



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.):
"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ
ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΥΔΡΟΞΥΔΡΑΤΗΤΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ
ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ Α.ΒΑΟΥ

Διπλωματούχου Μηχανικού Μεταλλείων-Μεταλλουργού Ε.Μ.Π

ΕΠΙΒΛΕΨΗ:

Α.ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2012



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.):
"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ
ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
ΥΔΡΟΞΥΔΡΑΤΗΤΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ
ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ Α.ΒΑΟΥ

Διπλωματούχου Μηχανικού Μεταλλείων-Μεταλλουργού Ε.Μ.Π.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Α. ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Λ. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Η. ΧΑΤΖΗΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2012

Σύνοψη

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του μηχανισμού και του τρόπου επίδρασης δύο διαφορετικών ειδών βιομορίων (χιτοζάνης και κολλαγόνου) στην εξουδετέρωση φωσφορικού οξέος με υδροξείδιο του ασβεστίου, παρουσία αργινίνης προς παραγωγή υδροξυαπατίτη, για χρήση στην παραγωγή εμφυτευμάτων συνθετικών οστών. Το υλικό παρασκευάστηκε με βάση συνταγή σύνθεσης υδροξυαπατίτη, που προσδιορίστηκε σε προηγούμενο ερευνητικό στάδιο. Τα οφέλη της συγκεκριμένης υβριδικής τεχνικής έγκεινται στην παραγωγή ελεγχόμενων δομών που προσεγγίζουν την δομή του βιοαπατίτη των οστών, με χρήση σχετικά απλών αντιδραστηρίων, στην ευκολότερη και οικονομικότερη παραγωγή προϊόντος σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, όπως η υδροθερμική και στην παραγωγή τελικού βιοσυμβατού προϊόντος.

Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε κατ' αρχήν, την μελέτη των χαρακτηριστικών των αρχικών χρησιμοποιούμενων αιωρημάτων φωσφορικού οξέος-βιομορίων ως προς το ιξώδες, και των παραγόμενων αιωρημάτων βιοαλάτων - βιομορίων ως προς το pH και την μεταβολή του κατά την αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη. Στην συνέχεια έγινε μελέτη του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης των τελικά παραγόμενων αιωρημάτων, ενώ μελετήθηκε και η μεταβολή του ζ-δυναμικού κατά την διάρκεια της αντίδρασης σε μία χαρακτηριστική περίπτωση. Για την μελέτη των παραγόμενων κατά την εξέλιξη της αντίδρασης προϊόντων, παρήχθησαν αιωρήματα ενδιάμεσων σταδίων της αντίδρασης παραγωγής βιοαλάτων από τα οποία προέκυψαν σκόνη για χαρακτηρισμό με τεχνικές FT-IR, XRD, Raman και TEM.

Η μελέτη του μηχανισμού αντίδρασης ορθοφωσφορικού οξέος και υδροξειδίου του ασβεστίου σε περιβάλλον βιομορίων, που έγινε στην παρούσα εργασία, προσανατολίστηκε στον καθορισμό των βασικών σταδίων της αντίδρασης και στην μελέτη της επίδρασης της γήρανσης στο τελικό παραγόμενο προϊόν, ενώ έγινε και προσπάθεια μελέτης της επίδρασης που είχε η παρουσία των διαφορετικών βιομορίων στις τελικές ιδιότητες του παραγόμενου υδροξυαπατίτη. Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκε η παραγωγή προϊόντων ναυοράβδων παρεμφερών διαστάσεων και άμορφου υλικού για κάθε εξεταζόμενη περίπτωση. Έγινε ανίχνευση δευτερευουσών ανθρακικών φάσεων, κατά προτίμηση στα δείγματα που συντέθηκαν παρουσία χιτοζάνης. Αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός υδροξυαπατίτη έχει ήδη προκύψει από την προσθήκη του 10% των συνολικών αντιδραστηρίων και δεν προέκυψαν ανιχνεύσιμες διαφοροποιήσεις στα προϊόντα, πριν και μετά την γήρανση. Παρατηρήθηκε ότι παρουσία κολλαγόνου και περίσσειας φωσφορικού οξέος, η ταχύτητα της αντίδρασης ήταν μεγαλύτερη και παρήγαγε για ίδιες παραμέτρους αντίδρασης μεγαλύτερους σε μέγεθος κρυστάλλους στο τελικό του προϊόν, σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Τέλος παρουσιάστηκαν ενδείξεις ύπαρξης πρόδρομων φάσεων σε κάποια από τα δείγματα.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια μελέτης του μηχανισμού της αντίδρασης σύνθεσης βιοάλατος υδροξυαπατίτη με την χρήση υβριδικής τεχνικής απλής χημικής καταβύθισης, παρουσία βιοπολυμερών η οποία οδηγεί στην παραγωγή κολλοειδούς αιωρήματος και όχι ιζήματος υδροξυαπατίτη-βιομορίων. Το βιοάλας αυτό παρασκευάζεται για να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή εμφυτευμάτων τεχνητών οστών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του μηχανισμού της αντίδρασης που ακολουθεί ο σχηματισμός βιοάλατος υδροξυαπατίτη από εξουδετέρωση υδροξειδίου του ασβεστίου με ορθοφωσφορικό οξύ, παρουσία βιομορίων χιτοζάνης ή κολλαγόνου σε περιβάλλον αργινίνης.

Στην σύγχρονη έρευνα, έχει χρησιμοποιηθεί ποικιλία μεθόδων για την σύνθεση βιοκεραμικών αλάτων υδροξυαπατίτη, που προσεγγίζει σε μορφολογία την δομή του φυσικού οστού. Από τις σύγχρονες μεθόδους της έρευνας, η τεχνική του sol-gel αποτελεί την πιο πολλά υποσχόμενη, καθώς σαν μέθοδος επιτρέπει τον έλεγχο των παραγόμενων δομών και δεν είναι απαραίτητη η χρήση ακριβών εξοπλισμών ή υψηλών θερμοκρασιών. Η βιομιμητική προσέγγιση στην παρασκευή των βιοαλάτων που ακολουθήθηκε στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, στοχεύει στην παραγωγή τελικού προϊόντος, που μιμείται καλύτερα τις ιδιότητες των οστών (δομή, αντοχές και βιοαποικοδομησιμότητα). Η χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι μια υβριδική τεχνική, που συνδυάζει την μέθοδο της χημικής καταβύθισης με την sol-gel, καθώς το τελικό παραγόμενο προϊόν που προκύπτει δεν είναι ιζήμα αλλά αιώρημα. Τα οφέλη της συγκεκριμένης υβριδικής τεχνικής έγκεινται, στην παραγωγή ελεγχόμενων δομών που προσεγγίζουν την δομή του βιοαπατίτη των οστών, με χρήση σχετικά απλών αντιδραστηρίων, στην ευκολότερη και οικονομικότερη παραγωγή προϊόντος σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, όπως η υδροθερμική και στην παραγωγή τελικού βιοσυμβατού προϊόντος.

Ο κύριος πειραματικός όγκος της παρούσας διπλωματικής περιλαμβάνει την παραγωγή αιωρημάτων υδροξυαπατίτη και στην συνέχεια σκονών παρασκευασμένων ώστε να αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσα στάδια της αντίδρασης, κατά τα οποία έχουν προστεθεί στο διάλυμα διάφορα ποσοστά των αντιδρώντων. Τα αιωρήματα και οι σκόνες παρήχθησαν σε συνδυασμό δύο διαφορετικών βιομορίων-υλικών αποτύπωσης (κολλαγόνο και χιτοζάνη), προκατεργασμένων στο αντιδρόν οξύ, και δύο διαφορετικών αναλογιών ιόντων των αντιδρώντων Ca/P στο τελικό διάλυμα (1/1 και 10/6), υπό συνθήκες περίσσειας και μη ιόντων φωσφορικού οξέος κατά την αντίδραση. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε περιβάλλον αργινίνης.

Τα αιωρήματα που παρήχθησαν μελετήθηκαν ως προς το pH και την μεταβολή του κατά την αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη, το ιζώδες και την επιφανειακή τάση των τελικών αιωρημάτων. Μελετήθηκε ακόμα η μεταβολή του ζ-δυναμικού κατά την διάρκεια της αντίδρασης, για την περίπτωση υδροξυαπατίτη που παρήχθη παρουσία χιτοζάνης υπό συνθήκες περίσσειας οξέος. Οι παραγόμενες σκόνες χαρακτηρίστηκαν με τεχνικές FT-IR, XRD, Raman και TEM. Στα αρχικά αιωρήματα

οξέων-βιομορίων, έγινε μελέτη της μεταβολής του ιξώδους και επιβεβαιώθηκε η σταθεροποίηση των αιωρημάτων μετά από δύο ώρες ανάδευσης.

Μετά από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, έγινε προσπάθεια καθορισμού της βασικής αλληλουχίας σταδίων της αντίδρασης και παρατήρησης του τρόπου με τον οποίο επιδρούν τα διαφορετικά βιομόρια στην σύνθεση του υδροξυαπατίτη. Στα πλαίσια της μελέτης του μηχανισμού της αντίδρασης, επιβεβαιώθηκε η παραγωγή προϊόντων νανοράβδων παρεμφερών διαστάσεων (από 53nm έως 17,5nm μήκος) για κάθε εξεταζόμενη περίπτωση. Ανιχνεύθηκαν δευτερεύουσες ανθρακικές φάσεις κατά προτίμηση στα δείγματα που συντέθηκαν παρουσία χιτοζάνης, αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός υδροξυαπατίτη έχει ξεκινήσει από την προσθήκη του 10% των συνολικών αντιδραστηρίων. Δεν προέκυψαν ανιχνεύσιμες διαφοροποιήσεις στα προϊόντα πριν και μετά την γήρανση. Το σύνολο των ανωτέρω στοιχείων μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση ακολουθεί, για κάθε μια από τις μελετώμενες τέσσερις περιπτώσεις, κοινό μηχανισμό. Ο μηχανισμός φάνηκε να επηρεάζεται από α) την ύπαρξη περίσσειας ή όχι οξέος (μεγαλύτεροι νανοράβδοι παράγονται παρουσία περίσσειας σε δείγματα παραγόμενα με ίδιο συνδυασμό βιομορίων), και β) από το είδος του βιομορίου - υλικού αποτύπωσης (καλύτερα κρυσταλλωμένο το προϊόν που παρήχθη παρουσία υδροξυαπατίτη, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα του XRD και TEM)

Abstract

Controlling the formation and structure of hydroxyapatite nanorods is vital for the achievement of a consistent product. This is especially difficult in bioinspired and biomimetic systems where, in addition to chemical reaction parameters, the process of the reaction may be influenced by the presence of biomolecules. For a better understanding of the reaction mechanism that takes place during the synthesis of hydroxyapatite in the presence of biomolecules such as L-Arginine, Collagen and Chitosan, four different cases of hydroxyapatite synthesis were investigated at intermediate stages during the reaction so that the presence of secondary or precursor phases could be determined and the process of the reaction revealed.

