au fost denumite **TNT/nZnO** sau **TNT/SFef/PD/nZnO**.

Fibrele de fibroină de mătase au fost depuse pe probe TNT/nZnO în aceleași condiții (descrise la punctul IV.2.2.3) prin metoda de electrofilare. Probele au fost denumite **TNT/nZnO/SFef**.

#### IV.2.6.2. Depunerea SF-nZnO prin metoda electrochimică

Soluția obținută anterior de SF-ZnO a fost depusă electrochimic pe substraturile de TNT\_40V și TNTr2 aplicând 10 V timp de 10 minute cu un potențostat-galvanostat Autolab 302 N (procedură descrisă la punctul VII.4.1.). Au fost denumite **TNT/SFech-nZnO** sau **TNTr/SFech-ZnO**.

#### IV.2.6.3. Depunerea SF-nZnO prin metoda electrofilării

Soluția de nanoparticule de ZnO a fost adăugată într-o concentrație finală de 0,125 % vol. pentru ZnO în soluție de fibroină de mătase/PEO. Fibrele au fost depuse din acest amestec prin electrofilare, în condițiile descrise la punctul VII.3.2. Probele rezultate au fost denumite **TNT/SFef-nZnO**.

### IV.2.7. Depunerea amoxicilinei pe suprafața titanului

#### IV.2.7.1. Depunerea amoxicilinei de suprafața Ti prin intermediul polidopaminei sau fibroinei

Probele de Ti, Ti/PD și Ti/SFech au fost imersate în soluție apoasă de amoxicilină 3 g/L (pH 5,5), timp de 24h, la temperatura camerei. Probele încărcate cu amoxicilină au fost denumite **Ti/Amx**, **Ti/PD/Amx** și **Ti/SFech/Amx**.

#### IV.2.7.2. Înglobarea amoxicilinei în nanostructurile TNT sau TNTr

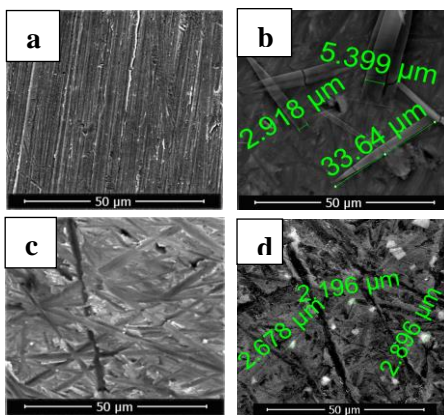
Probele de Ti, TNT-40V, TNT-80V, TNTr2, TNTr4 au fost imersate în 10 mL de soluție apoasă de amoxicilină (3 g/L) timp de 48h, la temperatura camerei. Probele încărcate cu amoxicilină au fost denumite **Ti/Amx**, **TNT-40V/Amx**, **TNT-80V/Amx**, **TNTr-40V/Amx** și **TNTr-80V/Amx**.

## CAPITOLUL V. MODIFICAREA SUPRAFETEI IMPLANTABILE CU FIBROINĂ DE MĂTASE ȘI POLIDOPAMINĂ PENTRU ÎNCAPSULAREA AMOXICILINEI

Această lucrare prezintă o abordare a interacțiunii dintre Amx, PD, SF și suprafața titanului, precum și testarea capacității straturilor de fibroină de mătase și polidopamină de a încărca și elibera amoxicilină pentru suprafața implantului dentar din titan. Cei doi biopolimeri au fost depuși cu ușurință pe suprafața de Ti prin autopolimerezare (PD) și prin electrodepunere (SF), două tehnici foarte simple care nu implică reactivi scumpi sau echipamente complexe.

### V.3. CARACTERIZAREA SUPRAFETELOR

#### V.3.1. Analiza morfologiei suprafeței



**Fig. 5.1.** Imagini SEM corespunzătoare probelor de Ti acoperite: a) Ti/PD; b) Ti/PD/Amx; c) Ti/SFech; d) Ti/SFech/Amx.

Fig. 5.1 prezintă imaginile SEM pentru probe de Ti cu suprafețe modificate. În Fig. 5.1a, se poate observa că PD s-a depus ca o peliculă subțire și uniformă pe suprafața de titan, având în vedere că încă se văd zgârieturile rămase după etapa de polisare. În Fig. 5.1b, sunt vizibile cristalele de Amx, bine ancorate pe suprafața de titan prin intermediul filmului de PD. Aceste cristale au o formă tubulară/aciculară de diferite dimensiuni, 2-5  $\mu\text{m}$  în diametru și aproximativ câteva zeci de micrometri în lungime.

În Fig. 5.1c, se poate observa prezența unui strat uniform de SF electrodepus pe substratul de Ti. Acesta este mai gros în comparație cu filmul PD, transparent. În Fig. 5.1d, Amx a fost depusă sub formă de aglomerate de 1 – 5  $\mu\text{m}$  pe suprafața SF, creând forme diferite, în comparație cu cele încărcate pe stratul PD.


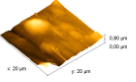
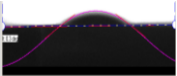
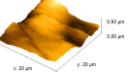

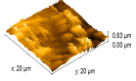
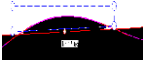
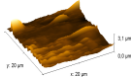
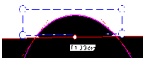
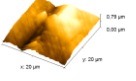
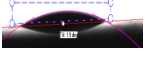
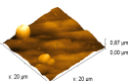
#### V.3.2. Analiza topografiei și umectabilității suprafeței

Imaginile reprezentative ale picăturilor de apă sunt prezentate în Tabelul 5.1. Unghiul de contact pentru proba Ti/PD ( $55^\circ$ ) este mai mic comparativ cu substratul de Ti ( $75^\circ$ ), fiind în bună concordanță cu rezultatul obținut în alte studii [5, 6]. Unghiul de contact pentru proba Ti/SFech este apropiat de cel înregistrat pentru proba Ti/PD, fiind hidrofil așa cum s-a observat deja în studiul nostru anterior [7]. După ce Amx a fost greafată în cele două filme (PD și SF), chimia suprafeței a fost modificată și valoarea unghiului de contact a scăzut constant la valori între  $10^\circ$  și  $20^\circ$ . Rezultate similare au fost observate și în cazul altor antibiotice (cefotaxima sodică) depuse prin intermediul polidopaminei pe suprafața Ti [5]. Nu există o diferență semnificativă de umectare între Ti/SFech/Amx și Ti/PD/Amx, ambele având un puternic caracter hidrofil, ceea ce ar putea fi benefic pentru o mai bună aderență și proliferare a celulelor pe suprafața materialelor implantabile [8].

Ti/PD/Amx are o rugozitate crescută în comparație cu suprafața Ti/SFech/Amx. Diferența dintre morfologiile acestor două probe a fost observată și în imaginile SEM, Fig. 5.1b și 5.1d. Amx s-a depus sub forma unor cristale mari

pe filmul de polidopamină și ca particule mici, aglomerate pe filmul de fibroină de mătase. În comparație cu substratul Ti, rugozitatea crește după modificarea suprafeței pentru Ti/SFech în timp ce unghiul de contact scade. Acesta este în acord cu modelul Wenzel [9]. Pentru Ti/PD unghiul de contact este în scădere în comparație cu substratul, dar și rugozitatea este în scădere. Acest tip de comportament de umectare numit „mushroom” este o stare intermediară între modelul Cassie-Baxter și modelul Wenzel [9].

Tabelul 5.1. Unghiul de contact și valorile rugozității.

Probe	Imaginea picăturii de apă	Valorile unghiurilor de contact [grade]	Imaginile 3D AFM	Rms [nm]
Ti		75±0,15		116±0,59
Ti/Amx		28±0,38		231±0,7
Ti/PD		55±0,54		84±0,32
Ti/PD/Amx		16±0,91		239±1,95
Ti/SFech		59±0,91		165±0,29
Ti/SFech/Amx		19±0,99		110±1,82

### V.3.3. Microduritatea Vickers

Pentru materialele solide, duritatea este o caracteristică necesară materialului pentru a rezista la indentare sau zgâriere permanentă. Gradul de uzură-deteriorare este legat de rugozitatea suprafeței, care este o metodă de cuantificare a texturii/topografiei suprafețelor uzate [10]. Se observă că valorile pentru titanul neacoperit și modificat sunt aproape similare, sugerând că metodele utilizate pentru modificarea suprafeței titanului nu au o influență semnificativă asupra microdurității titanului. Proba Ti/SFech are cea mai mare abatere standard, sugerând o posibilă suprafață neomogenă.

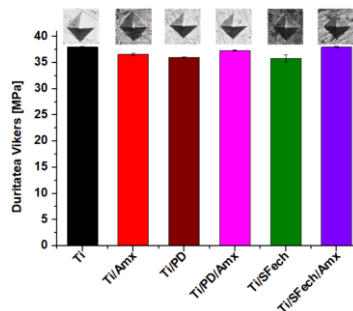


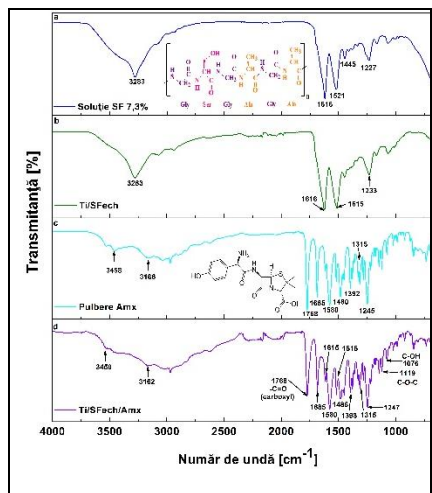
Fig. 5.2. Reprezentarea grafică a durității Vickers.

### V.3.4. Analiza FT-IR

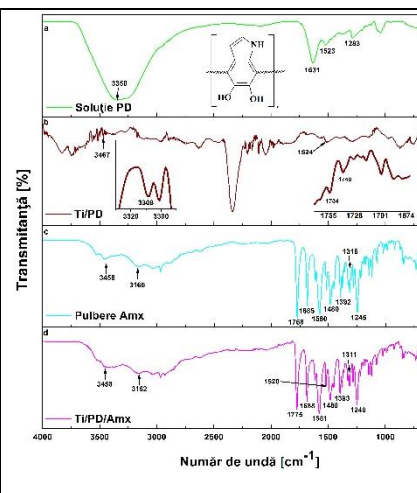
În studiul nostru, pentru soluția de fibroină de mătase obținută 7,3%, maximele la 1620, 1515 și 1227  $\text{cm}^{-1}$  au fost atribuite amidei I, II și III (Fig. 5.3a). Pentru proba Ti/SFech (Fig. 5.3b) se poate observa că are aproximativ aceleași număr de undă, ca dovadă că suprafața de titan a fost acoperită cu succes de fibroină. Tratamentul cu metanol, după depunere, transformă catenele aranjate aleator ale fibroinei, în conformații  $\beta$ -sheets, maximele caracteristice fiind prezente la 1620, 1515 și 1233  $\text{cm}^{-1}$  [11].

În Fig. 5.3c se pot vedea spectrele infraroșu ale pulberii de amoxicilină. Maximele sunt găsite la 3458, 3166, 1768, 1685, 1580, 1480, 1392, 1315 și 1245  $\text{cm}^{-1}$ [12]. Se poate observa că Ti/SFech/Amx și pulberea Amx (Fig. 5.3c și 5.3d) prezintă maximele similare subliniind faptul că amoxicilină a fost încorporată pe suprafața Ti/SFech.

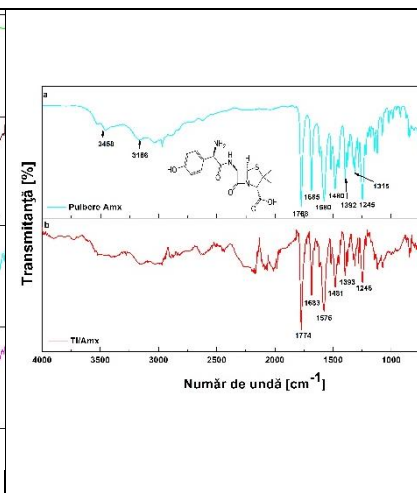
În Fig. 5.3b și 5.3d, au fost comparate spectrele corespunzătoare Ti/SFech și Ti/SFech/Amx. În spectrele probei Ti/SFech/Amx, maximele specifice fibroinei de mătase sunt atenuate, indicând faptul că amoxicilină a fost încorporată. Banda intensă de la 1770  $\text{cm}^{-1}$  atribuită vibrației de întindere  $\text{-C=O}$  (carboxil) a amoxicilinei [13] este prezentă și în cazul Ti/SFech/Amx. Picurile corespunzătoare vibrației de întindere  $\text{C-O-C}$  și  $\text{C-OH}$  au apărut la 1119 și 1076  $\text{cm}^{-1}$  [14] și sunt prezente și în cazul probei Ti/SFech/Amx, indicând o posibilă conjugare spontană a proteinei de mătase cu amoxicilină.



**Fig. 5.3.** Imagini FT-IR corespunzătoare probelor: a) soluție SF 7,3%; b) Ti/SF; c) pulbere Amx și d) Ti/SF/Amx.



**Fig. 5.4.** Imagini FT-IR corespunzătoare probelor: a) soluție PD; b) Ti/PD; c) pulbere Amx și d) Ti/PD/Amx.



**Fig. 5.5.** Imagini FT-IR corespunzătoare: a) pulbere Amx și b) Ti/Amx.

Spectrele de absorbție în infraroșu ale polidopaminei la 3350  $\text{cm}^{-1}$  corespund întinderilor  $\text{-OH}$  și  $\text{N-H}$ , Fig. 5.4a. În plus, maximele de la 1283  $\text{cm}^{-1}$  și 1631  $\text{cm}^{-1}$  sunt atribuite vibrației de întindere a legăturilor catecol hidroxil  $\text{C-O}$  și  $\text{C=O}$ . Maximul la 1523  $\text{cm}^{-1}$  este atribuit legăturilor  $\text{C=C}$  din structura indolă a PD [15, 16]. În spectrul specific al probei Ti/PD (Fig. 5.4b), maximele sunt alocate după cum urmează: maximul la 3308 și 3467  $\text{cm}^{-1}$  pentru vibrația  $\text{-OH}$ . Maximele la 1754  $\text{cm}^{-1}$  și 1740  $\text{cm}^{-1}$  sunt caracteristice pentru vibrația  $\text{-NH}$  și vibrația de întindere a grupării carbonil [6].