In the investigated systems the reaction between H_3PO_4 and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ took place in the presence of Collagen or Chitosan and L-Arginine for two different molar ratios of Ca^{2+}/P 1/1 and 10/6 in basic pH conditions and biomimetic temperature (40°). The resulting products after ageing were dried and characterized by Transmission Electron Microscopy, Fourier Transformation Infrared Spectroscopy, X-Ray Diffraction and Raman Spectroscopy. The analysis showed that in all cases, hydroxyapatite nanorods were produced from an early stage of the reaction and that no preliminary phases such as ACP and OCP were detected. Some results indicated the presence of carbonated salts and possibly calcium deficient apatite as secondary phases. This mechanism is common for all cases studied, though the presence of secondary phases was more clearly indicated in Hap-Chit and 10/6 Ca/P Molar ratio. The sample that demonstrated the best characteristics in terms of suspension stability and nanorod size without favoring the formation of secondary phases during its synthesis, was that of hydroxyapatite bioceramic produced in the presence of Collagen for molar ratio of Ca^{2+}/P 1/1.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	3
Εισαγωγή.....	4
Θεωρητικό Μέρος.....	6
Κεφάλαιο 1 Γενικά στοιχεία: Βιολικά.....	6
Κεφάλαιο 2 : Βιολικά με βάση τον Υδροξυαπατίτη.....	7
Κεφαλαιο 3 Τεχνικές παρασκευής Υδροξυαπατίτη για εφαρμογές σε Βιολικά.	9
3.1 Καταβύθιση (-Χημική εναπόθεση).....	10
3.2 Τεχνική Sol-Gel.....	10
3.3 Υδροθερμική Τεχνική.....	10
3.4 Τεχνική βιομιμητικής απόθεσης (Biomimetic deposition technique)	10
3.5 Τεχνική παραγωγής επικαλύψεων υδροξυαπατίτη με ηλεκτροπόθεση.....	11
Κεφάλαιο 4.Τεχνικές ελέγχου μορφολογίας και δομής (φάσης) σωματιδίων υδροξυαπατίτη.	11
4.1 Περιορισμός εύρους κατανομής μεγέθους σωματιδίων	12
4.2 Επίδραση στην μορφολογία παραγόμενων σωματιδίων μέσω εξωτερικών επιδράσεων	12
4.3 Επίδραση στο μέγεθος και την μορφολογία των παραγόμενων σωματιδίων υδροξυαπατίτη με προσθήκες κατά τον σχηματισμό (ή στο περιβάλλον κρυστάλλωσης)	14
Κεφάλαιο 5.Υβριδική υγρή μέθοδος παραγωγής υδροξυαπατίτη - Μέθοδοι Χαρακτηρισμού δειγμάτων και υλικά.....	20
5.1 Γενικά.....	20
5.2 Χρησιμοποιούμενα Βιομόρια.....	21
5.2.1 Αμινοξέα: Γενικά για τα αμινοξέα.....	21
5.2.2 Πρωτεΐνες: Γενικά για τις πρωτεΐνες.....	24
Κεφάλαιο 6.Μηχανισμοί αντίδρασης σε διαλύματα.	30
6.1 Βασικές έννοιες: Πυρήνωση και Κρυστάλλωση Αλάτων σε διαλύματα	30
6.2 Χημεία Διαλυμάτων-Αιωρήματα-Κολλοειδή αιωρήματα.....	31
6.2.1 Διάλυση στερεών σε υγρά	32
6.2.2 Μελέτη Αντιδράσεων σε διαλύματα.....	33
6.2.3 Μηχανισμοί δημιουργίας κρυστάλλων μέσα από διαλύματα.....	34
6.2.4 Φάσεις του Φωσφορικού Ασβεστίου	34
6.3 Σχηματισμός υδροξυαπατίτη με υγρές μεθόδους.....	36

6.3.1 Η απλή περίπτωση: καταβύθιση υδροξυαπατίτη μέσω απλής εξουδετέρωσης	40
6.3.2 Εναλλακτικές προσπάθειες παραγωγής υδροξυαπατίτη	42
6.3.3 Μηχανισμός βιοχημικού σχηματισμού υδροξυαπατίτη στα οστά	47
Πειραματικό Μέρος	48
Κεφάλαιο 1: Πειραματικής διαδικασίας	48
1.1 Διαδικασία παρασκευής του υλικού.....	48
1.2 Αντιδραστήρια και εξοπλισμός	49
1.3 Περιγραφή πειραματική διαδικασίας	49
1.4 Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών.....	52
1.4.1 Περιθλασιμετρία ακτίνων X (XRD).....	52
1.4.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR).....	54
1.4.3 Φασματοσκοπία Raman	56
1.4.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM).....	56
1.4.5 Μέτρηση ζ-δυναμικού (zeta potential)	57
1.4.6 Μετρήσεις Ιζώδους –Ιζωδόμετρο	58
Κεφάλαιο 2 : Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	59
2.1 Μελέτη αρχικών αιωρημάτων	59
2.1.1 Μελέτη μεταβολής ιζώδους	60
2.2 Μελέτη του αιωρήματος του παραγόμενου προϊόντος.....	69
2.2.1 Μελέτη μεταβολής ιζώδους	69
2.2.2 Μελέτη μεταβολής pH	70
2.2.3 Μετρήσεις ζ-δυναμικού	74
2.3 Μελέτη τελικού προϊόντος υπό μορφής σκόνης.....	76
2.3.1 Ταυτοποίηση φάσεων – Περιθλασιμετρία ακτίνων X	76
2.3.2 Ταυτοποίηση φάσεων- φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)	85
2.3.3 Ταυτοποίηση φάσεων-Φασματοσκοπία RAMAN.....	100
2.3.4 Μελέτη μορφολογίας παραγόμενων Δομών-Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διερχόμενης Δέσμης	115
Σχολιασμός αποτελεσμάτων-Συμπεράσματα.....	121

Πρόλογος

Η μεταπτυχιακή εργασία με θέμα «Μελέτη του μηχανισμού βιομιμητικής σύνθεσης υδροξυαπατίτη παρουσία βιομορίων», πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μεταλλογνωσίας του Τομέα Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012.

Επιβλέπουσα καθηγήτρια ήταν η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Αθηνά Τσετσέκου, ενώ στην τριμελή εξεταστική επιτροπή συμμετείχαν επιπλέον οι Επίκουρος καθηγητής κος Λ.Ζουμπουλάκης και Επίκουρος καθηγητής κος Η.Χατζηθεοδωρίδης.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κυρία Αθηνά Τσετσέκου για την επιστημονική κατεύθυνση, την υποστήριξη και την συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της εργασίας αυτής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κύριο Ηλία Χατζηθεοδωρίδη για την βοήθεια του στην εκπόνηση της εργασίας αυτής καθώς και τους κυρίους Μπούκο και Τσιούρβα του ερευνητικού κέντρου «Δημόκριτος» και τους Βιβή Οικονόμου και Ηλία Γεωργιόπουλο της ΕΚΕΠΥ για την συνεισφορά τους. Ειδικές ευχαριστίες οφείλω ακόμα στους Πέτρο Τσακίριδη και Πασχάλη Ουσταδάκη για την ανεκτίμητη βοήθεια τους στα τεχνικά θέματα που παρουσιάστηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας και στους Αυγούλη Σωκράτη, Βορρίτση Ελένη, Δήμητρα Ζαραφέτα και Σπύρο Μιχαλόπουλο για την φιλική τους υποστήριξη στην προσπάθεια μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα κυρία Μπρασινίκα Δέσποινα για την συνολική της βοήθεια και συνεργασία κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του μηχανισμού που διέπει τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη παρουσία επιλεγμένων βιομορίων. Η μελέτη αυτή στοχεύει στην καλύτερη κατανόηση των συνθηκών που επηρεάζουν το τελικό παραγόμενο προϊόν και το σύστημα, ώστε να γίνει δυνατός ο καλύτερος έλεγχος και η βελτιστοποίηση των παραμέτρων παραγωγής ενός σύνθετου βιοάλατος για χρήση στην παραγωγή ιατρικών εμφυτευμάτων.

Οι σύγχρονες απαιτήσεις καλούν για την δημιουργία μόνιμων, βιοσυμβατών και βιοενεργών εμφυτευμάτων με ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες με αποτέλεσμα η έρευνα να έχει στραφεί στην προσπάθεια παραγωγής υλικών με παρεμφερείς ιδιότητες και δομή με το οστό. Το φυσικό οστό είναι ένα σύνθετο υλικό το οποίο αποτελείται κατά 65-70% από ενανθρακωμένο απατίτη (βιοαπατίτη) και το υπόλοιπο από οργανικές ύλες, με κυριότερη το κολλαγόνο, και νερό. Η σύνθεση του οστού γίνεται δυνατή μέσω μιας περίπλοκης διαδικασίας σύνθεσης βιοαλάτων, η οποία μεταξύ άλλων περιλαμβάνει την συμμετοχή περισσότερων από 200 πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες δρουν άλλοτε ως παρεμποδιστές, πυρηνωτές ή δρουν σαν τύποι για την ανάπτυξη κρυστάλλων βιοαπατίτη πάνω στις ίνες του κολλαγόνου.

Η σύγχρονη έρευνα, μιμούμενη την φύση, έχει στραφεί στην παραγωγή βιοαλάτων υδροξυαπατίτη για ιατρικές εφαρμογές. Κατά την «βιομμητική» σύνθεση των βιοαλάτων, κάποιες από τις συνθήκες σύνθεσης προσεγγίζουν τις συνθήκες σύνθεσης των φυσικών οστών. Παράμετροι όπως το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία βιομορίων είναι μόνο μερικές από τις παραμέτρους που επηρεάζουν την σύνθεση βιοαλάτων των οστών. Σε ορισμένες έρευνες επιστρατεύονται ακόμα και κύτταρα, όπως οι οστεοβλάστες στην προσπάθεια μίμησης της φυσικής οστεοσύνθεσης. Σε τέτοια πολύπλοκα συστήματα, η ακριβής γνώση των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα είναι πρωτεύουσας σημασίας, καθώς η σύσταση, το μέγεθος και σχήμα, η δομή και ο προσανατολισμός των παραγόμενων κρυστάλλων είναι τα χαρακτηριστικά που δίνουν τις ιδιότητες στο τελικό προϊόν.