Spectrele corespunzătoare pulberii Amx, Fig. 5.4c, sunt de asemenea prezente în spectrele înregistrate pentru proba Ti/PD/Amx (Fig. 5.4d) care demonstrează prezența antibioticului.

Spectrele probelor Ti/PD (Fig 5.4b) și Ti/PD/Amx (Fig 5.4d) au fost comparate. Se poate observa că maximul de la 1523  $\text{cm}^{-1}$ , atribuit legăturilor  $\text{C=C}$  din structura indolică a PD, este prezent și în spectrul probei Ti/PD/Amx la 1520

$\text{cm}^{-1}$ . Banda la  $1775 \text{ cm}^{-1}$  este prezentă în cazul probei Ti/PD/Amx, fiind atribuită vibrației de întindere  $\text{-C=O}$  (carboxil) a Amx [13]. Interacțiunile posibile ale Amx cu polidopamina sunt interacțiunile  $\pi\text{-}\pi$  și legăturile de hidrogen, similare cu cele descrise pentru alte antibiotice [15, 17]. Interacțiunile  $\pi\text{-}\pi$  pot fi cu o parte aromatică a PD și legături de hidrogen între grupările amino ale amoxicilinei și grupările hidroxil ale PD.

Proba Ti/Amx (Fig. 5.5b) prezintă maxime similare la  $1774 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-C=O}$  carboxil),  $1683 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-C=O}$  amidă),  $1576 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-NH}$ ),  $1481 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=C}$  aromatic),  $1393 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-OH}$  încovoiere) și  $1246 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{-CO-}$ ) [44]. Spectrele pulberii Amx, Fig. 5.5a, prezintă maxime la aceleași numere de undă, astfel încât putem concluziona că amoxicilina este prezentă pe suprafața Ti.

### V.3.5. Caracterizare electrochimică

#### V.3.5.1. Analiza Tafel

Fig. 5.6 prezintă diagramele Tafel pentru probele obținute. Toate probele acoperite au curenți de coroziune mai mici și potențiale mai electropozitive decât substratul Ti, deci sunt mai puțin susceptibile la coroziune.

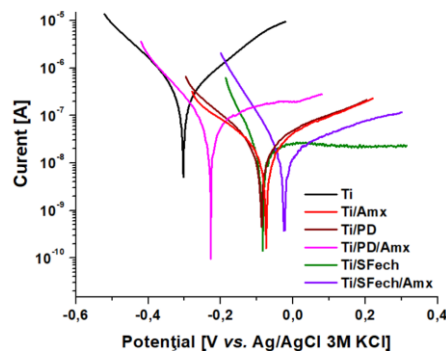


Fig. 5.6. Diagrama Tafel corespunzătoare probelor de Ti neacoperite și acoperite, înregistrate în salivă Fusayama.

Pantele Tafel corespunzătoare pentru substratul de Ti și electrozii modificați, obținuți la temperatura camerei, au fost calculate pe baza curbelor de polarizare folosind software-ul Nova. Rezultatele obținute au fost  $159 \text{ mV/dec}$ - Ti;  $192 \text{ mV/dec}$ - Ti/Amx;  $141 \text{ mV/dec}$ - Ti/PD;  $302 \text{ mV/dec}$ - Ti/PD/Amx;  $136 \text{ mV/dec}$ - Ti/SFech și  $159 \text{ mV/dec}$ - Ti/SFech/Amx. Pantele găsite pentru toți electrozii sunt mai mari de  $120 \text{ mV}$  pe decadă, sugerând că etapa Volmer ar putea fi determinantă vitezei [18]. Din curentul de coroziune, eficiența protecției a fost calculată folosind formula descrisă în literatură [19]. Am obținut următoarele rezultate  $82\%$ - Ti/Amx;  $86,4\%$ - Ti/PD;  $69,84\%$ - Ti/PD/Amx;  $96,88\%$ - Ti/SFech și  $94,32\%$ - Ti/SFech/Amx. Eficiența este mai mare de  $60\%$  pentru toate probele.

Tabelul 5.2. Principalii parametri de coroziune.

Probe	Potențial de coroziune [V]	Densitatea curentului de coroziune [ $\text{A}/\text{cm}^2$ ]	Viteză de coroziune [mm/an]
Ti	-0,30	$12,50 \cdot 10^{-7}$	$109,07 \cdot 10^{-4}$
Ti/Amx	-0,07	$2,25 \cdot 10^{-7}$	$19,32 \cdot 10^{-4}$
Ti/PD	-0,09	$1,70 \cdot 10^{-7}$	$14,8 \cdot 10^{-4}$
Ti/PD/Amx	-0,23	$3,77 \cdot 10^{-7}$	$32,65 \cdot 10^{-4}$
Ti/SFech	-0,08	$0,39 \cdot 10^{-7}$	$3,42 \cdot 10^{-4}$
Ti/SFech/Amx	-0,02	$0,71 \cdot 10^{-7}$	$6,19 \cdot 10^{-4}$

Din punct de vedere al coroziunii, proba Ti/SF este cea mai stabilă, având cea mai mică viteză de coroziune, fiind de aproximativ 32 de ori mai mică comparativ cu substratul neacoperit Ti. Ti/PD are o densitate a curentului de coroziune scăzută și o viteză de coroziune mai mică în comparație cu substratul Ti. Alte studii au raportat, de asemenea, o protecție sporită la coroziune în cazul acoperirilor cu fibroină de mătase [20] sau acoperirilor cu polidopamină [21].

Pentru Ti/Amx viteza de coroziune este mai mică decât în cazul probei de Ti, Amx comportându-se ca un strat protector pentru suprafața Ti. Dimpotrivă, prin încărcarea Amx pe substratul de Ti acoperit cu filmele de SF și PD, viteza de coroziune și densitățile curentului de coroziune au crescut. Acest lucru se poate datora interacțiunii dintre Amx și cei doi polimeri observați în analiza FTIR și, de asemenea, probabil din cauza diferențelor de morfologii ale filmelor. Viteza de coroziune cea mai mică a fost obținută pentru probele cu peliculă de fibroină, această peliculă acoperind întreaga suprafață și creând o barieră suplimentară care protejează substratul. Cu toate acestea, viteza de coroziune pentru probele modificate cu Amx este semnificativ mai mică în comparație cu titanul neacoperit.

### V.3.5.2. Spectroscopie electrochimică de impedanță

În Fig. 5.7 sunt prezentate diagramele Nyquist normalizate corespunzătoare probelor cu suprafețe modificate și titanului netratat, înregistrate la OCP. Toate probele acoperite, inclusiv cele cu Amx, au rezistență mai mare decât substratul Ti, fiind mai stabile.

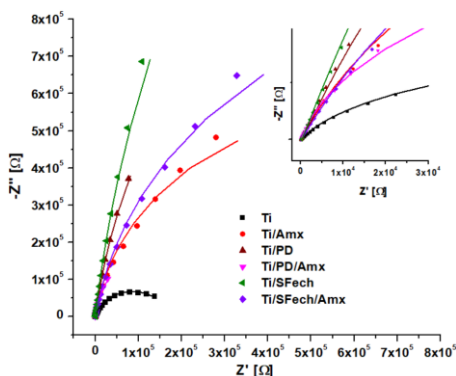


Fig. 5.7. Diagramele Nyquist pentru probele de Ti neacoperite și acoperite, înregistrate în salivă Fusayama

Tabelul 5.3 cuprinde datele obținute folosind software-ul Nova. Rezistența soluției este aproximativ aceeași pentru toate probele testate, în jur de  $100 \Omega$ , având în vedere similitudinea dintre electrolit și condițiile de testare. Se observă că după modificarea suprafețelor, rezistența stratului nativ de oxid barieră crește în comparație cu cea a Ti. Rezistența totală ( $R_t = R_{acoperire} + R_{oxid}$ ) corespunzătoare probei Ti/SF are o valoare mai mare de  $8,054 \cdot 10^6 \Omega$ , comparativ cu proba Ti/PD, care este  $3,618 \cdot 10^6 \Omega$ . Aceste valori sunt în bună corelație cu rezultatele din panta Tafel, unde proba Ti/SF a prezentat o viteză de coroziune mai mică în comparație cu proba Ti/PD.

Prin simpla încărcare a Amx pe filmul PD (probă Ti/PD/Amx) și filmul SF (probă Ti/SFech/Amx), rezistența stratului de oxid nativ scade în comparație cu cea pentru proba Ti/PD și Ti/SF, dar este mai mare decât Ti neacoperit. Eșantionul Ti/Amx are o rezistență mai mică a stratului de acoperire în comparație cu probele Ti/PD/Amx și Ti/SFech/Amx. Modificările de comportament electrochimic care au fost observate pentru probele încărcate cu amoxicilină ar putea fi asociate cu inelul  $\beta$ -lactamic care conține azot și care acționează ca agent reducător, așa cum s-a observat în alt studiu [22].

Toate valorile N pentru stratul de oxid nativ sunt în jur de 0,9, indicând astfel un comportament pseudocapacitiv. Pentru stratul de acoperire, N are valori între 0,3 și 0,45 indicând acoperiri pseudorezistive.

Tabelul 5.3. Parametrii circuitelor echivalente propuse

Parametrii/ Probe	$R_s$ [ $\Omega$ ]	$R_{acoperire}$ [ $\Omega$ ]	CPE <sub>acoperire</sub>		$R_{oxid}$ [ $\Omega$ ]	CPE <sub>oxid</sub>		$X^2$
			$Y_0$ [ $S^*s^n$ ]	N		$Y_0$ [ $S^*s^n$ ]	N	
Ti	84,41	-	-	-	$0,17 \cdot 10^6$	$2,91 \cdot 10^{-5}$	0,85	0,05

Ti/Amx	98,84	$0,02 \cdot 10^4$	$0,07 \cdot 10^{-4}$	0,42	$1,23 \cdot 10^6$	$1,83 \cdot 10^{-5}$	0,92	0,04
Ti/PD	106,35	$1,75 \cdot 10^4$	$7,88 \cdot 10^{-4}$	0,45	$3,61 \cdot 10^6$	$3,42 \cdot 10^{-5}$	0,94	0,01
Ti/PD/Amx	86,63	$0,37 \cdot 10^4$	$32,61 \cdot 10^{-4}$	0,40	$0,52 \cdot 10^6$	$4,73 \cdot 10^{-5}$	0,95	0,04
Ti/SFech	85,64	$0,37 \cdot 10^4$	$12,50 \cdot 10^{-4}$	0,32	$8,05 \cdot 10^6$	$1,90 \cdot 10^{-5}$	0,94	0,01
Ti/SFech/Amx	90,17	$0,14 \cdot 10^4$	$14,82 \cdot 10^{-4}$	0,33	$1,95 \cdot 10^6$	$1,41 \cdot 10^{-5}$	0,91	0,07

### V.3.5.3. Voltametrie ciclică

Valorile  $C_{dl}$  obținute sunt prezentate în Tabelul 5.4.

După modificarea suprafeței de titan cu polidopamină, valoarea  $C_{dl}$  crește de la 215 la 500  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Pseudo-capacitanța indusă de un număr mai mare de grupări redox-active ale PD ar putea explica această creștere a capacității [23, 24].

Aceeași creștere a  $C_{dl}$  a fost observată și pentru modificarea suprafeței de titan cu fibroină, dar diferența nu este la fel de mare ca în cazul polidopaminei. SF se repliază de obicei într-o stare mai ordonată, structură  $\beta$ -sheets, care este mai strânsă și mai compactă, reducând cantitatea de sarcină negativă cauzată de protonarea grupărilor carboxil [25-27].

**Tabelul 5.4. Valorile  $C_{dl}$  calculate din diagramele CV pentru probele studiate.**

Probe	$C_{dl}$ [ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ]
Ti	214,81
Ti/Amx	264,07
Ti/PD	500,86
Ti/PD/Amx	641,85
Ti/SFech	383,79
Ti/SFech/Amx	693,73

După încărcarea Amx pe suprafața Ti/SFech, valoarea  $C_{dl}$  crește cu aproximativ 300  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , probabil datorită conjugării spontane a proteinei de mătase cu amoxicilina, așa cum a fost relevat de analiza FTIR. Protonii, în cazul nostru din soluția Fusayama (pH 6,5), slăbesc structurile etanșe ale SF prin ruperea treptată a legăturilor de hidrogen din structurile  $\beta$ -sheet [27], determinând probabil creșterea suprafeței active și îmbunătățirea formării stratului dublu.

Deși Ti/PD leagă o cantitate mai mare de Amx în comparație cu Ti/SFech, creșterea  $C_{dl}$  pentru Ti/PD/Amx este mai mică, fiind doar cu 142  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  mai mare decât Ti/PD. Astfel, chiar dacă Amx vine cu o contribuție importantă a grupelor funcționale încărcate, se pare că legăturile de hidrogen dintre grupările amino ale Amx și grupările hidroxil ale PD și interacțiunile  $\pi$ - $\pi$  dintre Amx și partea aromatică a PD [15, 17] acoperă o parte a suprafeței, creând un impediment în formarea stratului dublu.