Η κρυστάλλωση πολύπλοκου και ελάχιστα διαλυτού απατίτη, εξελίσσεται μέσω κινητικά ελεγχόμενης σύνθεσης μετασταθών ενδιάμεσων προϊόντων. Σε *in vitro* μελέτες ο μηχανισμός της σύνθεσης του υδροξυαπατίτη περνάει μέσα από ποικιλία μετασταθών και ενδιάμεσων σταδίων μέχρι τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη. Η σύνθεση υδροξυαπατίτη σε περιβάλλον με υψηλές τιμές pH, ξεκινάει με παραγωγή άμορφου φωσφορικού ασβεστίου σε φωσφορικό οκτασβέστιο από το οποίο προκύπτει υδροξυαπατίτης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο μηχανισμός αντίδρασης υδροξειδίου του ασβεστίου με ορθοφωσφορικό οξύ παρουσία δύο ειδών βιομορίων, χιτοζάνης ή κολλαγόνου, σε περιβάλλον διαλύματος αμινοξέος αργινίνης. Η αντίδραση συμβαίνει «βιομμητικά» παρουσία βιομορίων όπως το κολλαγόνο και σε θερμοκρασίες που προσεγγίζουν αυτές του οργανισμού. Για κάθε συνδυασμό βιομορίων η αντίδραση μεταξύ οξέος και βάσης γίνεται με και χωρίς περίσσεια οξέος, ώστε να μελετηθεί πώς αλλάζει ο μηχανισμός της αντίδρασης συναρτήσει της περισσειας.

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η πειραματική παραγωγή αιωρημάτων και σκονών σύνθετου βιοκεραμικού υδροξυαπατίτη-βιομορίων από ενδιάμεσα στάδια

της αντίδρασης και της γήρανσης και ο χαρακτηρισμός τους με μεθόδους χαρακτηρισμού, ώστε να μελετηθεί ο μηχανισμός που ακολουθεί η αντίδραση παρουσία βιομορίων μέχρι τον σχηματισμό του τελικού υδροξυαπατίτη.

Η μελέτη που έγινε περιλάμβανε στα ακόλουθα:

1. Μελέτη ιξώδους πρόδρομων αιωρημάτων οξέος-βιομορίων
2. Μελέτη ιξώδους, ζ δυναμικού και pH στα τελικά αιωρήματα του υδροξυαπατίτη και κατά την διάρκεια της αντίδρασης.
3. Χαρακτηρισμός των δειγμάτων των παραγόμενων σκονών από τα ενδιάμεσα στάδια της αντίδρασης μέσω XRD, FT-IR, Raman και TEM
4. Μελέτη της μορφολογίας και των μεταβολών της μορφολογίας στην δομή των παραγόμενων νανοράβδων υδροξυαπατίτη, μεταξύ αρχικού και τελικού σταδίου της αντίδρασης.

Από άποψη δομής, η εργασία αυτή διαιρείται σε δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Το θεωρητικό μέρος περιλαμβάνει στοιχεία βιβλιογραφίας σχετικά με τεχνικές παραγωγής υδροξυαπατίτη, τις τεχνικές ελέγχου μορφολογίας και δομής υδροξυαπατίτη, τα χρησιμοποιούμενα βιομόρια, τις αρχές λειτουργίας των μεθόδων χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν και στοιχεία σχετικά με τον μηχανισμό αντίδρασης σε διαλύματα. Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε, του εξοπλισμού και των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν και γίνεται αναφορά στα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν. Τέλος, σε ξεχωριστή ενότητα γίνεται σχολιασμός των αποτελεσμάτων και εξαγωγή συμπερασμάτων.

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1 Γενικά στοιχεία: Βιολικά

Σαν **βιοϋλικά** ορίζονται **συνθετικά, μη φαρμακευτικά** υλικά τα οποία αλληλεπιδρούν με βιολογικά συστήματα και ο ρόλος τους είναι να υποκαθιστούν ή να δρουν ως πρόσθετα σε ιστούς, όργανα, ή λειτουργίες του σώματος. Ως βιοϋλικά χαρακτηρίζονται και τα τροποποιημένα φυσικά υλικά (μοσχεύματα). Αντίθετα, τα φυσικά υλικά που συναντώνται στους οργανισμούς καλούνται **βιολογικά υλικά**. [1]

Πριν παραχθεί ένα βιοϋλικό περνάει από μια διαδοχική αλληλουχία σταδίων, που περιλαμβάνει α) τον καθορισμό του προβλήματος το οποίο θα κληθεί το υλικό να λύσει (θεραπεία, αντικατάσταση οργάνου, αισθητικοί λόγοι) στην συνέχεια β) τον σχεδιασμό της συσκευής, σύνθεση των υλικών, έλεγχος των υλικών (Μηχανικές ιδιότητες, τοξικότητα, βιολογική απόκριση στο υλικό, αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες, με κύτταρα και ιστούς) κατασκευή υλικού, αποστείρωση του και τυποποίησή του, γ) τον έλεγχο της συσκευής (σε πειραματόζωα, in vitro) κλινικές μελέτες, κλινικές δοκιμές και δ) την παρακολούθηση της χρήσης για μεγάλο χρονικό διάστημα και κλινική χρήση. Τελικά η λειτουργία του υλικού μελετάται μετά από χρήση σε ασθενείς, για αστοχία. Τα διαδοχικά αυτά στάδια φτάνουν το υλικό από την αρχική ιδέα μέχρι την χρήση σε ασθενή.[1]

Διαφορετικά βιοϋλικά χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές εφαρμογές στο ανθρώπινο σώμα όπως καθετήρες, τεχνητοί βηματοδότες, τεχνητά εμφυτεύματα για το ισχίο ή το γόνατο. Ανάλογα με την εφαρμογή υλικά με διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ τους χρησιμοποιούνται για να καλύψουν διαφορετικές απαιτήσεις. Τέτοια υλικά, βιοσυμβατά, βιοαπορροφήσιμα ένθετα ή χειρουργικά μπορούν να είναι μέταλλα, κράματα, πολυμερή, γυαλί, άνθρακας, κεραμικά ή σύνθετα. Σε κάθε περίπτωση επιλέγεται υλικό το οποίο έχει μηχανικές, χημικές, βιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες με το υλικό που αντικαθιστούν.[2]

Ένα βιοϋλικό μετά από την τοποθέτησή του βρίσκεται συνεχώς σε επαφή με τους ιστούς του οργανισμού στον οποίο έχει εισαχθεί και επομένως τόσο η αντοχή του υλικού σε βάθος χρόνου όσο και οι ιδιότητες της διεπιφάνειας βιολογικού υλικού – ιστού, παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοσυμβατότητα του υλικού (απουσία αντίδρασης με τον οργανισμό και σχηματισμού φλεγμονής). Για τον λόγο αυτό είναι πολύ βασική η μελέτη της λειτουργίας των καρδιολογικών, οφθαλμολογικών, οδοντιατρικών και ορθοπεδικών εμφυτευμάτων σε βάθος χρόνου. [2]

Τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία εμφυτευμάτων οστών, έχουν αντιμετωπιστεί με ιδιαίτερη προσοχή κατά τις περασμένες δύο δεκαετίες. Ο λόγος είναι ο μεγάλος αριθμός ασθενών που χρειάστηκαν αντικατάσταση κάποιου οστού ή εγχείρηση για την επιδιόρθωση κατεστραμμένου οστού και τα μειονεκτήματα που παρουσιάστηκαν μετά τη χρήση ξένων ή διαφορετικών μοσχευμάτων. Από την χρήση των βιοϋλικών που εμφυτεύονται σαν μοσχεύματα στα οστά, προέκυψε ότι θα πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, παρόμοια με αυτά των φυσικών οστών, ώστε να θεωρηθεί επιτυχημένη η εφαρμογή τους, και πιο συγκεκριμένα θα πρέπει να είναι βιοσυμβατά και να εμφανίζουν καλή οστεογένεση. Θα πρέπει να μπορούν να συντελούν στη διαφοροποίηση των κυττάρων των οστών (osteoinductivity) και να

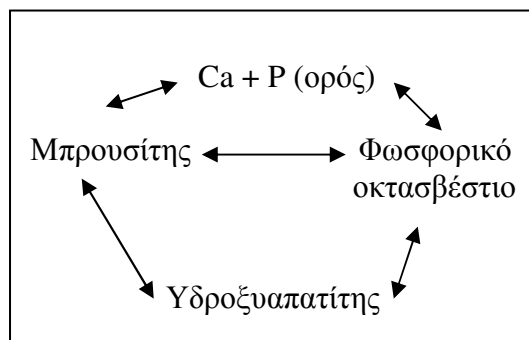
συνθέτουν επίσης τη βάση για τον περαιτέρω σχηματισμό του οστού (osteoconductivity). Επιπλέον ένα υλικό, που χρησιμοποιείται για εμφυτεύματα πρέπει να είναι μακροπορώδες (με πόρους > 100 μm σε μέγεθος), βιοαπορροφήσιμο και να έχει ικανοποιητική μηχανική σταθερότητα. Το ιδανικό βιοϋλικό θα πρέπει να συνδυάζει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά. [2]

Κεφάλαιο 2 : Βιολικά με βάση τον Υδροξυαπατίτη

Είναι κοινώς παραδεκτό ότι τα βιοϋλικά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ατελειών στα οστά πρέπει να μπορούν να παρέχουν όχι μόνο μηχανική ενίσχυση που χρειάζεται το καταπονημένο οστό, αλλά και να μπορούν να λάβουν ενεργά μέρος στην διαδικασία ανάπλασης του πραγματικού οστού. Αυτή η ιδιότητα στα συνθετικά οστά, καλείται βιοενεργότητα και περιλαμβάνει τον σχηματισμό επιφανειακού στρώματος υδροξυαπατίτη που θα προωθήσει ισχυρό δεσμό μεταξύ του φυσικού οστού και του εμφυτεύματος. Η βασική κατηγορία βιο-ενεργών υλικών που χρησιμοποιείται σε αυτές τις περιπτώσεις είναι τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου με την μορφή βιοκεραμικών, τσιμέντων ή επικαλύψεων.

Παραδοσιακά, τα βιοκεραμικά παράγονται μέσω κλασικής τεχνολογίας κεραμικών αν και βάσει των τελευταίων εξελίξεων χρησιμοποιείται η μέθοδος sol-gel, που έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον, λόγω της δυνατότητας που προσφέρει για παράλληλο έλεγχο σύνθεσης και μορφολογίας των παραγόμενων υλικών. Συμβατικά, οι σκόνες υδροξυαπατίτη παράγονται μέσα από υγρές μεθόδους καταβύθισης (wet precipitation methods) όπου φωσφορικά ιόντα και ιόντα ασβεστίου έρχονται σε επαφή και αντιδρούν σε υδατικό περιβάλλον κάτω από ελεγχόμενη θερμοκρασία και pH με ιδιαίτερη φροντίδα στην χημική ομοιογένεια του διαλύματος. [3]

Τα βιο-άλατα φωσφορικού ασβεστίου των οστών δεν αποτελούνται στην πραγματικότητα από υδροξυαπατίτη αλλά από ένα σύνθετο άλας με λόγο Ca/P= 1.5-1.7. Γενικά θεωρείται ότι ο υδροξυαπατίτης με λόγο Ca/P=1,67 είναι το βασικό συστατικό των οστών ενώ άλλα άλατα, όπως ο μπρουσίτης και το φωσφορικό οκτασβέστιο παίζουν επίσης βασικό ρόλο. Σύμφωνα με τον Munzenberg υπάρχει μια ισορροπία η οποία μπορεί απλά να γραφεί όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα: ενώσεις φωσφορικών αλάτων όπως το φωσφορικό τριασβέστιο δεν εμφανίζονται σε οστά στην φύση.