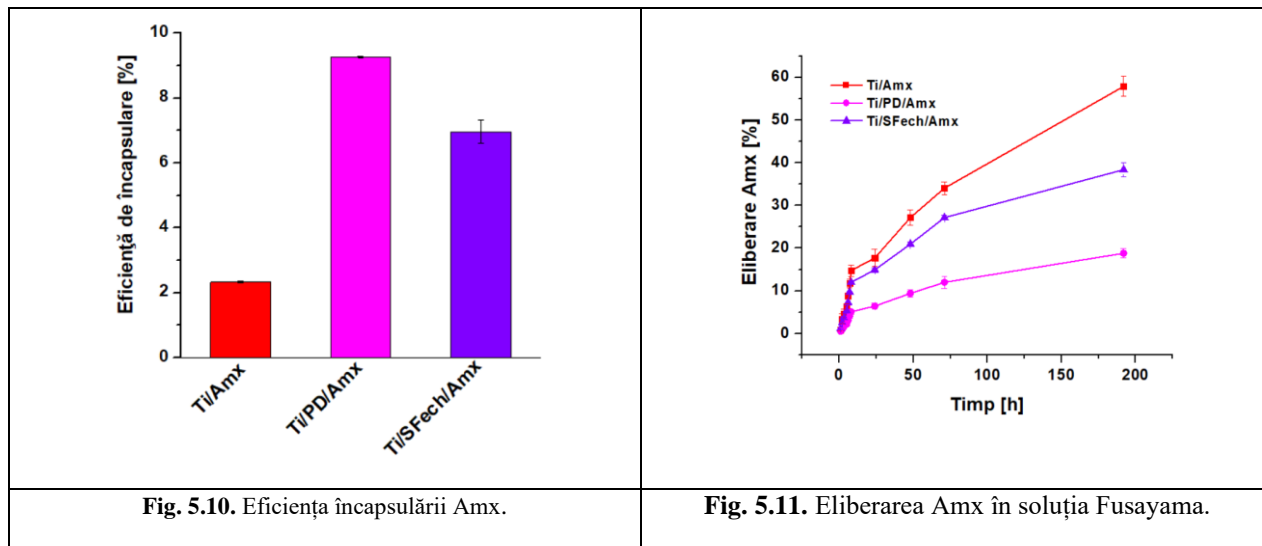
Analiza electrochimică a evidențiat o stabilitate mai bună a probei de titan cu suprafață modificată și a contribuit la stabilirea interacțiunii dintre amoxicilina, biopolimeri și suprafața de titan.

### V.3.6. Studii de eliberare pentru amoxicilină

În primul rând, eficiența încapsulării a fost evaluată luând în considerare diferența dintre concentrația inițială de Amx și concentrația finală de Amx, după îndepărtarea probei din soluția de imersie.

În cazul Ti neacoperit, a fost adsorbită o cantitate de 69,9  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , reprezentând 2,33% din cantitatea totală de Amx. Cea mai mare cantitate de Amx a fost încărcată în cazul probei de Ti/PD, 277,8  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , reprezentând 9,26% din cantitatea totală de Amx, probabil datorită unei mai bune interacțiuni între Amx și PD prin grupele lor funcționale și interacțiunile aromatice  $\pi$ - $\pi$ .

Pentru proba de Ti/SFech, cantitatea de Amx încapsulată (prin conjugarea proteinei de mătase cu amoxicilina) a fost de 208,8  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , reprezentând un procent de 6,96% (Fig. 5.10).



O eliberare bruscă, în primele ore de imersie în saliva Fusayama, a fost observată pentru toate probele, Fig. 5.11. În cazul probelor Ti/Amx și Ti/SFech/Amx, nu au fost observate diferențe semnificative în primele 8 ore, eliberarea Amx fiind de 14,73%, respectiv 12%. Cea mai lentă eliberare, 5,1%, a avut loc în cazul probei Ti/PD/Amx.

După 192 de ore, a avut loc o eliberare de medicament de 57,87%- Ti/Amx, 18,81%- Ti/PD/Amx și 38,37%- Ti/SFech/Amx.

Acoperirea cu fibroină a avut o eliberare mai lentă în timp, comparativ cu Ti neacoperit. Amx a fost cel mai bine încorporat pe suprafața probei Ti/PD/Amx. Utilizarea polidopaminei ca strat adeziv asigură o eliberare mai lentă în timp. O posibilă explicație pentru eliberarea mai rapidă a Ti/SFech/Amx în comparație cu Ti/PD/Amx ar putea fi pH-ul și compoziția complexă a soluției Fusayama. Acestea au contribuit la ruperea legăturii de hidrogen din configurația  $\beta$ -sheets a structurii SF, așa cum a fost deja prezentată în testele electrochimice.

În concluzie, modificarea suprafeței Ti cu biopolimeri influențează eficiența de captare a amoxicilinei și mecanismul de eliberare a acestui medicament.

### V.3.7. Activitatea antibacteriană *in vitro*

Rezultatele testului antibacterian împotriva a trei microorganisme selectate sunt prezentate în Fig. 5.12. Se poate observa că după 24 de ore, toate probele cu Amx au un efect antibacterian cvasi-similar. Diferențele consistente au apărut după 96 de ore și 192 de ore. În cazul probei Ti/Amx, efectul antibacterian prezintă o scădere bruscă în timp. Față de aceasta, Ti/PD/Amx și Ti/SFech/Amx, au un efect antibacterian mai mare chiar și după 192 de ore de expunere, probabil pentru că antibioticul a fost eliberat constant după prima zi, asigurând un efect antibacterian mai bun, comparativ cu proba Ti/Amx, care a încapsulat o cantitate mică de antibiotic care este eliberată rapid.

Efectul de inhibare este mai pronunțat pentru probele care conțin un înveliș polimeric, iar activitatea antibacteriană maximă a fost obținută pentru probele în care polidopamina a fost utilizată ca acoperire pentru a încărca Amx. Motivul constă într-o mai bună funcție de adeziv a polidopaminei, producând o fixare eficientă a antibioticului pe suprafața titanului. Un alt motiv posibil este efectul antimicrobian sinergic dintre polidopamină și antibiotic, deoarece polimerul PD și-a dovedit deja efectul antibacterian în studiile anterioare [28, 29]. Qi Qi Lei și colegii săi au menționat că prezența dopaminei conduce la îmbunătățirea capacității antibacteriene. O posibilă explicație este că polidopamina captează agresiv bacteriile la suprafață, facilitând sterilizarea prin contact [30].



Deși proba de Ti/PD/Amx prezintă cele mai bune rezultate, învelișul cu fibroină de mătase reprezintă și o alternativă pentru fixarea antibioticului pe suprafața Ti, având în vedere aportul acestuia din punct de vedere al bioactivității. Cu toate acestea, deoarece acoperirile cu fibroină de mătase posedă proprietăți adecvate pentru a fi utilizate frecvent ca schele (acoperiri pentru dispozitive medicale sau pansamente pentru răni), este necesară o îmbunătățire a activității sale antibacteriene slabe [31].

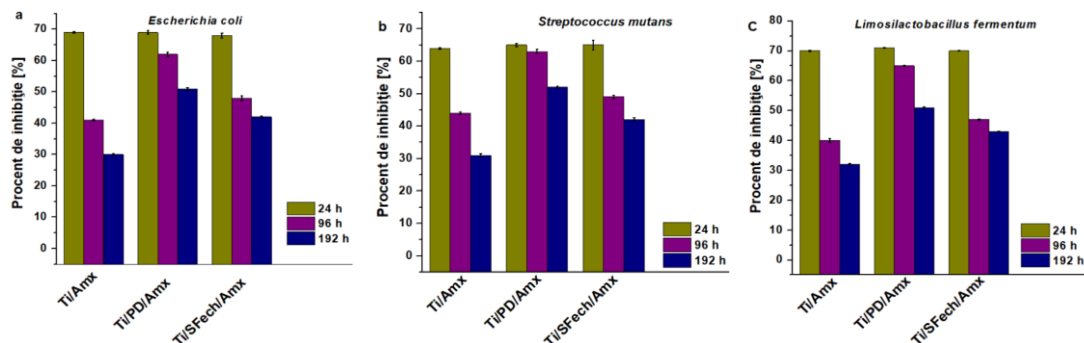


Fig. 5.12. Eficiența inhibitoare, contra: a) *Escherichia coli*; b) *Streptococcus mutans*; c) *Limosilactobacillus fermentum*.

## CAPITOLUL VI. MODIFICAREA SUPRAFEȚEI TITANULUI CU NANOSTRUCTURI DE TiO<sub>2</sub> PENTRU ELIBERAREA AMOXICILINEI ÎN IMPLANTOLOGIA DENTARĂ

Lucrarea de față se axează pe legarea amoxicilinei pe suprafața de Ti, folosind nanotuburi de TiO<sub>2</sub> nereduse sau reduse. Această lucrare prezintă o abordare a formării nanotuburilor reduse de TiO<sub>2</sub>, precum și testarea capacității acestora de a încorpora și elibera local amoxicilină pentru suprafețele implantabile dentare din titan.

### VI.3. CARACTERIZAREA SUPRAFEȚELOR

#### VI.3.1. Analiza morfologiei suprafeței

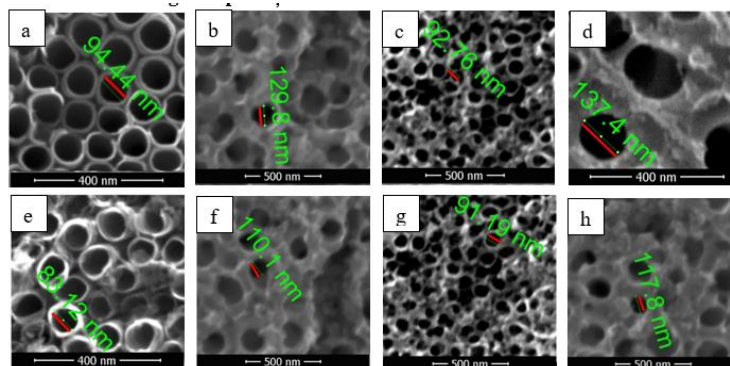


Fig. 6.1. Imagini SEM corespunzătoare probelor nanostructurate: a) TNT-40V; b) TNT-80V; c) TNTr2; d) TNTr4; e) TNT-40V/Amx; f) TNT-80V/Amx; g) TNTr-40V/Amx; h) TNTr-80V/Amx.

Fig. 6.1 prezintă imaginile SEM ale nanotuburilor de dioxid de titan obținute prin anodizare electrochimică cu și fără amoxicilină. Suprafața probelor de Ti este acoperită în întregime cu nanotuburi auto-organizate care au înălțimi diferite, dar diametre uniforme. Se poate observa că Amx nu influențează morfologia nanotuburilor. Prezența amoxicilinei pe suprafața nanotuburilor nu este vizibilă, având în vedere că a fost atașată o cantitate mică din acest compus.

#### VI.3.2. Analiza FT-IR

După cum se arată în Fig. 6.2, în spectrele FTIR ale pulberii de amoxicilină pot fi identificate grupările: N-H (întindere), O-H (întindere), C=O (carboxil), C=O (amidă), N-H (îndoire), C=C, O-H (îndoire), C-N (îndoirea) și C-O

la 3449, 3162, 1780, 1687, 1574, 1487, 1398, 1315 și 1252  $\text{cm}^{-1}$  [12]. Probele nanostructurate modificate cu amoxicilina (TNT-40V/Amx, TNT-80V/Amx, TNTr-40V/Amx și TNTr-80V/Amx) prezintă aceleași peak-uri. Acest lucru indică faptul că Amx a fost încărcată pe suprafețele nanostructurate.

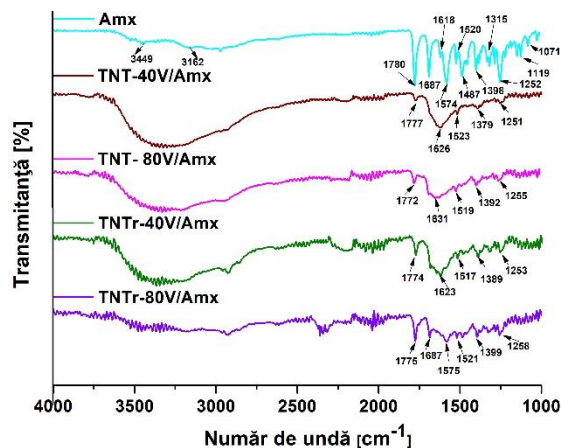
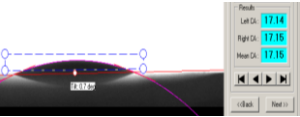
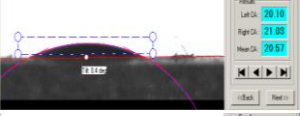

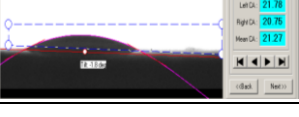


Fig. 6.2. Spectrele FT-IR ale probelor nanostructurate pe care s-a încorporat amoxicilina.

### VI.3.3. Analiza umectabilității suprafeței

Valorile unghiurilor de contact pentru picăturile de apă depuse pe suprafețele nanostructurate sunt prezentate în Tabelul 6.2. Toate probele modificate cu amoxicilina au o valoare a unghiului de contact între  $17^\circ$  și  $21^\circ$ , fiind în mare măsură în acord cu constatările altor investigații [3]. Nu există o diferență vizibilă în ceea ce privește umectabilitatea acestor probe, toate având un puternic caracter hidrofil. Acest lucru ar putea fi avantajos pentru atașarea și proliferarea celulelor pe suprafața materialelor implantabile [8].

Tabelul 6.2. Unghiul de contact al suprafețelor modificate

Probe	Unghi de contact [ ° ]	Deviație standard [ ° ]
TNT-40V/Amx		$\pm 0,52$
TNT-80V/Amx		$\pm 0,42$
TNTr-40V/Amx		$\pm 0,45$
TNTr-80V/Amx		$\pm 0,48$

### VI.3.4. Caracterizare electrochimică

#### VI.3.4.1. Analiza Tafel

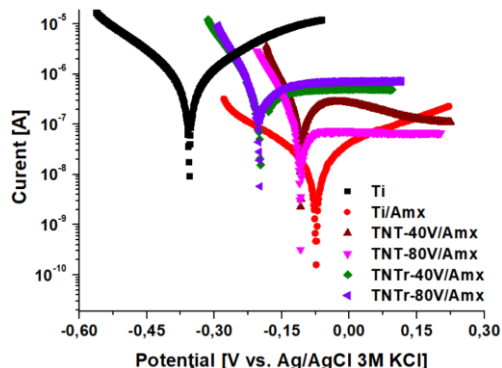


Fig. 6.3. Diagrama Tafel pentru probele de Ti modificate.