Εικόνα 1. Απεικόνιση ισορροπίας φωσφορικών αλάτων του οστού κατά Munzenberg[4]

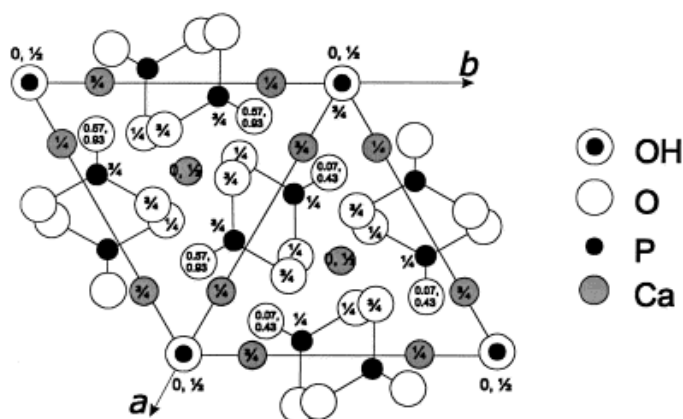
Ο υδροξυαπατίτης είναι ένα ορυκτό άλας με χημική δομή $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική για την κατασκευή εμφυτευμάτων λόγω της χημικής ομοιότητας που παρουσιάζει με τα συστατικά των σκληρών ιστών (δόντια, οστά).[5] Είναι το λιγότερο διαλυτό και πιο σταθερό άλας του ασβεστίου. Στα βιολογικά συστήματα δεν υπάρχει καθαρός υδροξυαπατίτης λόγω του ότι είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποφευχθεί η ισόμορφη υποκατάσταση των ιόντων στο πλέγμα του, η οποία και πραγματοποιείται ώστε να σταθεροποιηθεί στην εξαγωνική κρυσταλλική δομή. Τέτοιες υποκαταστάσεις ιόντων μπορούν να είναι υποκαταστάσεις των ιόντων Ca^{2+} από ιόντα Sr^{2+} , και του PO_4^{3-} από ιόντα CO_3^{2-} και SO_4^{2-} ενώ δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο σχηματισμού κενών πλεγματοκένων θέσεων στις θέσεις κάποιων ιόντων Ca^{2+} και OH^- . Τελικά η αναλογία ασβεστίου/φωσφόρου στον φυσικό υδροξυαπατίτη είναι 1,5 έναντι 1,67 που έχει ο συνθετικός υδροξυαπατίτης. [2][6]

Ο υδροξυαπατίτης είναι μια θερμικά ασταθής ένωση και αναλόγως της ακριβούς στοιχειομετρίας αποσυντίθεται σε θερμοκρασίες μεταξύ των 800° και 1200° . Ο πυκνός υδροξυαπατίτης γενικά δεν διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε περιβάλλοντα όπου ασκούνται μεγάλες πιέσεις και τριβές, παρουσιάζει όμως εξαιρετική βιοσυμβατότητα, σχηματίζοντας άμεσο δεσμό με σκληρούς ιστούς. Η εμφύτευσή σωματιδίων υδροξυαπατίτη ή πορωδών μερών σε οστά μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό νέων δικτυωτών πολυστρωμάτων οστών εντός 4 έως 8 εβδομάδων.[5]

Από άποψη αντοχής ο καθαρός υδροξυαπατίτης είναι σκληρό και εύθραυστο κεραμικό με μέτρο ελαστικότητας 130 GPa, τιμή μέγιστης παραμόρφωσης 0.001 και μέγιστη αντοχή 100 MPa. [5] Τα στοιχεία αυτά μεταβάλλονται όταν πρόκειται για βιοκεραμικό που συνδυάζεται με άλλα υλικά (κράματα, πολυμερή κ.α.)

Ο έλεγχος της μορφολογίας του υδροξυαπατίτη είναι σταθερή απαίτηση σε πολλές εφαρμογές. Ένας από τους λόγους που ο υδροξυαπατίτης έχει προταθεί σαν ένα υλικό με εν δυνάμει χρήση ως πληρωτικό είναι γιατί έχει την ικανότητα να απορροφά (absorb) πρωτεΐνες με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Ακόμα ένα σημαντικότατο όφελος των νανο-κρυστάλλων υδροξυαπατίτη (10-100 nm) είναι η ευθυγράμμιση τους κατά μήκος των ινών κολλαγόνου μέσα στο οστό και έτσι είναι δυνατή η απευθείας σύνδεση του με το υποκατάστατο του σκληρού ιστού, παρέχοντας τέλεια ταύτιση πλέγματος, μεταξύ της επιφάνειας του θραυσμένου οστού και του μοσχεύματος. Οι αντοχή και άλλες μηχανικές ιδιότητες του οστού εξαρτάται από τον προσανατολισμό των νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη και των ινών κολλαγόνου.[7]

Ο υδροξυαπατίτης είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο φωσφορικό άλας του ασβεστίου σε εφαρμογές βιοϋλικών καθώς είναι το πιο παρεμφερές με το φυσικό υδροξυαπατίτη των οστών, άλας. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραμέτρους πλέγματος του υδροξυαπατίτη ($a = 0.95$ nm, $c = 0.68$ nm) και την συμμετρία του (εξαγωνική, S.G. $P6_3/m$) πιθανότερος προσανατολισμός ανάπτυξης των μοναδιαίων κρυσταλλιτών είναι κατά μήκος του άξονα c. Αυτός ο προτιμητέος προσανατολισμός είναι κατά πάσαν πιθανότητα υπεύθυνος για την βελονοειδή μορφολογία. [8]



Εικόνα 2. Απεικόνιση κάτοψης μοναδιαίας κυψελίδας υδροξυαπατίτη



Εικόνα 3. Μικρογραφίες TEM ινών κολλαγόνου με κρυστάλλους υδροξυαπατίτη από ανθρώπινο οστό.[9]

Η μορφολογία αυτή των κρυστάλλων είναι πολύ βασική για τις τελικές ιδιότητες του οστού το οποίο ουσιαστικά είναι ένα σύνθετο βιο-κεραμικό με ίνες κολλαγόνου. Οι βελονοειδής νάνο-κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη (10-100 nm) ευθυγραμμίζονται τέλεια κατά μήκος των ινών κολλαγόνου μέσα στο οστό και το υλικό που προκύπτει παρουσιάζει ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες σε σχέση με το μεμονωμένο κεραμικό άλας του υδροξυαπατίτη.

Κεφάλαιο 3 Τεχνικές παρασκευής Υδροξυαπατίτη για εφαρμογές σε Βιολικά.

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες έχει υπάρξει σημαντική ερευνητική προσπάθεια για την σύνθεση βιοκεραμικών με ιδιαίτερη έμφαση στον υδροξυαπατίτη, οποίος βρίσκεται ποικίλες εφαρμογές κυρίως στην οδοντιατρική και την ορθοπεδική. Η σύνθεση του υδροξυαπατίτη μπορεί να γίνει με ποικιλία μεθόδων όπως μέσω καταβύθισης, sol-gel, υδροθερμικής μεθόδου, με βιομμητική απόθεση, με την τεχνική της ηλεκτραπόθεσης και άλλες.[10]

Οι βασικότερες μέθοδοι παραγωγής είναι:

3.1 Καταβύθιση (–Χημική εναπόθεση)

Η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του υδροξυαπατίτη είναι η καταβύθιση (wet, aqueous or chemical precipitation). Αυτή η μέθοδος προτάθηκε από τους Yagai Aoki σύμφωνα με τον Bouyer.[11] Οι χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες είναι υδροξείδιο του ασβεστίου και ορθοφωσφορικό οξύ με παραπροϊόντα της αντίδρασης μόνο νερό σύμφωνα με τα παρακάτω:



Η μορφή του παραγόμενου υδροξυαπατίτη εξαρτάται από τον ρυθμό προσθήκης του οξέος και την θερμοκρασία. Η ίδια μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί με διαφορετικά πρόδρομα συστατικά με απώτερο στόχο την ομογενή κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη σε διάλυμα κατάλληλου pH και θερμοκρασίας. Σε άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό αμμώνιο και υδροξείδιο του ασβεστίου $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Ca(OH)_2 άλλα και μεγάλη ποικιλία συνδυασμών ουσιών, που εν διαλύσει σε νερό δίνουν τα απαραίτητα φωσφορικά ιόντα και ιόντα ασβεστίου, σαν πρώτες ύλες για τον σχηματισμό άλατος υδροξυαπατίτη.

Κατά περίπτωση, τα προϊόντα που προκύπτουν μπορεί να διαφέρουν ως προς την μορφολογία ή το μέγεθος ανάλογα με την διαδικασία παρασκευής. Από την αντίδραση του νιτρικού ασβεστίου $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ με $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ παράγεται υδροξυαπατίτης του οποίου το μέγεθος κόκκων μπορεί να ρυθμιστεί με ελεγχόμενες μεταβολές θερμοκρασίας και χρόνου, ενώ για μεγέθη κόκκων μικρότερα των 100nm θέλει ανάμιξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ανάδευση για 24 ώρες. [12]

3.2 Τεχνική Sol-Gel

Η μέθοδος Sol-Gel είναι πολύ αποτελεσματική για την σύνθεση νανο-απατίτη, γιατί δίνει την δυνατότητα ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας. Έχει παρατηρηθεί ότι τα δείγματα υδροξυαπατίτη που παρήχθησαν με την διαδικασία του sol-gel είναι αποδοτικά στην βελτίωση της επαφής και της σταθερότητας στην διεπιφάνεια φυσικού-συνθετικού οστού, τόσο σε περιβάλλον in vitro αλλά και in vivo.

Για την σύνθεση υδροξυαπατίτη με χρήση sol-gel, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι συνδυασμού πρόδρομων υλικών-πηγών ασβεστίου και φωσφόρου. Και πάλι η χημική δραστηριότητα και η απαιτούμενη θερμοκρασία για τον σχηματισμό δομής απατίτη εξαρτάται κατά μεγάλο βαθμό από την φύση των πρόδρομων υλικών.