Fig. 6.3 prezintă diagramele Tafel ale suprafeței probelor modificate. Proba Ti/Amx are cel mai scăzut curent de coroziune și un potențial mai electropozitiv în comparație cu celelalte probe, prin urmare este mai puțin susceptibil la coroziune.

Parametrii de coroziune au fost calculați folosind software-ul NOVA prin extrapolarea curbelor catodice și a celor anodice (Tabelul 6.3).

**Tabelul 6.3. Principalii parametri de coroziune**

Probe	Potențial de coroziune [V]	Densitatea curentului de coroziune [A/cm <sup>2</sup> ]	Viteză de coroziune [mm/an]
Ti	-0,35	$9,58 \cdot 10^{-7}$	$111 \cdot 10^{-4}$
Ti/Amx	-0,08	$2,50 \cdot 10^{-7}$	$18,32 \cdot 10^{-4}$
NT-40V/Amx	-0,10	$4,58 \cdot 10^{-7}$	$53,28 \cdot 10^{-4}$
NT-80V/Amx	-0,11	$3,26 \cdot 10^{-7}$	$37,87 \cdot 10^{-4}$
TNT-40V/Amx	-0,20	$6,47 \cdot 10^{-7}$	$75,22 \cdot 10^{-4}$
TNT-80V/Amx	-0,20	$7,16 \cdot 10^{-7}$	$84,80 \cdot 10^{-4}$

Proba Ti/Amx este cea mai stabilă din punct de vedere al coroziunii, având cea mai mică viteză de coroziune în comparație cu celelalte probe. Conform investigațiilor noastre, Amx reprezintă un strat protector pentru suprafața de Ti, reducând viteza de coroziune pentru Ti/Amx în comparație cu proba de Ti [3].

Viteza de coroziune și densitățile curentului de coroziune au crescut ușor atunci când Amx a fost încărcat în substratul de nanotuburi, cel mai probabil din cauza interacțiunii dintre Amx și aceste nanostructuri. Cu toate acestea, în comparație cu substratul de titan, viteza de coroziune este redusă semnificativ pentru toate probele modificate.

#### VI.3.4.2. Spectroscopie electrochimică de impedanță

Fig. 6.4 prezintă diagramele Nyquist pentru probele analizate. Ca o primă observație, din analiza EIS: toate probele modificate au rezistență mai mare decât Ti netratat, fiind mai stabile.

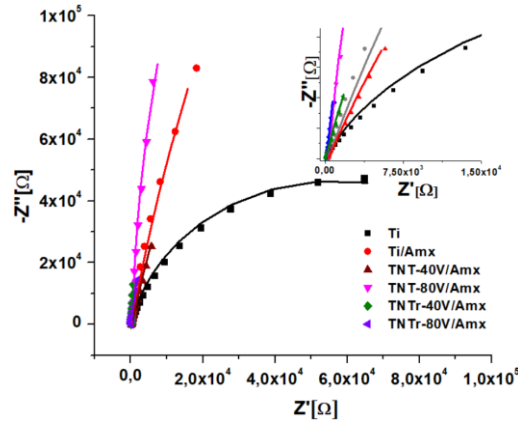


Fig. 6.4. Diagrame Nyquist ale probelor modificate, realizate în NaCl (aq).

Parametrii obținuți în urma fitării, sunt prezentați în Tabelul 6.4. Ținând cont de similitudinea electrolitului și a condițiilor de testare, rezistența soluției este practic identică pentru toate probele examinate (aproximativ 100 Ω). Se poate observa că după acoperirea suprafeței,  $R_{oxid}$  crește în comparație cu substratul de titan. După depunerea amoxicilinei, suprafețele nanotubulare au o rezistență mai mare comparativ cu Ti/Amx. Valorile N ale stratului de oxid nativ pentru toate probele sunt în jur de 0,9, ceea ce sugerează un comportament pseudocapacitiv. Pentru stratul de acoperire, valorile N sunt mai mici de 0,5, indicând un comportament pseudorezistiv.

Tabelul 6.4. Parametri obținuți din circuite echivalente

Parametrii/ Probe	$R_s$ [Ω]	$R_{acoperire}$ [Ω]	$CPE_{acoperire}$		$R_{oxid}$ [Ω]	$CPE_{oxid}$		$X^2$
			$Y_0$ [S*s <sup>n</sup> ]	N		$Y_0$ [S*s <sup>n</sup> ]	N	
Ti	75,5	-	-	-	$0,11 \cdot 10^6$	$2,60 \cdot 10^{-5}$	0,87	0,07
Ti/Amx	97,8	$2,0 \cdot 10^2$	$0,80 \cdot 10^{-3}$	0,43	$1,10 \cdot 10^6$	$1,83 \cdot 10^{-5}$	0,91	0,06
TNT-40V/Amx	99	$7,0 \cdot 10^2$	$2,31 \cdot 10^{-3}$	0,45	$0,87 \cdot 10^6$	$19,31 \cdot 10^{-5}$	0,89	0,23
TNT-80V/Amx	89	$9,0 \cdot 10^2$	$1,45 \cdot 10^{-3}$	0,47	$1,11 \cdot 10^6$	$18,64 \cdot 10^{-5}$	0,99	0,21
TNTr-40V/Amx	96,8	$9,1 \cdot 10^2$	$31,40 \cdot 10^{-3}$	0,39	$2,00 \cdot 10^6$	$0,11 \cdot 10^{-5}$	0,97	0,01
TNTr-80V/Amx	74,5	$9,0 \cdot 10^2$	$11,01 \cdot 10^{-3}$	0,47	$0,62 \cdot 10^6$	$9,12 \cdot 10^{-5}$	0,94	0,01

### VI.3.4.3. Voltametrie ciclică

Din tabelul 6.5 se poate observa că după modificarea suprafeței titanului cu amoxicilină, valoarea  $C_{dl}$  crește de la 0,23 la 0,3 mF/cm<sup>2</sup>. Acest comportament este în acord cu constatările investigațiilor noastre [3]. Dezvoltarea structurilor nanotubulare pe suprafața de titan îmbunătățește hidrofilicitatea suprafeței, accelerând transferul de sarcină la interfață și consolidarea stratului dublu electric. Astfel, capacitatea electrochimică a structurilor poroase ale probelor nanotubulare poate fi influențată semnificativ de difuzia ionilor și transferul de sarcină.

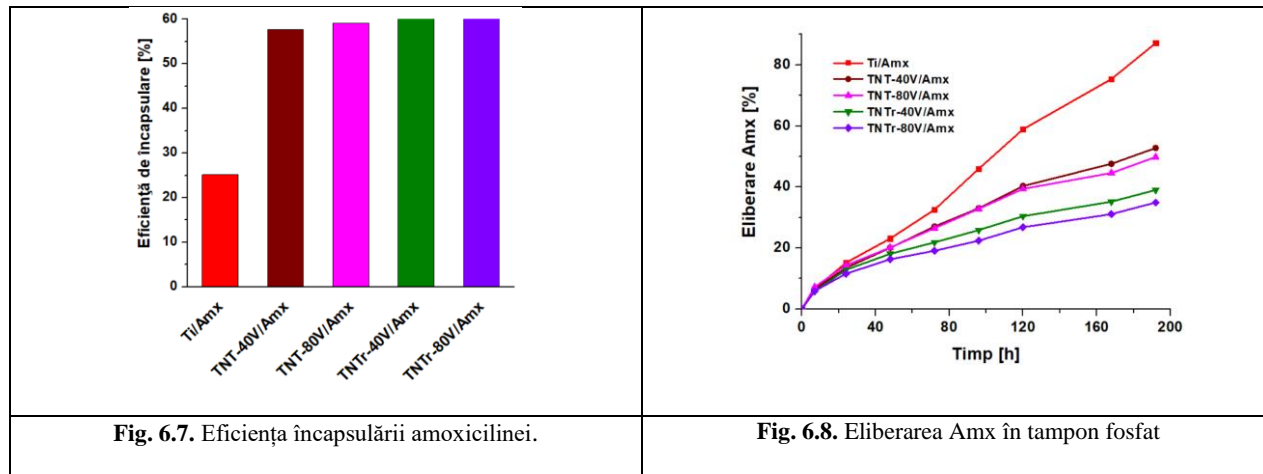
Probele studiate au avut valori ale  $C_{dl}$  ridicate, în special nanotuburi reduse (TNTr\_40V/Amx = 1,74 mF/cm<sup>2</sup> și TNTr\_80V/Amx = 1,58 mF/cm<sup>2</sup>). Acest lucru poate indica un proces de adsorbție/desorbție a ionilor mai eficient la interfața dintre soluția de electrolit și suprafața nanostructurată.

Tabelul 6.5. Valorile  $C_{dl}$  calculate din diagramele CV pentru probele testate

Probe	$C_{dl}$ [mF/cm <sup>2</sup> ]
Ti	0,23
Ti/Amx	0,30
TNT-40V/Amx	0,81
TNT-80V/Amx	0,84
TNTr-40V/Amx	1,74

### VI.3.5. Studii de eliberare pentru amoxicilină

Toate probele nanostructurate studiate au înglobat aproximativ aceeași cantitate de amoxicilină (60%), probabil datorită unei interacțiuni mai bune între nanotuburile de  $\text{TiO}_2$  și Amx (Fig.6.7).



Curbele de eliberare a amoxicilinei pentru toate probele pe parcursul a 192 ore sunt prezentate în Fig. 6.8. Nu au existat modificări semnificative în primele 120 de ore între probele TNT-40V/Amx și TNT-80V/Amx, eliberarea Amx fiind 40,32% și respectiv 39,38%. În cazul probei TNTr-80V/Amx, s-a observat cea mai mică cantitate eliberată de Amx, 26,82%. După 192 de ore, a avut loc o eliberare de medicament de 87,12% (Ti/Amx), 52,78% (TNT-40V/Amx), 49,81% (TNT-80V/Amx), 39,01% (TNTr-40V/Amx) și 34,92% (TNTr-80V/Amx)

În comparație cu substraturile TNT-40V și TNT-80V, eliberarea mai lentă poate fi obținută în timp ce se utilizează nanotuburi reduse (TNTr-40V și TNTr-80V).

Morfologia distinctă a nanotuburilor de  $\text{TiO}_2$  produse după anodizare poate fi folosită pentru a explica acest comportament. Eliberarea este similară în primele ore, probabil datorită faptului că antibioticul este eliberat din partea superioară a nanotuburilor.

Conform investigațiilor noastre, Amx poate fi fixat pe suprafața nanostructurată de Ti, folosind fie TNT, fie TNTr. În plus, TNTr demonstrează o performanță îmbunătățită în ceea ce privește eliberarea amoxicilinei în timp, acest fapt, făcând aceste materiale adecvate pentru aplicațiile de administrare locală a medicamentelor.

## CAPITOLUL VII. MODIFICAREA SUPRAFEȚELOR IMPLANTURILOR DE TI CU NANOTUBURI DE $\text{TiO}_2$ / FIBROINĂ DE MĂTASE /ZNO PENTRU UN EFECT ANTIMICROBIAN ÎMBUNĂTĂȚIT

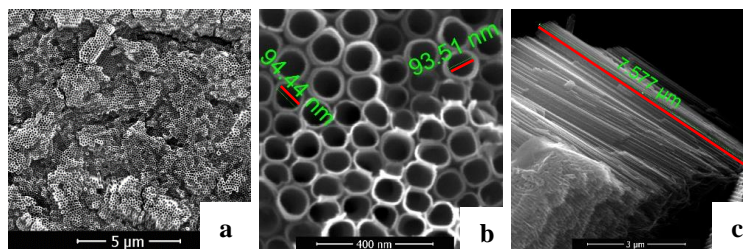
Având în vedere noțiunile prezentate din literatură, lucrarea de față propune o abordare nouă în crearea de acoperiri de Ti cu efect antimicrobian îmbunătățit, folosind polimeri biomimetici inspirați din natură. În primul rând, suprafața de Ti a fost nanostructurată cu nanotuburi de  $\text{TiO}_2$ , urmată de depunerea fibrelor de fibroină de mătase, folosind un proces de electrofilare. Un aspect important de originalitate pentru această lucrare constă în abordarea și optimizarea diferitelor metode de acoperire a procesului de funcționalizare cu ZnO, ca agent antibacterian. Acest lucru a fost realizat folosind trei metode de acoperire hibridă, iar proprietățile rezultate au fost evaluate comparativ din punct

de vedere al morfologiei, topografiei, umectabilității și efectului antibacterian - proprietăți care vor determina comportamentul biologic al materialului. Mai mult, stabilitatea electrochimică, o problemă nu foarte des abordată în literatură pentru aceste tipuri de acoperiri, a fost discutată în corelație cu structura chimică.

### VII.3. CARACTERIZAREA SUPRAFETELOR

#### VII.3.1. Analiza morfologiei și compoziției suprafețelor

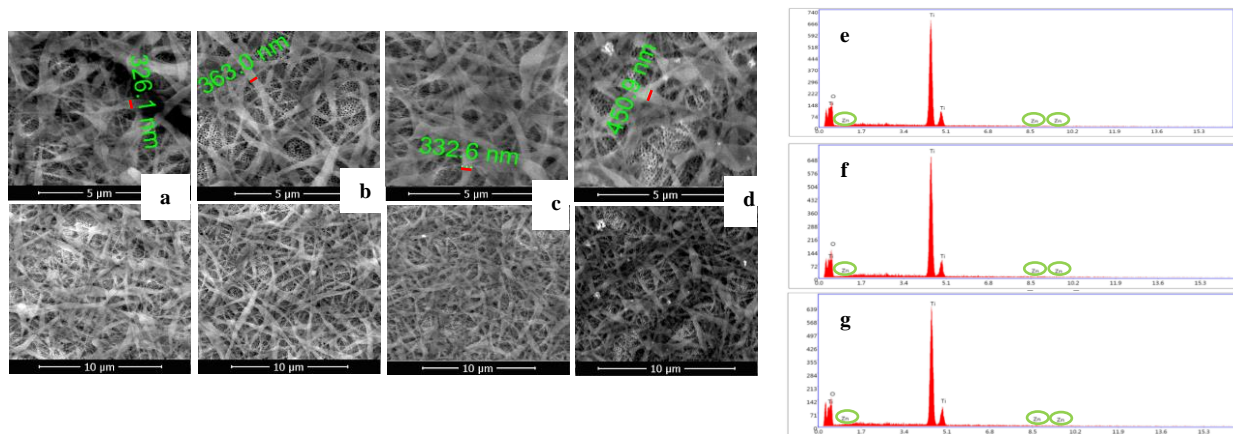
Rezultatele SEM ale titanului nanostructurat au demonstrat că suprafața este acoperită cu structuri de nanotuburi cu morfologie și aranjare uniforme. În aceste condiții experimentale, la suprafața Ti au crescut nanotuburi auto-organizate și aliniate vertical. În plus, nanotuburile sunt bine definite și distribuite uniform pe suprafață, cu o morfologie deschisă, fără prezența unui strat de oxid la suprafața nanotuburilor, așa cum se vede în Fig. 7.1a. Acestea au diametre externe de aproximativ 90 nm și pereți subțiri (Fig. 7.1b). Imaginile în secțiune transversală (Fig. 7.1c) au arătat lungimea nanotuburilor de aproximativ 7,5  $\mu\text{m}$ , având o structură de tip bambus.



**Fig. 7.1.** Imagini SEM: a) reprezintă eșantionul TNT-40V, b) reprezintă vedere de sus a probei TNT-40V și c) reprezintă secțiunea transversală

Fig. 7.2 prezintă morfologia fibrelor SF electrofilate înainte și după imobilizarea nanoparticulelor de ZnO pe suprafața nanotuburilor de  $\text{TiO}_2$ , precum și spectrele EDX pentru probele care conțin nZnO. Fig. 7.2a prezintă un strat dens de fibre de mătase netede interconectate într-o gamă largă de grosimi și lungimi. Imaginile la magnificație mare au relevat un diametru de 326 nm pentru fibrele SF. Fibrele au fost răspândite uniform deasupra nanotuburilor, rezultând o matrice care combină microstructura fibrelor SF și nanostructura corespunzătoare nanotuburilor de  $\text{TiO}_2$ . Acesta este un aspect important deoarece suprafața modificată nu a avut aceeași morfologie, ceea ce este benefic pentru atașarea celulelor. Fig. 7.2b și 7.2c indică faptul că adăugarea de nanoparticule de ZnO nu are niciun impact asupra morfologiei fibrelor SF. Mărimea fibrelor SF s-a schimbat după imobilizarea polidopaminei, devenind mai grosieră ( $d = 450$  nm; Fig. 7.2d). Agregate mici au fost depuse pe suprafața fibroasă după acoperirea cu ZnO, așa cum este ilustrat în Fig. 7.2d.

Rezultatele studiului EDX ale probelor TNT/SFef-nZnO, TNT/nZnO/SFef și TNT/SFef/PD/nZnO sunt prezentate în Fig. 7.2e, 7.2f și 7.2g. Au fost identificate maxime caracteristice pentru zinc, oxigen și titan. Procentul de Zn în toate cele trei probe este cuprins între 0,37 – 0,47%. Acest lucru indică faptul că nZnO au fost încorporate cu succes în matricea hibridă.

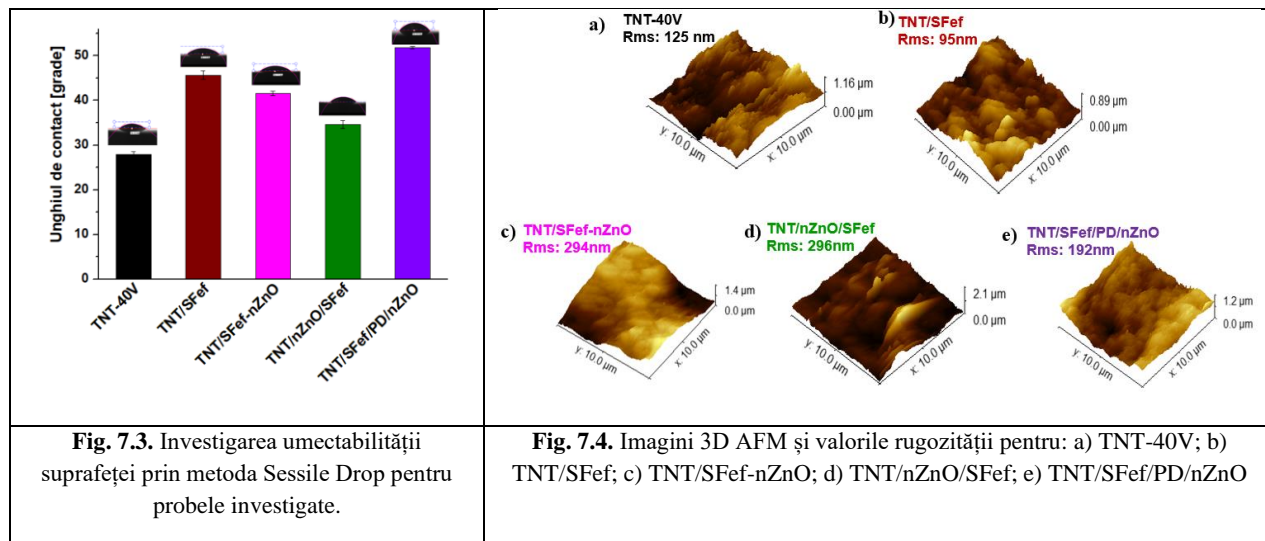


**Fig. 7.2.** Imagini SEM corespunzătoare a) TNT/SFef; b) TNT/SFef-nZnO; c) TNT/nZnO/SFef; d) TNT/SFef/PD/nZnO și diagramele EDX corespunzătoare pentru probe care conțin nZnO: e) TNT/SFef-nZnO, f) TNT/nZnO/SFef și g) TNT/SFef/PD/nZnO

Analiza SEM arată că toate probele prezintă o distribuție uniformă a nanotuburilor de TiO<sub>2</sub> și a nanofibrelor SF. Analiza EDX demonstrează prezența nanoparticulelor de Zn pe suprafața TNT-40V modificată.

### VII.3.2. Analiza umectabilității și topografiei suprafeței

În acest studiu, metoda Sessile Drop a fost utilizată pentru a investiga influența compoziției chimice a acoperirilor și a rugozității asupra umectabilității suprafețelor nanotubulare (Fig. 7.3). Unghiurile de contact ale suprafețelor TNT-40V și TNT-SFef au fost măsurate, obținându-se  $28^\circ \pm 0,57^\circ$  și, respectiv,  $46^\circ \pm 0,99^\circ$ , așa cum s-a observat și în cercetările noastre anterioare [4]. Este evident că toate suprafețele au caracter hidrofil deoarece unghiul de contact este  $< 90^\circ$ . Hidrofilicitatea suprafeței nanotubulare scade atunci când sunt depuse fibrele SF (Fig. 7.3). Această scădere este explicată pe baza prezenței porțiunilor hidrofobe în structura SF, fiind vorba de o structură cristalină, numită  $\beta$ -sheets [32]. Odată cu adăugarea de nZnO, unghiul de contact a scăzut la  $42^\circ \pm 0,51^\circ$  în TNT/SFef-nZnO și  $35^\circ \pm 0,9^\circ$  în TNT/nZnO/SFef. Unghiul de contact corespunzător TNT/SFef/PD/nZnO are o valoare de  $52^\circ \pm 0,28^\circ$  și este comparabil cu substratul PD obținut în altă cercetare [4].



**Fig. 7.3.** Investigarea umectabilității suprafeței prin metoda Sessile Drop pentru probele investigate.

**Fig. 7.4.** Imagini 3D AFM și valorile rugozității pentru: a) TNT-40V; b) TNT/SFef; c) TNT/SFef-nZnO; d) TNT/nZnO/SFef; e) TNT/SFef/PD/nZnO

Dezvoltarea interfeței os-implant și contactul bacterian depind în mare măsură de rugozitatea suprafeței [33, 34].

Fig. 7.4 prezintă imagini 3D AFM corespunzătoare tuturor probelor testate. Rugozitatea probei TNT/SFef a scăzut la 95 nm de la 125 nm, care corespunde substratului TNT-40V, în timp ce unghiul de contact a crescut. Rugozitatea și hidrofilicitatea probelor care conțin SF și nanoparticule de ZnO (TNT/nZnO/SFef și TNT/SFef-nZnO) sunt mai mari decât cele ale TNT/SFef. Corelând acest lucru cu umectarea, se poate aplica modelul Wenzel: prin creșterea rugozității suprafeței, substratul devine mai hidrofil [35-37].

În comparație cu substratul TNT/SFef, proba TNT/SFef/PD/nZnO are o rugozitate și un unghi de contact mai mari. Această „mushroom” este o stare intermediară între modelele Cassie-Baxter și Wenzel [3].

Varietatea morfologiilor ar putea fi folosită pentru a explica aceste diferențe în unghiul de contact cu apa. Suprafețele hidrofile prezintă în general rezistență la aderența microbiană, fiind astfel mai greu contaminabile. Investigațiile au demonstrat că biomaterialele care prezintă niveluri mai mari de hidrofilicitate facilitează o dezvoltare celulară îmbunătățită [38].

### VII.3.3. Analiza FT-IR

În cazul acestui studiu, maximele amidelor I, II și III la 1614, 1520, 1445 și 1230  $\text{cm}^{-1}$  au fost atribuite soluției de fibroină de mătase de concentrație 6,45 % (Fig. 7.5). Maximele pentru probele TNT/SFef, TNT/SFef-nZnO și TNT/nZnO/SFef au avut aproximativ aceleași valori, ceea ce indică faptul că suprafața nanostructurată a fost acoperită eficient cu fibroină. Maximele caracteristice la 1623, 1520 și 1225  $\text{cm}^{-1}$  indică faptul că fibroina de mătase este într-o conformație  $\beta$ -sheet. Prezența nanoparticulelor de ZnO nu influențează spectrul FTIR.

Conform rezultatelor noastre [3], polidopamina are maxime la 3350  $\text{cm}^{-1}$  (întinderi OH și NH), 1283 și 1631  $\text{cm}^{-1}$  (vibrații de întindere a legăturilor catecol hidroxil C-O și C=O) și 1523  $\text{cm}^{-1}$  (C=C din structura indolică a PD). Deoarece PD și SF sunt polimeri naturali, maximele lor sunt comparabile (1631 și 1523  $\text{cm}^{-1}$ ). În consecință, nu există modificări semnificative ale maximului FTIR între probele TNT/SFef și TNT/SFef/PD/nZnO, ceea ce indică faptul că ambii polimeri au fost depuși pe suprafața nanotubulară.

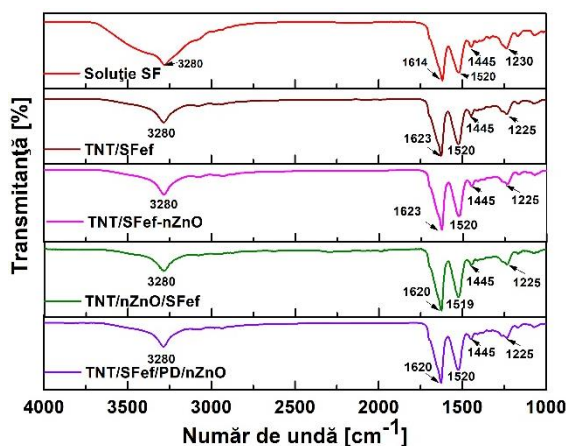


Fig. 7.5. Imaginile FT-IR corespunzătoare probelor studiate.

### VII.3.4. Caracterizare electrochimică

#### VII.3.4.1. Spectroscopie electrochimică de impedanță

Din datele prezentate în Tabelul 7.2 se poate observa că valorile pentru  $R_{\text{soluție}}$  sunt similare pentru toate probele analizate și au valori între 60 și 100, având în vedere că s-a utilizat aceeași soluție de electrolit. În comparație cu suprafețele TNT-40V, suprafețele TNT-40V modificate posedă o rezistență mai mare a stratului de oxid compact ( $R_{\text{oxid}}$ ). Aceste valori demonstrează o relație excelentă cu rezultatele diagramei Tafel, care arată că vitezele de coroziune pentru probele TNT-40V modificate au fost mai mici decât cele ale probei de TNT-40V.



Când se adaugă nanoparticule de ZnO (TNT/nZnO/SFef și TNT/SFef-nZnO), rezistența stratului de oxid barieră crește în comparație cu proba TNT/SFef. Într-un alt studiu, valoarea rezistenței nanostructurilor de TiO<sub>2</sub> a scăzut după modificarea directă cu ZnO prin metoda hidrotermală [39]. În studiul nostru, a doua rezistență asociată cu acoperirea ( $R_{acoperire}$ ) este mai mare pentru toate probele TNT-40V modificate în comparație cu substratul TNT-40V. O posibilă explicație ar putea fi aceea că SF și nanoparticulele de ZnO sunt depuse la suprafața stratului de nanotuburi. Mai mult, se poate observa că probele TNT/SFef-nZnO și TNT/nZnO/SFef au prezentat rezistențe de acoperire mai mari decât substratul TNT/SFef, fiind mai stabile.

TNT/SFef/PD/nZnO are un diametru mai mic al semicercului în diagrama Nyquist în comparație cu cel al probelor TNT-40V modificate. Acest lucru sugerează o rezistență redusă la transferul de sarcină și un transport de sarcină crescut semnificativ la contactul electrod/electrolit [40]. Majoritatea probelor au valori N pentru stratul de oxid și acoperirea suprafeței în intervalul de la 0,61 la 0,98, indicând comportamentul pseudocapacitiv.