3.3 Υδροθερμική Τεχνική

Η υδροθερμική τεχνική είναι μια διεργασία που εκμεταλλεύεται αντιδράσεις απλές ή ετερογενούς φάσης σε υδατικό διάλυμα και σχετικά αυξημένες θερμοκρασίες ($T > 25^\circ \text{C}$) και πίεση ($P > 100 \text{kPa}$) για την κρυστάλλωση κεραμικών υλικών απευθείας από διάλυμα. Με την χρήση της τεχνικής σύνθεσης υδροξυαπατίτη με υδροθερμική κατεργασία ο λόγος Ca/P βελτιώνεται με την αύξηση είτε της υδροθερμικής πίεσης είτε της θερμοκρασίας.

3.4 Τεχνική βιομιμητικής απόθεσης (Biomimetic deposition technique)

Στην τεχνική αυτή, ένα μετασταθές συνθετικό σωματικό υγρό (SBF) με συνθετικό οργανικό άλας σύστασης παρεμφερούς με αυτήν του ανθρωπίνου οργανισμού, διευκολύνει την αυθόρμητη πυρήνωση και ανάπτυξη νανομεγέθους ανθρακούχου

(carbonated) υδροξυαπατίτη που «μιμείται» τον φυσικό υδροξυαπατίτη σε φυσιολογικό pH και θερμοκρασία. [10], [12]

Τα συνθετικά σωματικά υγρά προετοιμάζονται με βάση την χημική σύσταση των ανθρώπινων σωματικών υγρών, με συγκεντρώσεις ποικίλων ιόντων που είναι σχεδόν όμοιες με τα ανόργανα συστατικά του πλάσματος του ανθρώπινου αίματος. Τα μετασταθή συνθετικά σωματικά υγρά ενεργοποιούν την ανάπτυξη ανθρακούχου βιομιμητικού υδροξυαπατίτη σε ορθοπαιδικά βιοϋλικά καθώς και βιοϋλικά για χρήση σε οδοντιατρικές εφαρμογές όπως το πυρίτιο, η τιτανία και βιογυαλιά, σε φυσιολογικά pH και θερμοκρασίες. Ο σχηματισμός του στρώματος του απατίτη με βιομιμητική απόθεση σε διαφορετικά βιοϋλικά, έχει αποδειχτεί ότι προωθεί in vitro μηχανισμούς που οδηγούν στην δημιουργία ισχυρής πρόσδεσης με το οστό. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε, ότι προωθεί την in vitro κυτταρική διαφοροποίηση και ότι προκαλούσε οστεογεννητική κυτταρική διαφοροποίηση με αποτέλεσμα την δημιουργία ισχυρής σύνδεσης οστού και σύνθετης μήτρας.

Με την βιομιμητική αυτή μέθοδο, διάφορα πορώδη εμφυτεύματα μπορούν να επικαλυφθούν με ανθρακούχο υδροξυαπατίτη νανοδιαστάσεων με βύθιση τους σε διάλυμα συνθετικών σωματικών υγρών (SBF). Η φύση των επιστρώσεων υδροξυαπατίτη μπορεί να επηρεάσει την (osteogenicity) οστεογεννητική κυτταρική διαφοροποίηση της επικάλυψης καθώς και την διαδικασία επανασηματισμού του οστού μέσω της μικροδομής τους, του ρυθμού διάλυσης τους και των ειδικών αλληλεπιδράσεων τους με τα σωματικά υγρά. [10]

3.5 Τεχνική παραγωγής επικαλύψεων υδροξυαπατίτη με ηλεκτραπόθεση

Υπέρλεπτη, νανοφασική επικάλυψη υδροξυαπατίτη μπορεί να σχηματιστεί με ηλεκτραπόθεση από διαλύματα ηλεκτρολυτών που περιέχουν τα επιθυμητά ιόντα $[Ca^{2+}] = 6.1 \times 10^{-4} M$, $[PO_4^{3-}] = 3.6 \times 10^{-4} M$ σε φυσιολογικό pH. Σε μία περίπτωση σαν πρόδρομα διαλύματα (precursors) ηλεκτραπόθεσης χρησιμοποιήθηκαν $Ca(NO_3)_2$ και $NH_4H_2PO_4$ με προσθήκη $NaNO_3$ στο διάλυμα για την βελτίωση της ιοντικής ισχύος των ηλεκτρολυτών. Άλλη περίπτωση παραγωγής επικαλύψεων υδροξυαπατίτη έγινε μέσω εφαρμογής σταθερού ανοδικού δυναμικού (2-4 V) σε αλκαλικό ηλεκτρολύτη.

Κεφάλαιο 4. Τεχνικές ελέγχου μορφολογίας και δομής (φάσης) σωματιδίων υδροξυαπατίτη.

Ο υδροξυαπατίτης, λόγω της μεγάλης σημασίας του ως συστατικό των ανθρώπινων δοντιών και οστών, έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Μεγάλο μέρος της ερευνητικής προσπάθειας έχει επικεντρωθεί στην μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν το μέγεθος και το σχήμα των σχηματιζόμενων δομών υδροξυαπατίτη και η εκμετάλλευση της γνώσης αυτής, για την παραγωγή προϊόντων υδροξυαπατίτη επιθυμητής μορφολογίας.

Στις περιπτώσεις χρήσης συμβατικών μεθόδων παραγωγής υδροξυαπατίτη, όπως οι υγρές χημικές μέθοδοι που βασίζονται σε καταβύθιση-εναπόθεση αλάτων σε χαμηλές θερμοκρασίες, προκύπτουν, κατά κύριο λόγο, σκόνης με ακανόνιστη μορφολογία σωματιδίων. Η υδροθερμική μέθοδος, προτιμάται σε μεγάλο βαθμό για την παραγωγή

υλικών λόγω της ευκολίας που προσφέρει, παρουσιάζει όμως πολύ φτωχό έλεγχο μορφολογίας των παραγόμενων κόκκων υδροξυαπατίτη. [13] Αντίθετα άλλες μέθοδοι όπως η sol-gel επιτρέπουν καλύτερο έλεγχο της μορφολογίας των σωματιδίων που προκύπτουν γιατί δίνει την δυνατότητα καλύτερου ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας.[10] [12]

Γενικά υπάρχει ποικιλία προσεγγίσεων που μπορούν να ακολουθηθούν με σκοπό την ρύθμιση του μεγέθους, του εύρους και της μορφολογίας των παραγόμενων σωματιδίων των αλάτων υδροξυαπατίτη. Από την ρύθμιση παραμέτρων της παραγωγικής διαδικασίας οι οποίες διαφέρουν ανάλογα το σύστημα (θερμοκρασία, συγκέντρωση αντιδρώντων ανάδευση κλπ) - όπως στην περίπτωση παραγωγής υδροξυαπατίτη από νιτρικό ασβέστιο που προαναφέρθηκε στις υγρές μεθόδους- μέχρι την εισαγωγή νέων δομών, συστατικών ή εξωτερικών επιδράσεων στο σύστημα, η σύγχρονη έρευνα έχει στην διάθεση της μεγάλο εύρος επιλογών, για να οδηγηθεί στην επίτευξη τελικού προϊόντος με επιθυμητές διαστάσεις και μορφολογία.

4.1 Περιορισμός εύρους κατανομής μεγέθους σωματιδίων

Για να είναι δυνατός ο έλεγχος μεγέθους νανοδομών υπάρχουν πολλές διαφορετικές χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Αν υποθεθεί ότι το επιθυμητό μέγεθος σωματιδίων μπορεί να περιγραφεί από μια καμπύλη κατανομής μεγέθους σωματιδίων τότε η ευκολότερη μέθοδος περιορισμού του μεγέθους των σωματιδίων κατά την παραγωγή τους είναι να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη της καμπύλης προς μεγαλύτερα μεγέθη κόκκων εγκλωβίζοντας τα σωματίδια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με ανάπτυξη νανοσωματιδίων, τα οποία αναπτύσσονται μέσα σε νανοπορώδεις δομές ή αντικείμενα.

Μία άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει μια δυναμική διεργασία η οποία «διαβρώνει» την αριστερή πλευρά της βάσης της κορυφής της κατανομής με μεγάλη ταχύτητα ώστε η κατανομή διατηρείται στενή, παρά την διαδικασία συνένωσης σωματιδίων (coarsening process). Η πυρήνωση αλάτων από ισχυρώς υπερκορεσμένα διαλύματα (burst nucleation) αποτελεί μια τέτοια περίπτωση. Δυστυχώς στις περισσότερες περιπτώσεις διαδικασίες σαν αυτές έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την διεύρυνση της κατανομής των σωματιδίων μετά από την αρχική πυρήνωση. [14]

4.2 Επίδραση στην μορφολογία παραγόμενων σωματιδίων μέσω εξωτερικών επιδράσεων

Ερευνητικά, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ελέγχου της μορφής των παραγόμενων σωματιδίων, με την έκθεση των αντιδρώντων κατά την διάρκεια του σχηματισμού της νέας φάσης σε εξωτερικούς παράγοντες όπως μαγνητικό πεδίο και μικροκύματα.

4.2.1 Μαγνητικό πεδίο

Ο υδροξυαπατίτης, όταν βρεθεί σε ένα βιολογικό περιβάλλον, αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες, ώστε αυτές απορροφώνται λιγότερο ή περισσότερο στην επιφάνεια του, ανάλογα το κρυσταλλικό επίπεδο που βρίσκεται εκτεθειμένο στο περιβάλλον, ενώ διαφοροποιείται και η βιοσυμβατότητα του προϊόντος. Είναι ευνόητο λοιπόν ότι ο κρυσταλλικός προσανατολισμός είναι πολύ βασικό θέμα στην παρασκευή βιολογικών υδροξυαπατίτη.[15]

Έρευνες που έχουν γίνει πάνω στην κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη παρουσία μαγνητικού πεδίου, έδειξαν πως ευνοείται η κρυστάλλωση της φάσης του υδροξυαπατίτη, έναντι της πρόδρομης φάσης του μπρουσίτη, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις επίδρασης του στον προσανατολισμό των κρυστάλλων. Η κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη έγινε με γρήγη μέθοδο απλής διάχυσης (single diffusion technique) σε silica gel με την χρήση ως πηγές ασβεστίου και φωσφορικών ιόντων διαλυμάτων $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και Na_2HPO_4 . Το gel λειτούργησε σαν ιδανικό μέσο για την μελέτη της κρυστάλλωσης βιομορίων in vitro καθώς έχει την δυνατότητα να συγκρατεί τους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους στον δικό του προσανατολισμό. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο παρεμποδίζει τον σχηματισμό της φάσης του μπρουσίτη και ενισχύει τον σχηματισμό της φάσης του υδροξυαπατίτη. Κατά την διαδικασία πυρήνωσης η μαγνητική ανισοτροπία των πυρηνωμένων συστοιχιών μορίων γίνεται μεγαλύτερη από τα μεμονωμένα μόρια και οδηγεί στον προσανατολισμό των συστοιχιών των σωματιδίων, ενισχύοντας την διάταξη νάνο-κρυστάλλων στο μητρικό διάλυμα με βάση τον προσανατολισμό του μαγνητικού πεδίου. Ακόμα φάνηκε πως η εφαρμογή μαγνητικού πεδίου αύξησε τον συνολικό ρυθμό πυρήνωσης, την διάχυση και τον ρυθμό της αντίδρασης.[7]

Βιβλιογραφικά υπάρχουν αναφορές ότι με την εφαρμογή ισχυρού μαγνητικού πεδίου κατά την διάρκεια slip casting, μπορεί να ελέγχεται ο κρυσταλλικός προσανατολισμός του υδροξυαπατίτη, καθώς είναι δυνατή η παρασκευή δείγματος υψηλώς προσανατολισμένου υδροξυαπατίτη. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι οι άξονες a,b του υδροξυαπατίτη ευθυγραμμίζονται με την διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου. [15]

4.2.2 Μικροκύματα

Πρόσφατα για την παραγωγή ορισμένων τρισδιάστατων και δισδιάστατων νανο-δομών υδροξυαπατίτη από υδατικά διαλύματα πρόδρομων αλάτων κατάλληλων συγκεντρώσεων, χωρίς την παρουσία ουσιών που να λειτουργούν ως πρότυπα κρυστάλλωσης (template) αλλά με την παρουσία EDTA, έχει χρησιμοποιηθεί ακτινοβόληση με μικροκύματα. Σε σχέση με τις συμβατικές υγρές μεθόδους η σύνθεση με μικροκύματα έχει το πλεονέκτημα της πολύ μικρής διάρκειας, μικρό μεγέθους παραγόμενου προϊόντος, στενή κατανομή μεγέθους σωματιδίων και υψηλή καθαρότητα. Η θέρμανση με μικροκύματα είναι γρήγορη, απλή και αποτελεσματική μέθοδος για την παρασκευή ανόργανων νανο-υλικών. Παρ' όλο που η ακριβής φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικροκυμάτων και των αντιδρώντων κατά την σύνθεση του υλικού είναι ασαφής, είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ διηλεκτρικών υλικών και μικροκυμάτων οδηγεί σε διηλεκτρική θέρμανση. Ηλεκτρικά δίπολα παρόντα σε τέτοια υλικά αποκρίνονται στο εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Αυτός ο συνεχής επαναπροσανατολισμός δημιουργεί τριβή και πρόσκρουση η οποία παράγει θερμότητα μεταξύ των μορίων. Το σχήμα των λαμβανόμενων νανοκρυστάλλων μπορεί να προσομοιάζει από πεταλούδα (bow-shaped) ή λουλούδι μέχρι ράβδους με απλή προσαρμογή της τιμής pH του διαλύματος.[16]

4.3 Επίδραση στο μέγεθος και την μορφολογία των παραγόμενων σωματιδίων υδροξυαπατίτη με προσθήκες κατά τον σχηματισμό (ή στο περιβάλλον κρυστάλλωσης)

Εκτός από την επίδραση εξωτερικών παραγόντων κατά την κρυστάλλωση από υγρή φάση το μέγεθος και σχήμα των παραγομένων κόκκων υδροξυαπατίτη, μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες κατά την σύνθεση του άλατος όπως η παρουσία άλλων χημικών ουσιών μερικές από τις οποίες είναι κιτρικά, [17], φθόριο [18], επιφανειοδραστικές ουσίες, ή σύνθετες πολυμερείς ενώσεις όπως τα δένδριμερή.

Παρ' όλης της δυσκολίας ελέγχου της μικροδομής με τις παραδοσιακές μεθόδους, η ίδια η βιολογική διαδικασία μας δίνει στοιχεία για τον καλύτερο έλεγχο της κρυστάλλωσης και ανάπτυξης του υδροξυαπατίτη. Η ύπαρξη βιολογικών μακρομορίων όπως το στεατικό οξύ, οι μονοσακχαρίτες και άλλα αντίστοιχα βιομόρια έχουν μελετηθεί ως προς την επίδραση τους στις παραγόμενες δομές υδροξυαπατίτη.[13] Οι ερευνητικές προσπάθειες ανάπτυξης δομών που προσεγγίζουν αυτές του οστού δεν έχουν περιοριστεί στην χρήση βιομορίων αλλά έχουν επεκταθεί και στην χρήση συνθετικών πολυμερών για την ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων όσο και την προσομοίωση της βιομιμητικής σύνθεσης των πρωτεϊνών.

Η επίδραση των οργανικών ενώσεων στην κρυστάλλωση του πλέγματος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν χοντρικά σε μία από τις ακόλουθες περιπτώσεις:

- Ανάπτυξη κρυστάλλων υπό την επίδραση του μακρομορίου ως πλαίσιο-υλικό αποτύπωσης κατά την κρυστάλλωση του άλατος, με ταυτόχρονο εγκλεισμό μικρών οργανικών μορίων εντός του κρυσταλλικού πλέγματος του αναπτυσσόμενου κρυστάλλου. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι πολύ εξειδικευμένες επειδή το μόριο-προσθήκη πρέπει να έχει κατάλληλες διαστάσεις ώστε να χωράει εντός του πλέγματος του κρυστάλλου-ξενιστή.
- Επίδραση επιλεκτικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων εύκαμπτων, ισχυρά φορτισμένων οργανικών ενώσεων οι οποίες μπορεί να είναι μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους ή επιφανειοδραστικές ουσίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με τους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους του άλατος. Σε διαλύματα υψηλών συγκεντρώσεων επιφανειοδραστικών ουσιών η αυτό-οργάνωση των οργανικών μορίων ξεκινάει από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κρυστάλλων και επιφανειοδραστικών ουσιών και για τον λόγο αυτό επηρεάζουν με τον ίδιο τρόπο αλλά εντονότερα την ανάπτυξη των αλάτων.
- Μεγάλης εξειδίκευσης αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν σαν αποτέλεσμα δομικής και στερεοχημικής ταύτισης μεταξύ των ιονικών δομών των επιπέδων του άλατος και άκαμπτων μικρών μορίων ή μακρομορίων με μερική διαμόρφωση σε β-φύλλα (όπως κάποιες πρωτεΐνες και πολυηλεκτρολύτες)

4.3.1 Επιφανειοδραστικές ουσίες

Οι Επιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούνται από ένα υδρόφιλο (ιοντική ή πολική ομάδα) και ένα υδρόφοβο μέρος (ουρά). Από την φύση τους αυτά τα συστατικά

παρουσιάζουν καθορισμένη συμπεριφορά σε υδατικά διαλύματα και αλληλεπιδρούν με τις διεπιφάνειες στερεού-υγρού με συγκεκριμένο τρόπο. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οι επιφανειοδραστικές ουσίες προσροφούνται σε πολλές διαφορετικές διεπιφάνειες, μειώνοντας την ελεύθερη τους ενέργεια κατά την διαδικασία αυτή. Σε διαλύματα υψηλότερης συγκέντρωσης επιφανειοδραστικής ουσίας, όπου όλες οι ελεύθερες διεπιφάνειες έχουν συμπληρωθεί, τα μόρια των επιφανειοδραστικών ουσιών αυτό-οργανώνονται σε υπερμοριακά συσσωματώματα συσσωματώματα (aggregates) τα οποία μπορούν να είναι υγροί κρύσταλλοι, μικύλλια (micelles) ή και άλλες δομές. Το είδος των συσσωματωμάτων που θα παραχθούν σε κάθε περίπτωση θα εξαρτηθεί από την δομή των επιφανειοδραστικών ουσιών, την συγκέντρωσή τους στο διάλυμα και άλλων πειραματικών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία. Ο σχηματισμός των υπερμοριακών συσσωματωμάτων έχει σαν αποτέλεσμα την απότομη αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του αρχικού διαλύματος. Η μεγάλη ποικιλία επιφανειοδραστικών ουσιών τις καθιστά ιδανικά μοντέλα για την συστηματική μελέτη της επίδρασης οργανικών μορίων στον σχηματισμό και μετασχηματισμό ιοντικών κρυστάλλων.

Έχει παρατηρηθεί ότι ο μηχανισμός της κινητικής, των μορφολογικών μεταβολών και των μετασχηματισμών φάσεων σε πολύπλοκα συστήματα στα οποία λαμβάνουν μέρος οργανικά μόρια, είναι η προσρόφηση των προσθηκών πάνω στην διεπιφάνεια διαλύματος και σχηματιζόμενου κρυστάλλου άλατος χαμηλής διαλυτότητας. Για μικρά μόρια και μακρομόρια, η προσροφητικότητα μιας επιφανειοδραστικής ουσίας εξαρτάται από την μοριακή τους δομή, στην κρυσταλλική δομή της αναπτυσσόμενης φάσης και στο ηλεκτροκινητικό φορτίο των διεπιφανειών.

Κατά την ανάπτυξη αλάτων, η επίδραση των επιφανειοδραστικών ουσιών σχετίζεται με την δυνατότητα τους για προσρόφηση και επομένως εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την συγκέντρωσή τους στο διάλυμα. Για χαμηλές συγκεντρώσεις του πρόσθετου, η προσρόφηση των μικρών σε μέγεθος μορίων επιφανειοδραστικής ουσίας, με μονό ενεργό άκρο στην διεπιφάνεια αναπτυσσόμενου κρυστάλλου, είναι χαμηλή και επομένως η τελική μορφολογία του κρυστάλλου που προκύπτει επηρεάζεται από ελάχιστα έως καθόλου. Για επιφανειοδραστικές ουσίες ασυμμετρικών διπλών αλυσίδων οι αλλαγές στην μορφή του αναπτυσσόμενου κρυστάλλου, γίνονται πιο σύντομα και ξεκάθαρα αντιληπτές, δίνοντας λεπτότερους και πιο επιμηκυμένους κρυστάλλους με ενδείξεις προτιμητέας προσρόφησης των ελεύθερων θέσεων των επιφανειοδραστικών μορίων στα $\{101\}$ και $\{010\}$. Το ίδιο μορφολογικό αποτέλεσμα φαίνεται να παρουσιάζει και η προσθήκη αυξημένης συγκέντρωσης των προσθέτων στο αρχικό διάλυμα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η επίδραση στην μορφολογία οφείλεται κυρίως σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δεσμών των επιφανειοδραστικών ουσιών, με προεξέχοντα από την κρυσταλλική δομή ιόντα ασβεστίου καθώς και την αλληλεπίδραση των ανιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών με τα επιφανειακά προσροφημένα ιόντα ασβεστίου. [19]

4.3.2 Μικρού μοριακού βάρους οργανικά μόρια

Η επίδραση που έχουν οι οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους στην πυρήνωση αλάτων χαμηλής διαλυτότητας δεν είναι ευδιάκριτη, καθώς, τα στοιχεία που υπάρχουν δεν είναι εμπεριστατωμένα, λόγω της έμφυτης δυσκολίας διαχωρισμού μεταξύ πυρήνωσης και ανάπτυξης με τις σύγχρονες τεχνικές χαρακτηρισμού. Η

δυσκολία γίνεται πιο μεγάλη, όταν υπάρχει ανάγκη μελέτης συστημάτων που μπορούν να σχηματίσουν διαφορετικά κρυσταλλικά προϊόντα (πολύμορφα) ή ένυδρες ενώσεις (crystal hydrates) με παρεμφερείς διαλυτότητες αλλά διαφορετικές κινητικές κρυστάλλωσης και επομένως η σειρά εμφάνισης τους από υπερκορεσμένα διαλύματα είναι δυνατόν να επηρεαστεί από την προσθήκη προσθέτων. Αν η επίδραση των μορίων στην πυρήνωση είναι τύπου ανάπτυξης των αλάτων σε μακρομόριο-πλαίσιο θα πρέπει να είναι πολύ εξειδικευμένη. Ένδειξη της επίδρασης που έχει η ύπαρξη αμινοξέων στην πυρήνωση κρυσταλλικών αλάτων, μπορεί να βρεθεί στην βιβλιογραφία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (2.5-5 ppm) η κρυστάλλωση αλάτων όπως το οξαλικό ασβέστιο βελτιώνεται ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται καθυστέρηση της κρυστάλλωσης.