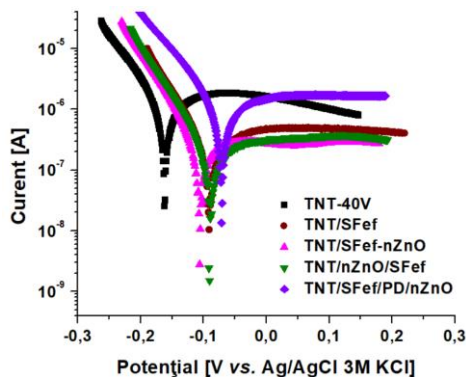
**Tabelul 7.2. Valori obținute din datele EIS ajustate folosind software-ul NOVA.**

Parametrii Probe	$R_s$ [ $\Omega$ ]	$R_{PD}$ [ $\Omega$ ]	$CPE_{PD}$		$R_{acoperire}$ [ $\Omega$ ]	$CPE_{acoperire}$		$R_{oxid}$ [ $\Omega$ ]	$CPE_{oxid}$		$X^2$
			$Y_0$ [ $\mu S \cdot s^n$ ]	N		$Y_0$ [ $\mu S \cdot s^n$ ]	N		$Y_0$ [ $\mu S \cdot s^n$ ]	N	
NT	99				$4 \cdot 10^3$	62	0,71	$20 \cdot 10^3$	149	0,68	0,01
NT/SF	91	-	-	-	$8 \cdot 10^3$	266	0,92	$136 \cdot 10^3$	65	0,96	0,07
NT/SF-ZnO	68				$9 \cdot 10^3$	278	0,82	$156 \cdot 10^3$	900	0,93	0,04
NT/ZnO/SF	68				$10 \cdot 10^3$	356	0,87	$184 \cdot 10^3$	897	0,98	0,03
NT/SF/PD/ZnO	63	$1,7 \cdot 10^3$	79	0,74	$5 \cdot 10^3$	270	0,61	$92 \cdot 10^3$	297	0,89	0,01

Analiza EIS a arătat că toate probele de TNT-40V modificate sunt mai stabile decât TNT-40V netratat și prezintă un comportament pseudo-capacitiv.

#### VII.3.4.2. Analiza Tafel

Diagramele Tafel (Fig. 7.7) au fost utilizate pentru a obține parametrii electrochimici pentru suprafețele investigate: potențial de coroziune ( $E_{corr}$ ), curent de coroziune ( $i_{corr}$ ) și viteză de coroziune ( $v_{corr}$ ).



**Fig. 7.7.** Diagrama Tafel pentru probele studiate, înregistrate în NaCl 0,9%.

Figura 7.7 demonstrează că toate curbele de polarizare au fost asemănătoare. Acest lucru a indicat că toate straturile compozite din această investigație (TNT/SFef-nZnO, TNT/nZnO/SFef, TNT/SFef/PD/nZnO) au folosit un mecanism de polarizare similar. Parametrii de coroziune au fost obținuți prin extrapolarea curbilor anodice și catodice (Tabelul 7.3). În plus, eficacitatea protecției a fost calculată folosind formula [65].

**Tabelul 7.3. Parametrii de coroziune pentru probele studiate.**

Probă	Potențial de coroziune [V]	Densitatea curentului de coroziune [ $A/cm^2$ ]	Viteză de coroziune [mm/year]	Eficiența protecției [%]
TNT-40V	-0,161	$3,896 \cdot 10^{-6}$	0,0452	-
TNT/SFef	-0,092	$0,359 \cdot 10^{-6}$	0,0042	91
TNT/SFef-nZnO	-0,104	$0,249 \cdot 10^{-6}$	0,0029	94
TNT/nZnO/SFef	-0,091	$0,119 \cdot 10^{-6}$	0,0014	97
TNT/SFef/PD/nZnO	-0,071	$0,568 \cdot 10^{-6}$	0,0066	84

În general, un material cu o densitate a curentului de coroziune mai mică și un potențial de coroziune mai mare are o predispoziție redusă la coroziune și, prin urmare, funcționează mai bine împotriva coroziunii [41].

Potențialul de coroziune a fost deplasat către valori mai pozitive pentru TNT/SFef și toate probele modificate cu nZnO în comparație cu TNT-40V netratat, așa cum poate fi arătat în Tabelul 7.3. Este evident că modificarea suprafeței cu fibroină de mătase a determinat o deplasare a potențialului de coroziune de la -0,161 V pentru TNT-40V la valori mai electropozitive, până la -0,071 V pentru TNT/SFef/PD/nZnO, demonstrând o creștere a stabilității suprafeței TNT-40V în urma acoperirii. În mod similar, s-a constatat că densitatea curenților de coroziune este mai mică pentru probele acoperite în comparație cu TNT-40V, sugerând același lucru. Prin urmare, densitatea curentului de coroziune a scăzut de la  $3,89 \cdot 10^{-6} A/cm^2$  pentru TNT-40V la valori de 6-9 ori mai mici pentru probele modificate.

În comparație cu TNT-40V, toate probele modificate care conțin fibroină de mătase și nanoparticule de ZnO prezintă potențiale mai electropozitive. Probele TNT/nZnO/SFef și TNT/SFef-nZnO prezintă o susceptibilitate mai scăzută la coroziune decât probele TNT-40V din cauza curenților de coroziune mai mici. Proba TNT/nZnO/SFef a prezentat o viteză de coroziune mai mică ( $0,0014 mm/an$ ) comparativ cu proba TNT-40V ( $0,452 mm/an$ ).

TNT/nZnO/SFef prezintă cea mai mare eficiență de protecție împotriva coroziunii (97 %). Probabil că nanoparticulele de ZnO depuse pe pereții nanotuburilor pot pasiva porțiunile defectuoase ale suprafeței  $TiO_2$ .

Toate acoperirile au contribuit la o stabilitate sporită la coroziune și la cea mai mare eficiență de protecție împotriva coroziunii în comparație cu TNT-40V netratat.

### VII.3.4.3. Voltametrie ciclică

Capacitatea stratului dublu electric ( $C_{dl}$ ) poate fi o caracteristică structurală fundamentală pentru interacțiunile de suprafață, fiind determinată de relația dintre sarcina de suprafață și interfața oxid-soluție [3, 42].

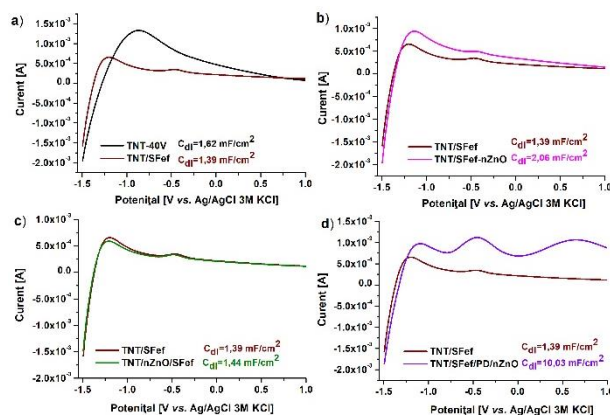


Fig. 7.8. Ramura anodică a voltamogramelor ciclice pentru toate probele testate, utilizate pentru calculul  $C_{dl}$ .

Dimensiunea nanotuburilor de  $TiO_2$  și morfologia tubului gol facilitează transferul de sarcină și stimulează mișcarea ionilor interfaciali, ceea ce duce la o performanță capacitivă îmbunătățită [43]. În stratul de nanotuburi,

structura cu pori deschiși face posibilă difuzia ionilor din electrolit [44]. Creșterea stratului de fibre de mătase pe suprafața TNT-40V a condus la netezirea suprafeței, așa cum s-a observat în analiza AFM și acoperirea unor nanotuburi, așa cum se vede din imaginile SEM. Astfel, suprafața activă scade, iar capacitatea stratului dublu este redusă pentru TNT/SFef în comparație cu TNT-40V (Fig. 7.8a).

Prin depunerea nZnO pe substratul TNT/SFef, Fig. 7.8b-c, suprafața probei determină o creștere a suprafeței active și a curentului Faradaic, precum și a  $C_{dl}$  (de la 1,39 la 2,06 sau 1,44 mF/cm<sup>2</sup>). Astfel, modificarea suprafeței TNT/SFef cu nanoparticule de ZnO a îmbunătățit hidrofilicitatea, umectabilitatea și rugozitatea suprafeței, accelerând astfel viteza transferului de sarcină la interfață și formarea stratului dublu electric. Structura poroasă atât a TNT/nZnO/SFef, cât și a TNT/SFef-nZnO poate fi atribuită în special transferului de sarcină și difuziei ionilor, care au un impact semnificativ asupra capacității sale electrochimice. Proba TNT/SFef/PD/nZnO are cea mai mare valoare  $C_{dl}$  (10,03 mF/cm<sup>2</sup>), generând un proces eficient de adsorbție/desorbție ionică la interfața dintre această suprafață și soluția de electrolit. Valoarea  $C_{dl}$  obținută pentru proba TNT/SFef/PD/nZnO este comparabilă cu valorile obținute pentru nanostructurile de diamant dopate cu bor din nanotuburi TiO<sub>2</sub> din alte studii [45].

### VII.3.5. Activitate antibacteriană *in vitro*

Pentru a evalua activitatea antibacteriană a suprafețelor nou create au fost investigate următoarele tulpini microbiene patogene umane: *Staphylococcus aureus* și *Enterococcus faecalis*

Este deja cunoscut din literatură că nanostructurarea suprafeței de titan cu nanotuburi duce la o ușoară îmbunătățire a inhibării creșterii bacteriene în comparație cu titanul pur, deoarece hidrofilicitatea mare a nanotuburilor și numărul ponderat de sarcini negative de pe suprafață pot ajuta la împiedicarea atașării bacteriilor prin proprietatea de adsorbție a proteinelor nespecifice [46]. Astfel, importanța morfologiei suprafeței ar putea fi deja evidențiată cu acest prim nivel de modificare a suprafeței. Aici, proba TNT-40V este utilizată ca referință pentru a raporta rezultatele pentru filmele hibride.

Când nanostructurile de TiO<sub>2</sub> sunt acoperite cu fibre SF, inhibarea creșterii a continuat să crească ușor pentru ambele bacterii testate. Deși din literatură se știe deja că SF nu are proprietatea antimicrobiană [47], în studiul nostru s-a obținut o inhibare suplimentară a creșterii pentru probele acoperite cu TNT/SFef. Comparativ cu proba TNT-40V, rugozitatea suprafeței nu a variat, doar umectabilitatea a scăzut. Astfel, această modificare ar putea fi asociată chimiei suprafeței, datorită interacțiunii dintre grupurile funcționale încărcate ale fibroinei de mătase și suprafața celulei bacteriene.

Prezența nanoparticulelor de ZnO încapsulate duce la o inhibare a creșterii, proprietate care a îmbunătățit considerabil. Pentru cazul în care nZnO a fost fixat pe TNT-40V înainte de depunerea SF, rezultatele testului antimicrobian sunt foarte comparabile cu situația în care funcționalizarea acoperirii cu nZnO se face în același timp cu SF electrofilat. Nanoparticulele de ZnO și bacteriile au sarcini opuse, ceea ce are ca rezultat forțe electrostatice care face ca nanoparticulele să adere ferm la suprafața bacteriilor, dăunând astfel membranei lor celulare [48].

O observație interesantă este că în cazul utilizării polidopaminei ca strat intermediar pentru încorporarea nZnO, inhibarea creșterii a fost mai mare, până la 55 % și respectiv 53 %, pentru ambele microorganisme. Aceasta a fost o diferență așteptată având în vedere următoarele aspecte: 1) procentul de nZnO este superior în comparație cu celelalte două acoperiri 2) prezența polidopaminei modifică proprietățile suprafeței într-un mod mai pronunțat: chimia suprafeței, topografia și umectarea. Astfel, acest rezultat arată probabil un efect cumulativ.

**Tabelul 7.4. Efectul antibacterian pentru suprafețele de Ti modificate cu TNT, SF și nZnO.**

Probe	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TNT-40V	-	-
TNT/SFef	15	13
TNT/SFef-nZnO	41	39

TNT/nZnO/SFef	42	41
TNT/SFef/PD/nZnO	55	53

Acest studiu deschide calea pentru utilizarea structurilor nanoingineresti (nanotuburi) împreună cu caracteristicile naturale, netoxice ale fibroinei de mătase și polimerilor dopamină în acoperiri nanocompozite anticorozive și antibacteriene pentru modificarea suprafeței implanturilor metalice de titan.

## CAPITOLUL VIII. ACOPERIREA HIBRIDĂ A SUPRAFEȚEI TITANULUI CU NANOTUBURI TiO<sub>2</sub> REDUSE/ FIBROINĂ DE MĂTASE/ NZNO PENTRU UN EFECT ANTIBACTERIAN ÎMBUNĂTĂȚIT

Luând în considerare toate aspectele teoretice deja discutate, în studiul de față s-au obținut suprafețele TNTr2 (nanotuburilor reduse de TiO<sub>2</sub>), ce au fost comparate cu TNT-40V în ceea ce privește proprietățile de suprafață. Suprafețele nanostructurate Ti selectate au fost supuse depunerii de fibroină de mătase, folosind tehnica electrochimică, o problemă care nu este adesea abordată în literatură. Apoi, o nouă acoperire hibridă a fost obținută prin funcționalizarea filmului cu nanoparticule de ZnO terapeutic, ca agent antibacterian. Efectul antibacterian a fost evaluat împotriva *S. aureus* și *E. coli*, evidențiind corelația dintre proprietățile de suprafață ale suprafețelor TNTr2 modificate și nemodificate și activitatea antibacteriană.

### VIII.3.1. Electrodepunerea SF și SF-nZnO

Acoperirile biomimetice de fibroină au fost obținute, folosind electrodepunerea pe suprafețele modificate de Ti, o abordare care nu este adesea discutată în literatură, despre procesarea fibroinei.