Όσον αφορά την κρυσταλλική ανάπτυξη, οι αλλαγές στην μορφολογία των αναπτυσσόμενων κρυστάλλων οφείλονται στην αναγνώριση από τα πρόσθετα συγκεκριμένων κρυσταλλικών επιπέδων και αποτελούν άλλο ένα εργαλείο για την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των οργανικών μορίων και των αναπτυσσόμενων ανόργανων αλάτων. Έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση των μονο-λειτουργικών οργανικών μορίων στην μορφολογία και ανάπτυξη αλάτων του ασβεστίου αυξάνεται όσο αυξάνεται το συνολικό αρνητικό φορτίο. Μερικοί παράγοντες που έχουν επιπρόσθετη σημασία στην περίπτωση πολύ-λειτουργικών μορίων είναι η απόσταση μεταξύ των δεσμών και η διαμόρφωση των μορίων.

Η μελέτη της επίδρασης αμινοξέων όπως το ασπαρτικό και το γλουταμινικό οξύ (Asp, Glu) με μονό αρνητικό φορτίο στην περιοχή φυσιολογικού pH (5-7) και απλών δικαρβοξυλικών οξέων, έδειξαν ότι δεν επηρεάζεται η μορφολογία ανάπτυξης κρυστάλλων DCPD κατά την σύνθεση τους μέσω υγρής μεθόδου. Αντίθετα, εύκαμπτα, ισχυρά φορτισμένα μόρια όπως τα μόρια του μαλεϊκού οξέος προσροφώνται ισχυρά σε επιλεκτικά επίπεδα του πλέγματος, οδηγώντας στον σχηματισμό βελόνων αντί για πλακίδια που είναι η συνήθης ανάπτυξη.

Στην περίπτωση ύπαρξης άκαμπτων μορίων των ενώσεων του φυτικού οξέος σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, παρατηρήθηκε προσρόφηση τους στα επίπεδα (010) επηρεάζοντας το μέγεθος των αναπτυσσόμενων κρυστάλλων κατά την διαδικασία. Γενικά έχει σχολιαστεί ότι η ύπαρξη HO-(COOH)₂ ομάδων σε οργανικά μόρια, έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση με τις αναπτυσσόμενες επιφάνειες των κρυστάλλων. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί είτε ως οφειλόμενη σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες ενισχύονται με την πόλωση των μορίων από την OH- ομάδα είτε στο ότι η ύπαρξη OH- δίπλα σε καρβοξυλομάδα ενισχύει την προσρόφηση μέσω του σχηματισμού επιπρόσθετου δεσμού υδρογόνου.[19]

4.3.3 Μεγάλου μεγέθους οργανικά μόρια

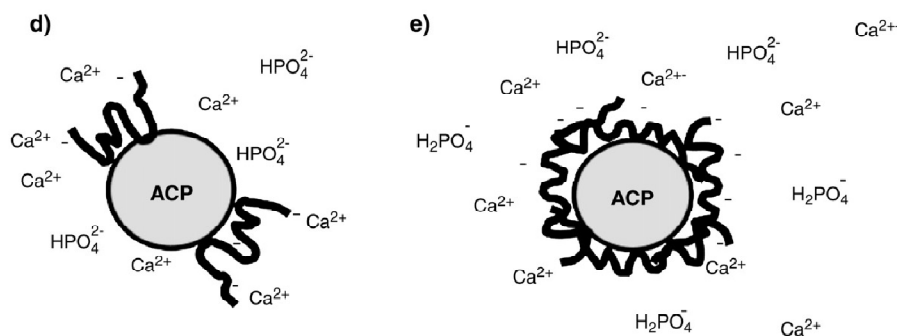
Από έρευνες που έγιναν “in vitro” στις οποίες οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν με, αλλά και χωρίς, την παρουσία όξινων μακρομορίων, απομονωμένων από βιολογικούς ιστούς, επιβεβαιώθηκε ότι τα μακρομόρια όχι μόνο ασκούν ακριβή έλεγχο πάνω στο μέγεθος, σχήμα και προσανατολισμό των παραγομένων κρυστάλλων, αλλά ακόμα ότι επιλεκτικά εγκλείσματα κατά μήκος συγκεκριμένων κρυσταλλικών επιπέδων μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό διαφορετικών κρυσταλλικών υφών σε διαφορετικούς οργανισμούς. Λόγω του πλεονάσματος καρβοξυλικών ομάδων μέσα στους ιστούς, οι μελέτες ξεκίνησαν με σκοπό τον έλεγχο των διαδικασιών ανάπτυξης

με απλούστερα πολυμερή όπως οι πολυηλεκτρολύτες για να μπορέσουν να ελέγξουν την κρυστάλλωση.

Γενικά παρατηρήθηκε ότι τα μακρομόρια με μερική διαμόρφωση σε φύλλα β αναγνωρίζουν κρυσταλλικά επίπεδα με μεγαλύτερη εξειδίκευση, λόγω της στερεοχημικής αντιστοιχίας των αποστάσεων μεταξύ των ανιοντικών λειτουργικών ομάδων των μακρομοριακών δομών και των σφαιρών ιόντων του ασβεστίου που προεξέχουν από τα επηρεαζόμενα επίπεδα.

Σαν παράδειγμα αναφέρεται η επίδραση του pAsp (πολύ - ασπαρτικό οξύ), η οποία παρουσιάζει μερική διαμόρφωση σε φύλλα β, στους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους φωσφορικού οκτασβεστίου (OCP) και ένυδρο φωσφορικό διασβεστίο (DCPD). Και τα δύο άλατα του φωσφορικού ασβεστίου κρυσταλλώνονται στην μορφή πλακιδίων με κύρια κρυσταλλικά επίπεδα τα (100) και (010) αντίστοιχα, ενώ κατά την διάρκεια της κρυστάλλωσης τα αναπτυσσόμενα άλατα είναι καλυμμένα από συνεχή στρώματα μορίων νερού (hydration layers). Η προσθήκη δεν επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο την αναπτυσσόμενη μορφολογία των δύο αλάτων. Οι κρύσταλλοι του OCP αναπτύσσονται μεγαλύτεροι και πιο λεπτοί απ' ότι αναπτύχθηκαν στα δείγματα χωρίς την προσθήκη προσθέτου, ενώ οι κρύσταλλοι DCPD παρουσίασαν δομή διαγραμμισμένου φύλλου. Τα διαφορετικά αποτελέσματα εξηγούνται μέσα από στερεοχημικές παρατηρήσεις, καθώς οι αποστάσεις ανάμεσα σε γειτονικές καρβοξυλομάδες στην pAsp συμπίπτουν με αυτές του (100) κρυσταλλικού επιπέδου του φωσφορικού οκτασβεστίου ενώ δεν συμπίπτουν με τα επίπεδα (010) του DCPD.

Ο ρόλος των πολυμερών στον έλεγχο της κρυστάλλωσης μπορεί να είναι είτε προωθητικός ως προς την κρυστάλλωση, είτε επιβραδυντικός. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα μόρια προσθέτων σε διαλύματα μπορεί να συμπεριφερθούν σαν κέντρα ετερογενούς πυρήνωσης ενώ όταν η συγκέντρωση του προσθέτου αυξηθεί, τα ίδια μόρια μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη εκκολαπτόμενων πυρήνων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι πολυηλεκτρολύτες και πρωτεΐνες σε διαλύματα δρουν σαν παρεμποδιστές αλλά όταν «σταθούν» πάνω στις επιφάνειες μπορεί να προωθήσουν την ανάπτυξη αλάτων. Η διττή δυνατότητα των οργανικών πολυηλεκτρολυτών έγινε ορατή και κατά την ανάπτυξη άμορφου φωσφορικού ασβεστίου από διάλυμα παρουσία ηλεκτρολυτών. Η ύπαρξη πολυηλεκτρολύτη σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκάλεσε και σε υψηλές συγκεντρώσεις παρεμπόδισε τον μετασχηματισμό φάσης. Η αποτελεσματικότητα της παρεμπόδισης ή ενίσχυσης του μετασχηματισμού βρέθηκε να εξαρτάται από το είδος και το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Η επίδραση εξηγείται μέσω διαφοροποίησης στον τρόπο με τον οποίο συμβαίνει προσρόφηση των πολυηλεκτρολυτών στην διεπιφάνεια άμορφου φωσφορικού ασβεστίου και υγρού.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της διττής συμπεριφοράς ενός πολύ-ηλεκτρολύτη όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση d) και σε υψηλή συγκέντρωση e) όπου ο πολύ-ηλεκτρολύτης λειτουργεί σαν παράγοντας διευκόλυνσης και σαν παρεμποδιστής της ανάπτυξης των κρυστάλλων του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου[19]

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τα μόρια των πολυμερών προσροφώνται σε τυχαία διάρθρωση και η διαδικασία είναι αντιστρεπτή. Σαν αποτέλεσμα η συσσωμάτωση των κρυσταλλιτών του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου καθυστερεί και ένας μεγάλος αριθμός ισχυρά φορτισμένα, μικρού μεγέθους σωματίδια σχηματίζονται, στα οποία συγκεντρώνονται αντίθετα φορτισμένα ιόντα Ca^{2+} ή HPO_4^{2-} . Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται με αποτελεσματικό τρόπο κέντρα πυρήνωσης της κρυσταλλικής φάσης. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις πολυηλεκτρολυτών, τα οργανικά μόρια απλώνονται και διατάσσονται σε επίπεδες θέσεις στις επιφάνειες των σωματιδίων του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου. Αυτό το είδος της προσρόφησης είναι κατά πάσα πιθανότητα μη αντιστρεπτή και παρεμποδίζει την μεταφορά των ιόντων στις επιφάνειες-πλαίσιο ανάπτυξης εμποδίζοντας έτσι την πυρήνωση της φάσης του άλατος.