### VIII.3.2. Analiza morfologiei și compoziției suprafețelor

Suprafețele de titan nanostructurate acoperite electrochimic cu filme de fibroină cu sau fără nanoparticule de ZnO au fost analizate morfologic prin analiza SEM. Aceste filme au fost depuse peste nanotuburi de TiO<sub>2</sub> sub formă de structură microporoasă, cu diametrele porilor de câteva sute de nanometri.

### VIII.3.3. Analiza FT-IR

Interacțiunile dintre SF și suprafața TNT-40V au fost detectate prin spectroscopie FTIR. S-a demonstrat că diferite forme cristaline de SF prezintă benzi de absorbție în diferite zone vibraționale legate de grupările amidice ale proteinei [49, 50]. Toate probele TNT-40V și TNTr2 modificate cu SF sau SF-nZnO prezintă vârfuri similare cu soluție de fibroină de mătase. Acest lucru confirmă faptul că SF a fost atașată eficient de suprafețele nanotuburilor de TiO<sub>2</sub>.

### VIII.3.4. Analiza umectabilității și topografiei suprafeței

Pentru nanotuburi de dioxid de titan (TNT-40V și TNTr2) unghiul de contact a fost de aproximativ 30°, indicând o suprafață hidrofilă, așa cum s-a observat deja în studii anterioare [4, 51]. Depunerea filmului de fibroină duce la valori mai mari ale unghiului de contact, care sunt induse de regiunile hidrofobe ale structurii fibroinei (foi cristaline) formate după tratarea cu metanol, așa cum s-a raportat deja [3, 4]. Cu toate acestea, probele au valori ale unghiului de contact mai mici de 65°, ceea ce indică faptul că au încă un caracter slab hidrofил.

### VIII.3.5. Caracterizare electrochimică

Probele au fost testate din punct de vedere ar stab

#### VIII.3.5.1. Analiza Tafel

Graficele Tafel sunt prezentate în Fig. 8.5. Toate probele modificate cu nanotuburi și fibroină de mătase, cu sau fără nanoparticule de ZnO, prezintă potențiale mai electropozitive decât substratul de Ti modificat cu TNT-40V și TNTr2. Probele TNT/SFech și TNT/SFech-nZnO au curenți de coroziune mai mici decât probele TNT-40V, dovedind astfel un caracter mai puțin susceptibil la coroziune.

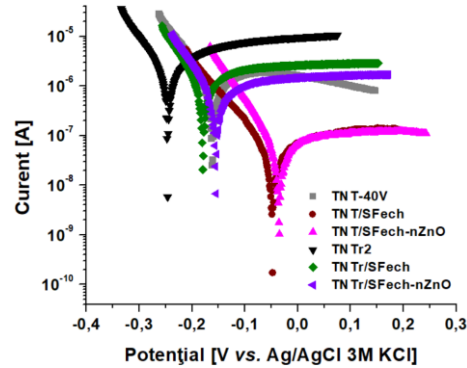


Fig. 8.5. Diagrama Tafel pentru probele de Ti modificate.

### VIII.3.5.2. Spectroscopie electrochimică de impedanță

În Fig. 8.6a sunt prezentate diagramele Nyquist corespunzătoare probelor cu suprafațe acoperite. Ca o primă observație, toate suprafețele modificate au rezistență mai mare și sunt mai stabile în comparație cu probele TNT-40V.

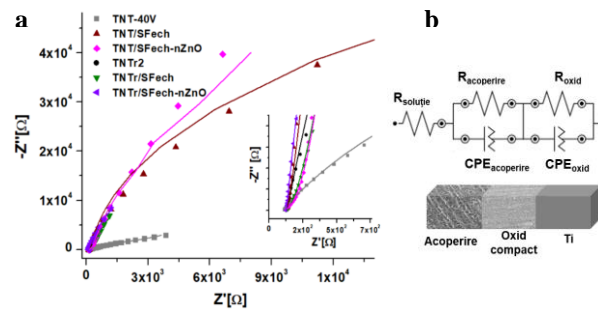


Fig. 8.6. a) Diagrama de impedanță pentru probele modificate și b) Circuitul utilizat pentru fitarea datelor EIS pentru probele acoperite.

### VIII.3.6. Activitate antibacteriană *in vitro*

Pentru studiul antibacterian au fost utilizate două tipuri diferite de bacterii patogene: *E. Coli* (gram negativ) și *S. aureus* (gram pozitiv).

Tabelul 8.5. Valorile obținute pentru UCF, efecte antibacteriene și constante de susceptibilitate.

Probe	CFU		R		Valoarea Z	
	[CFU/mL]		[%]		[mL/μg]	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Ti	648	770	C*	C	-	-
TNT-40V	578	601	12	21	-	-
TNTr2	472	543	27	29	-	-
TNT/SFech	458	488	29	36	-	-
TNTr/SFech	354	441	45	43	-	-
TNT/SFech-nZnO	255	275	61	64	0,01	0,009
TNTr/SFech-nZnO	165	203	75	74	0,013	0,012

\*C - Control

Se poate observa ca prin modificare proprietăților suprafeței cum ar fi chimia suprafeței, morfologia și rugozitatea, umectabilitatea, energia de suprafață și sarcina de suprafață și prezenței oxidului de zinc, are loc creșterea îmbunătățirea efectului antibacterian.

În concluzie, efectul antibacterian evaluat împotriva *S. aureus* și *E. coli* evidențiază importanța proprietăților suprafeței: (i) morfologia suprafeței după creșterea nanotuburilor, (ii) conductivitatea suprafeței și energia benzii interzise după reducerea nanotuburilor de TiO<sub>2</sub>, (iii) îmbunătățirea absorbției luminii vizibile ale suprafeței prin depunerea de SF și (iv) sarcina de suprafață și eliberarea ionilor de Zn<sup>2+</sup> după încorporarea nZnO.

Acest studiu a creat o noua acoperire hibridă biomimetică cu proprietăți antibacteriene îmbunătățite pentru implanturile de titan prin combinarea unor nanotuburi reduse de TiO<sub>2</sub> și a unui biopolimer, fibroină de mătase, care încapsulează nanoparticule de ZnO cu proprietăți terapeutice.

## **CAPITOLUL IX. CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE VIITOARE**

### **IX.1. CONCLUZII GENERALE**

Această lucrare are drept scop modificarea suprafețelor implantabile de titan, utilizate în aplicații biomedicale, precum înlocuirea sau susținerea țesutului osos. În vederea îmbunătățirii osteointegrării, suprafața titanului a fost modificată cu nanostructuri de TiO<sub>2</sub> și polimeri naturali. Cu ajutorul acestora s-a realizat înglobarea unor materiale cu efect antibacterian (amoxicilina, nanoparticule de ZnO), pentru eliberarea lor locală. Acestea sunt utilizate în industria medicală, în special, pentru a preveni infecțiile bacteriene.

Inițial, suprafața titanului a fost modificată cu doi biopolimeri, polidopamină și fibroină de mătase, prin autopolimerizare și, respectiv, electrodepunere. Aceștia au fost utilizați ca filme organice intermediare, pentru o mai bună legare a amoxicilinei.

- Imaginile SEM, au demonstrat că amoxicilina s-a legat bine pe suprafața de titan prin intermediul celor doi biopolimeri. Analiza FTIR a relevat interacțiuni  $\pi$ - $\pi$  mai puternice și legături de hidrogen între PD și Amx și o posibilă conjugare spontană a proteinei de mătase cu Amx.
- De asemenea, a fost evidențiată stabilitatea îmbunătățită a tuturor probelor modificate de titan, dezvăluind un comportament mai bun al probei modificate cu SF.
- Studiile de eliberare au arătat că fibroina și polidopamina pot greșa amoxicilina pe suprafața Ti și o pot elibera, conform modelului Korsmeyer-Peppas. Prin încărcarea amoxicilinei prin intermediul polidopaminei, antibioticul poate fi eliberat lent, pe o perioadă mai lungă de timp.
- Studiile antibacteriene împotriva *E. coli*, *S. mutans* și *L. fermentum* au arătat că această metodă de legare permite păstrarea efectului antibacterian al amoxicilinei pentru o perioadă lungă de timp. Ti/PD/Amx duce la cel mai mare efect de inhibiție împotriva tuturor celor trei microorganisme testate.

Ulterior, suprafețele de Ti au fost modificate cu structuri nanotubulare de TiO<sub>2</sub> nereduse și reduse, printr-un proces de anodizare, folosind diferiți parametri. Probele de Ti nanostructurate selectate au fost funcționalizate cu un compus activ, Amoxicilină. Suprafețele modificate cu Amx au fost caracterizate din punct de vedere al morfologiei, al umectabilității, al stabilității electrochimice și al eliberării de antibiotic.

- Analiza SEM a demonstrat că suprafața probelor de Ti a fost acoperită în întregime cu nanotuburi auto-organizate, cu diametre uniforme. Analiza FTIR a indicat faptul că Amx a fost încărcată pe suprafețele nanostructurate.
- Toate probele cu suprafețe modificate au o stabilitate electrochimică mai bună în comparație cu titanul netratat.
- Conform acestei investigații, Amx poate fi fixată pe suprafața Ti, folosind nanotuburi de TiO<sub>2</sub> nereduse și reduse. TNTr a demonstrat o performanță îmbunătățită în ceea ce privește eliberarea amoxicilinei în timp. Acest lucru face aceste materiale adecvate pentru aplicații de administrare locală a medicamentelor.

De asemenea suprafețele nanostructurate de  $\text{TiO}_2$  au fost acoperite cu SF/nZnO, prin electrofilare, folosind diferite metode pentru încorporarea nanoparticulelor de ZnO în filmul hibrid.

- Conform examinării SEM, TNT au prezentat morfologie și aranjare uniforme, cu pereți subțiri și diametre exterioare de circa 90 nm. Nanofibrele de fibroină de mătase au fost distribuite uniform pe suprafețele nanotubulare.
- Spectrele FT-IR au arătat peak-uri caracteristice, care demonstrează că suprafața nanostructurată a fost acoperită eficient cu fibroină. Analiza EDX a dovedit prezența nanoparticulelor de ZnO pe suprafața TNT modificată cu SF.
- Toate probele modificate au prezentat un caracter hidrofil.
- Conform testelor electrochimice, toate probele TNT modificate au un caracter pseudocapacitiv și sunt mai stabile decât TNT netratat, având un nivel de protecție împotriva coroziunii ridicat (peste 80%).
- Efectul antibacterian in vitro a fost testat împotriva *E. faecalis* și *S. aureus*. Nanoparticulele de ZnO încapsulate au provocat o inhibare a creșterii care a fost mult mai pronunțată. Inhibarea creșterii a fost mai mare pentru ambele microorganisme, atunci când polidopamina a fost folosită ca strat intermediar pentru încorporarea ZnO, ajungând până la 55% împotriva *E. faecalis* și 53% împotriva *S. aureus*.

În cele din urmă, suprafețele modificate de titan cu nanotuburi de  $\text{TiO}_2$  nereduse și reduse au fost acoperite cu SF/ZnO, prin metoda electrochimică. Fibroina de mătase, un polimer biomimetic obținut din coconii Bombyx Mori, a fost folosită ca matrice pentru încorporarea nanoparticulelor de ZnO.

- Analiza SEM a arătat că fibroina de mătase a fost depusă peste nanotuburi de  $\text{TiO}_2$  sub formă de structură microporoasă, cu diametrele porilor de câteva sute de nanometri.
- Spectrele FT-IR au arătat peak-uri caracteristice, care demonstrează că suprafața nanostructurată a fost acoperită eficient cu fibroină de mătase. Analiza EDX a dovedit prezența oxidului de zinc pe suprafețele nanostructurate.
- Rezultatele electrochimice arată o conductivitate de suprafață mai bună și o energie de bandă interzisă mai mică pentru suprafețele TNT în comparație cu TNT, care ar putea fi avantajoasă pentru îmbunătățirea activității suprafeței antimicrobiene.
- Efectul antibacterian evaluat împotriva *S. aureus* și *E. coli* evidențiază importanța proprietăților suprafeței: (i) morfologia suprafeței după creșterea nanotuburilor, (ii) conductivitatea suprafeței și energia benzii interzise după reducerea nanotuburilor de  $\text{TiO}_2$ , (iii) îmbunătățirea absorbției luminii vizibile ale suprafeței prin depunerea de SF și (iv) sarcina de suprafață și eliberarea ionilor de  $\text{Zn}^{2+}$  după încorporarea nZnO. Toate aceste proprietăți determină un efect antibacterian îmbunătățit.

Acest studiu deschide perspectiva utilizării structurilor nanoingineresti (nanotuburi) împreună cu caracteristicile naturale, netoxice ale polimerilor, fibroină de mătase și dopamină, în acoperiri nanocompozite anticorozive și antibacteriene pentru modificarea suprafeței implanturilor metalice de titan.

## IX.2. PERSPECTIVE VIITOARE

- Pentru toate suprafețele de titan modificate sunt necesare studii ulterioare ale interacțiunilor cu celulele umane pentru a obține informații detaliate despre biocompatibilitatea acestor noi suprafețe.
- Pentru probele cu nanotuburi reduse de  $\text{TiO}_2$  se vor face teste de stimulare electrică pentru a vedea dacă conductivitatea suprafeței influențează eliberarea agenților terapeutici, respectiv creșterea osteointegrării.
- Se vor face studii de eliberare pentru probele care conțin nanoparticule de ZnO.
- Se va realiza testarea stabilității electrochimice, respectiv cea a activității antibacteriene pentru un timp mai îndelungat.

### Bibliografie selectivă:

- [1]. C. Dumitriu, M. Popescu, G. Voicu, I. Demetrescu. Influence of Anodizing Potential on Titanium Dioxide Nanotubes Morphology. REVISTA DE CHIMIE. 2013;64(6):599-602.
- [2]. A.G. PĂUN.  $\text{TiO}_2$  SURFACES MODIFICATION FOR AMOXICILLIN RELEASE USED IN DENTAL IMPLANTOLOGY.

- [3]. A.G. Oлару, V. Butculescu, C. Dumitriu, N. Badea, S. Popescu, C. Ungureanu, C. Pirvu. Biopolymers as intermediate layers for amoxicillin grafting on antibacterial surface. *Surfaces and Interfaces*. 2022;33:102224.
- [4]. S. Popescu, M.-E. Zarif, C. Dumitriu, C. Ungureanu, C. Pirvu. Silk Fibroin-Based Hybrid Nanostructured Coatings for Titanium Implantable Surfaces Modification. *Coatings*. 2020;10(6):518.
- [5]. S. He, P. Zhou, L. Wang, X. Xiong, Y. Zhang, Y. Deng, S. Wei. Antibiotic-decorated titanium with enhanced antibacterial activity through adhesive polydopamine for dental/bone implant. *Journal of The Royal Society Interface*. 2014;11(95):20140169.
- [6]. C. Ungureanu, C. Dumitriu, S. Popescu, M. Enculescu, V. Tofan, M. Popescu, C. Pirvu. Enhancing antimicrobial activity of TiO<sub>2</sub>/Ti by torularhodin bioinspired surface modification. *Bioelectrochemistry*. 2016;107:14-24.
- [7]. S. Popescu, M.-E. Zarif, C. Dumitriu, C. Ungureanu, C. Pirvu. Silk Fibroin-Based Hybrid Nanostructured Coatings for Titanium Implantable Surfaces Modification. *Coatings*. 2020;10(518).
- [8]. M. Ferrari, F. Cirisano, M.C. Morán. Mammalian Cell Behavior on Hydrophobic Substrates: Influence of Surface Properties. *Colloids and Interfaces*. 2019;3(2):48.
- [9]. V.C. Anitha, J.-H. Lee, J. Lee, A. Narayan Banerjee, S. Woo Joo, B. Ki Min. Biofilm formation on a TiO<sub>2</sub>nanotube with controlled pore diameter and surface wettability. *Nanotechnology*. 2015;26(6):065102.
- [10]. M. Padhan, G. Paul, J. Bijwe. Roles of Size, Shape, Amount, and Functionalization of Nanoparticles of Titania in Controlling the Tribo-Performance of UHMWPE Composites. *Frontiers in Materials*. 2020;7.
- [11]. K. Križman, S. Novak, J. Kristl, G. Majdič, N. Drnovšek. Long-acting silk fibroin xerogel delivery systems for controlled release of estradiol. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;65:102701.
- [12]. N. ul Ain, I. Anis, F. Ahmed, M.R. Shah, S. Parveen, S. Faizi, S. Ahmed. Colorimetric detection of amoxicillin based on querecetagetin coated silver nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;265:617-24.
- [13]. E.P. Rebitski, G.P. Souza, S.A.A. Santana, S.B.C. Pergher, A.C.S. Alcântara. Bionanocomposites based on cationic and anionic layered clays as controlled release devices of amoxicillin. *Applied Clay Science*. 2019;173:35-45.
- [14]. S. Sharma, S. Bano, A.S. Ghosh, M. Mandal, H.W. Kim, T. Dey, S.C. Kundu. Silk fibroin nanoparticles support in vitro sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface. *Nanomedicine*. 2016;12(5):1193-204.
- [15]. H. Luo, C. Gu, W. Zheng, F. Dai, X. Wang, Z. Zheng. Facile synthesis of novel size-controlled antibacterial hybrid spheres using silver nanoparticles loaded with poly-dopamine spheres. *RSC Adv*. 2015;5:13470-7.
- [16]. R. Batul, M. Bhave, P. J. Mahon, A. Yu. Polydopamine Nanosphere with In-Situ Loaded Gentamicin and Its Antimicrobial Activity. *Molecules*. 2020;25(9).
- [17]. C. Fiorica, F.S. Palumbo, G. Pitarresi, G. Biscari, A. Martorana, C. Cala, C.M. Maida, G. Giammona. Ciprofloxacin releasing gellan gum/polydopamine based hydrogels with near infrared activated photothermal properties. *Int J Pharmaceut*. 2021;610.
- [18]. F.E. Ettadili, M. Azriouil, M. Matrouf, F. Laghrib, S. Saqrane, A. Farahi, M. Bakasse, S. Lahrich, M.A.E. Mhammedi. Electrochemical determination of ornidazole at silver electrode: analytical application in human blood. *Chemical Data Collections*. 2022;39:100850.
- [19]. Y. Kadri, E. Srasra, I. Bekri-Abbes, P. Herrasti. Facile and eco-friendly synthesis of polyaniline/ZnO composites for corrosion protection of AA-2024 aluminium alloy. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2021;893:115335.
- [20]. H.-Y. Wang, Y.-Q. Zhang, Z.-G. Wei. Excess acetone extraction in silk protein solution greatly accelerates the regeneration progress of silk fibroin for desalting and purification. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;146:588-95.
- [21]. Q. Fu, W. Jin, M. Feng, J. Li, J. Li, W. Li, Z. Yu. An intermediate poly-dopamine layer for alginate coating on high-purity magnesium to achieve corrosion mitigation. *Journal of Magnesium and Alloys*. 2021.
- [22]. M.J. Silvero C, D.M. Rocca, E.A. de la Villarmois, K. Fournier, A.E. Lanterna, M.F. Pérez, M.C. Becerra, J.C. Scaiano. Selective Photoinduced Antibacterial Activity of Amoxicillin-Coated Gold Nanoparticles: From One-Step Synthesis to in Vivo Cytocompatibility. *ACS Omega*. 2018;3(1):1220-30.
- [23]. Y.A. Lee, J. Lee, D.W. Kim, C.Y. Yoo, S.H. Park, J.J. Yoo, S. Kim, B. Kim, W.K. Cho, H. Yoon. Mussel-inspired surface functionalization of porous carbon nanosheets using polydopamine and Fe<sup>3+</sup>/tannic acid layers for high-performance electrochemical capacitors. *Journal of Materials Chemistry A*. 2017;5(48):25368-77.
- [24]. Q. Liu, B. Yu, W. Ye, F. Zhou. Highly selective uptake and release of charged molecules by pH-responsive polydopamine microcapsules. *Macromolecular bioscience*. 2011;11(9):1227-34.
- [25]. J. Yan, D. Xia, W. Zhou, Y. Li, P. Xiong, Q. Li, P. Wang, M. Li, Y. Zheng, Y. Cheng. pH-responsive silk fibroin-based CuO/Ag micro/nano coating endows polyetheretherketone with synergistic antibacterial ability, osteogenesis, and angiogenesis. *Acta Biomater*. 2020;115:220-34.



- [26]. X.Y. Qiao, R. Miller, E. Schneck, K. Sun. Influence of pH on the surface and foaming properties of aqueous silk fibroin solutions. *Soft Matter*. 2020;16(15):3695-704.
- [27]. Y. Ma, B.S.B. Canup, X. Tong, F. Dai, B. Xiao. Multi-Responsive Silk Fibroin-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *Front Chem*. 2020;8:585077-.
- [28]. I. Singh, G. Dhawan, S. Gupta, P. Kumar. Recent Advances in a Polydopamine-Mediated Antimicrobial Adhesion System. *Frontiers in Microbiology*. 2021;11.
- [29]. S. Popescu, C. Ungureanu, A.M. Albu, C. Pirvu. Poly(dopamine) assisted deposition of adherent PPy film on Ti substrate. *Prog Org Coat*. 2014;77(11):1890-900.
- [30]. Q.Q. Lei, Y.W. Zhang, W.N. Zhang, R.W. Li, N.J. Ao, H. Zhang. A synergy between dopamine and electrostatically bound bactericide in a poly (vinyl alcohol) hybrid hydrogel for treating infected wounds. *Carbohydr Polym*. 2021;272.
- [31]. S. Ghalei, H. Handa. A review on antibacterial silk fibroin-based biomaterials: current state and prospects. *Mater Today Chem*. 2022;23.
- [32]. S. Saha, K. Pramanik, A. Biswas. Silk fibroin coated TiO<sub>2</sub> nanotubes for improved osteogenic property of Ti6Al4V bone implants. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;105:109982.
- [33]. H. Mezzourh, S. Ben Moumen, M. Amjoud, D. Mezzane, Y. El Amraoui, B. Marbati, A. Lahmar, M. Jouiad, M. El Marssi. Effect of growth time on structural and surface properties of TiO<sub>2</sub> nanostructures deposited by single-step hydrothermal method. *Materials Today: Proceedings*. 2021.
- [34]. T. Tan, Q. Zhao, H. Kuwae, T. Ueno, P. Chen, Y. Tsutsumi, J. Mizuno, T. Hanawa, N. Wakabayashi. Surface properties and biocompatibility of sandblasted and acid-etched titanium–zirconium binary alloys with various compositions. *Dental Materials Journal*. 2022;advpub.
- [35]. V. Anitha, J.-H. Lee, J. Lee, A.N. Banerjee, S.W. Joo, B.K. Min. Biofilm formation on a TiO<sub>2</sub> nanotube with controlled pore diameter and surface wettability. *Nanotechnology*. 2015;26(6):065102.
- [36]. S. Genna, O. Giannini, S. Guarino, G.S. Ponticelli, F. Tagliaferri. Laser texturing of AISI 304 stainless steel: Experimental analysis and genetic algorithm optimisation to control the surface wettability. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. 2020;110:3005-22.
- [37]. D. Sun, K.F. Böhringer. Self-Cleaning: From Bio-Inspired Surface Modification to MEMS/Microfluidics System Integration. *Micromachines*. 2019;10(2):101.
- [38]. H. Kim, S.G. Kumbar, S.P. Nukavarapu. Biomaterial-directed cell behavior for tissue engineering. *Current opinion in biomedical engineering*. 2021;17.
- [39]. S.-H. Chiou, H.-C. Ho, H.-T. Liao, F.-Y. Tsai, C.-W. Tsao, Y.-J. Hsu, C.-H. Hsueh. Plasmonic gold nanoplates-decorated ZnO branched nanorods@TiO<sub>2</sub> nanorods heterostructure photoanode for efficient photoelectrochemical water splitting. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2023;443:114816.
- [40]. Q. Wang, J. Cai, G.V. Biesold-McGee, J. Huang, Y.H. Ng, H. Sun, J. Wang, Y. Lai, Z. Lin. Silk fibroin-derived nitrogen-doped carbon quantum dots anchored on TiO<sub>2</sub> nanotube arrays for heterogeneous photocatalytic degradation and water splitting. *Nano Energy*. 2020;78:105313.
- [41]. D. Yu, J. Wang, J. Tian, X. Xu, J. Dai, X. Wang. Preparation and characterization of TiO<sub>2</sub>/ZnO composite coating on carbon steel surface and its anticorrosive behavior in seawater. *Composites Part B: Engineering*. 2013;46:135-44.
- [42]. C. Zhang, J. Huffer, M. Sprik. Coupling of Surface Chemistry and Electric Double Layer at TiO<sub>2</sub> Electrochemical Interfaces. *J Phys Chem Lett*. 2019;10(14):3871-6.
- [43]. K.M. Thulasi, S.T. Manikkoth, A. Paravannoor, S. Palantavida, B.K. Vijayan. Supercapacitor electrodes based on modified titania nanotube arrays on flexible substrates. 2021;112(12):937-44.
- [44]. W. Bao, Y. Wu, Y. Xie, C. Yao. Fabrication and electrochemical performance of nickel oxide nanoparticles anchored titanium dioxide nanotube array hybrid electrode. *Functional Materials Letters*. 2020;13(04):2051017.
- [45]. R. Bogdanowicz, A. Dettlaff, F. Skiba, K. Trzcinski, M. Szkoda, M. Sobaszek, M. Ficek, B. Dec, L. Macewicz, K. Wyrębski, G. Pasciak, D. Geng, A. Ignaczak, J. Ryl. Enhanced Charge Storage Mechanism and Long-Term Cycling Stability in Diamondized Titania Nanocomposite Supercapacitors Operating in Aqueous Electrolytes. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2020;124(29):15698-712.
- [46]. Y. Lin, L. Zhang, Y. Yang, M. Yang, Q. Hong, K. Chang, J. Dai, L. Chen, C. Pan, Y. Hu, L. Quan, Y. Wei, S. Liu, Z. Yang. Loading Gentamicin and Zn<sup>2+</sup> on TiO<sub>2</sub> Nanotubes to Improve Anticoagulation, Endothelial Cell Growth, and Antibacterial Activities. *Stem Cells International*. 2021;2021:9993247.
- [47]. Ł. Mazurek, M. Szudzik, M. Rybka, M. Konop. Silk Fibroin Biomaterials and Their Beneficial Role in Skin Wound Healing. *Biomolecules*. 2022;12(12).
- [48]. S. Hussain, M. Khan, T.M.M. Sheikh, M.Z. Mumtaz, T.A. Chohan, S. Shamim, Y. Liu. Zinc Essentiality, Toxicity, and Its Bacterial Bioremediation: A Comprehensive Insight. *Front Microbiol*. 2022;13:900740.

- [49]. *H. Hong, O.J. Lee, Y.J. Lee, J. Lee, O. Ajiteru, H. Lee, Y. Suh, M. Sultan, S. Kim, C. Park.* Cytocompatibility of Modified Silk Fibroin with Glycidyl Methacrylate for Tissue Engineering and Biomedical Applications. *Biomolecules.* 2020;11:35.
- [50]. *M. Cestari, B.S. Caldas, D.P. Fonseca, R.B. Balbinot, D. Lazzarin-Bidóia, I. Otsuka, C.V. Nakamura, R. Borsali, E.C. Muniz.* Silk fibroin nanofibers containing chondroitin sulfate and silver sulfadiazine for wound healing treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2022;70:103221.
- [51]. *A.-M. Negrescu, V. Mitran, W. Draghicescu, S. Popescu, C. Pirvu, I. Ionascu, T. Soare, S. Uzun, S.M. Croitoru, A. Cimpean.* TiO<sub>2</sub> Nanotubes Functionalized with Icaritin for an Attenuated In Vitro Immune Response and Improved In Vivo Osseointegration. *Journal of Functional Biomaterials.* 2022;13(2):43.