4.3.4 Ειδικές περιπτώσεις συνθετικών πολυμερών (δενδριμερή)

Τα συνθετικά πολυμερή και τα δενδριμερή χρησιμοποιούνται στην παραγωγή υδροξυαπατίτη συγκεκριμένης μορφολογίας για χρήση σε βιοϋλικά. Η ύπαρξη των πολυμερών αυτών προσομοιάζει την ύπαρξη των πρωτεϊνών που υπάρχουν κατά την φυσική διαδικασία σύνθεσης του οστού.[20] Τα δενδριμερή, σε σύγκριση με τα γραμμικά πολυμερή, παρουσιάζουν το όφελος της ακριβούς αρχιτεκτονικής διάταξης, καθώς είναι μόρια έντονα διακλαδισμένα αποτελούμενα από ένα κεντρικό μόριο, έναν μεγάλο αριθμό κλάδων που αναπτύσσονται από αυτόν και τις τερματικές ομάδες για αυξημένη λειτουργικότητα (functionalization) των μορίων. Τα δενδριμερή έχουν ακριβές μοριακό βάρος και μέγεθος, σφαιρικό σχήμα και την δυνατότητα να εγκλείουν στο εσωτερικό τους μεταλλικά ιόντα ή και οργανικά μόρια. Τον σημαντικότερο παράγοντα αποτελεί η ύπαρξη πολλαπλών λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των μορίων των δενδριμερών, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για την μελέτη της ρύθμισης βιολογικών διαδικασιών ενώ ταυτόχρονα δίνει την δυνατότητα της δημιουργίας μιας διαδικασίας σύνθεσης η οποία προσεγγίζει την φυσική, όπως αυτή συμβαίνει εντός βιολογικών συστημάτων, βάση της δυνατότητας σύνδεσης των λειτουργικών ομάδων με τους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους. Πολλά διαφορετικά πολυμερή έχουν μελετηθεί για την χρήση τους σε τέτοιες εφαρμογές μερικά από τα οποία είναι το DAB, PEI, PAMAM. Ειδικά το PAMAM με επιφανειακές καρβοξυλικές ομάδες, υδροξύλια ή και αμινομάδες, έχει χρησιμοποιηθεί ως μακρομόριο-πλαίσιο για την παραγωγή άμορφων αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου ενώ υπό βιοεμπνευσμένες, υδροθερμικές συνθήκες μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή

νανο-ράβδων υδροξυαπατίτη. Πρόσφατα, η γραμμική ή διακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα της να λειτουργεί ως μακρομόριο-πλαίσιο κρυστάλλωσης υδροξυαπατίτη και μέσω αυτής ελήφθησαν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση κατιονικών πολυμερών στην κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη.[21]

4.3.5 Χημικές προσθήκες-ανόργανα μεταλλικά ιόντα

Μελέτες της επίδρασης μεταλλικών ιόντων οδοντιατρικών κραμάτων στον μετασχηματισμό άμορφου φωσφορικού ασβεστίου σε υδροξυαπατίτη, έδειξαν ότι ,τα ιόντα μπορούν να συντελέσουν είτε παρεμποδιστικά στην αντίδραση (πχ Ni,Co, Mo, Cu, Zn, Mg, Hg)είτε να μην παρουσιάσουν καμία επίδραση (πχ.Ti, Cr, Pt, Ag, Au, Al, Pb, Fe) είτε να λειτουργήσουν ως ενεργοποιητές της αντίδρασης (In, Fe). Η επίδραση τους στον μετασχηματισμό των αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου αποτελεί ένδειξη ότι τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να τροποποιήσουν τον τρόπο με τον οποίο συντελείται η εναπόθεση των αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου.[22][23]

4.3.6 Σύνθετα συστήματα

Η σύγχρονη έρευνα έχει σήμερα στραφεί προς την μελέτη πιο σύνθετων συστημάτων στα οποία η κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη επηρεάζεται με ίδιο ή διαφορετικό τρόπο από δύο ή περισσότερα είδη ουσιών. Δύο τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν η συνύπαρξη βιομορίων μεγάλου μεγέθους και μικρών οργανικών μορίων, όπως η περίπτωση του κολλαγόνου και κιτρικών, και η χρήση δενδριμερών μαζί με επιφανειοδραστικές ουσίες. Μια τέτοια περίπτωση είναι η μίξη δενδριμερούς functionalized πολυπροπυλενιμίνης με μεγάλες αλκυλαλυσίδες με επιφανειοδραστικές ενώσεις. Η προπυλενιμίνη είναι ένα αμφιφίλικό μόριο, το οποίο αναμιγνύμενο με επιφανειοδραστικές ενώσεις μονής αλυσίδας, σχηματίζει καλά δομημένα συσσωματώματα υδροξυαπατίτη καθώς το σύμπλοκο λειτουργεί σαν μακρομόριο-πλαίσιο για την κρυστάλλωση του άλατος.[20]

Στην δεύτερη περίπτωση, όπου η κρυστάλλωση φωσφορικών αλάτων γίνεται παρουσία ιών κολλαγόνου και κιτρικών, το βασικό οργανικό συστατικό του οστού, δηλαδή το κολλαγόνο, λειτουργεί σαν σημαντικός ρυθμιστής του προσανατολισμού του πλέγματος, του μεγέθους του κόκκου και της κατανομής του στην διαδικασία βιο-σύνθεσης άλατος. Τα κιτρικά λειτουργούν ως παρεμποδιστές της ανάπτυξης κρυστάλλων υδροξυαπατίτη κατά τα πρώτα στάδια της κρυστάλλωσης, καθώς δεσμεύουν μερικώς τις συστοιχίες του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου ενώ στην συνέχεια μετά τον σχηματισμό των νανοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη η ανάπτυξη τους προς την επιφάνεια (10 $\bar{1}0$) παρεμποδίζεται από τα κιτρικά τα οποία καλύπτουν ορισμένες επιφάνειες, λόγω συνταιριασμού των διαστάσεων τους με τον υδροξυαπατίτη μέσω προσρόφησης των κιτρικών πάνω στα κρυσταλλικά σκαλοπάτια της ανάπτυξης. Ταυτόχρονα, η δεσμευμένη επιφάνεια αυξάνει την διεπιφανειακή συμβατότητα μεταξύ κολλαγόνου και κρυστάλλων απατίτη. Όπως είναι φανερό η αλληλεπίδραση των δύο ουσιών με τον σχηματιζόμενο υδροξυαπατίτη επηρεάζουν τόσο το τελικό σχήμα των σχηματιζόμενων κρυστάλλων όσο και την σύνδεση μεταξύ των οργανικών μορίων [24]

Στα σύνθετα συστήματα η ύπαρξη περισσότερων της μίας προσθήκης που επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην μορφολογία του παραγόμενου προϊόντος, δίνουν την δυνατότητα καλύτερου ελέγχου της τελικής σχηματιζόμενης δομής, μπορούν όμως

και να επηρεάσουν τον μηχανισμό της αντίδρασης σχηματισμού του υδροξυαπατίτη. Τελικά, για να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος κατά τον σχηματισμό της δομής του τελικού άλατος που παράγεται σε τέτοια σύνθετα συστήματα, είναι σημαντική η μελέτη του μηχανισμού που ακολουθεί η αντίδραση μέσα σε αυτά.

Κεφάλαιο 5. Υβριδική υγρή μέθοδος παραγωγής υδροξυαπατίτη - Μέθοδοι Χαρακτηρισμού δειγμάτων και υλικά

5.1 Γενικά

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής διαδικασίας, έγινε μια προσπάθεια παραγωγής σκόνης υδροξυαπατίτη για χρήση στην παραγωγή εμφυτευμάτων συνθετικών οστών μέσα από το σύνθετο σύστημα H_3PO_4 -Ca(OH)₂-Col-Arg (και H_3PO_4 -Ca(OH)₂-Chitosan-Arg). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι μια υβριδική υγρή μέθοδος που συνδυάζει την απλή χημική εναπόθεση παρουσία βιομορίων, καθώς η κατακρήμνιση των αλάτων φωσφορικού ασβεστίου (υδροξυαπατίτη) γίνεται παρουσία κολλαγόνου (ή της χιτοζάνης αντίστοιχα), το οποίο τελικά μετασχηματίζεται σε κολλοειδές αιώρημα, σε περιβάλλον διαλύματος Αργινίνης.

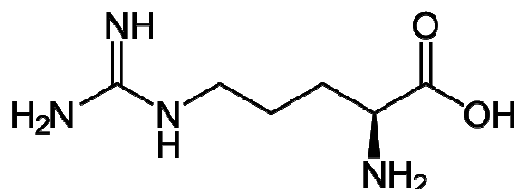
Η μέθοδος έχει τα οφέλη της μεθόδου sol-gel που δίνει την δυνατότητα ελέγχου των παραμέτρων της διαδικασίας παρέχοντας «τον τύπο» μέσα στον οποίο εξελίσσεται η εναπόθεση των φωσφορικών αλάτων, ενώ το προϊόν που προκύπτει είναι ένα σύνθετο βιο-κεραμικό με οργανικά βιομόρια, γεγονός το οποίο συντελεί στην επίτευξη της κατάλληλης ισορροπίας μεταξύ βιοσυμβατότητα και βιο-αποδόμηση στο τελικό προϊόν. Γενικά τα συνθετικά πολυμερή παρουσιάζουν μειωμένη βιοσυμβατότητα και αποδομούνται από τον οργανισμό δυσκολότερα από τα βιομόρια. Αυτό το γεγονός τα καθιστά λιγότερο κατάλληλα για χρήση ως βιολικά. Η ρύθμιση του pH γίνεται με την χρήση διαλύματος αργινίνης, η οποία ευνοεί την προσκόλληση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση τους πάνω στις επιφάνειες του υδροξυαπατίτη [25].

Το κάθε είδος βιομορίων επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην μορφολογία του παραγόμενου προϊόντος. Για να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος του τελικά σχηματιζόμενου υδροξυαπατίτη, είναι σημαντικό να μελετηθεί ο μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού του. Η γνώση και κατανόηση του συστήματος μέσα στο οποίο γίνεται η αντίδραση και των πρώτων υλών, που αποτελούν το σύστημα είναι πολύ σημαντικές για να γίνει σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Βάσει των αρχών λειτουργίας των μεθόδων χαρακτηρισμού των δειγμάτων, γίνεται επιλογή των τεχνικών που θα δώσουν την ακριβέστερη πληροφορία σχετικά με την δομή και την μορφολογία των προϊόντων. Λόγω του μικρού μεγέθους και ποσοτήτων τυχών πρόδρομων ή δευτερευουσών φάσεων, η ανίχνευση τους μπορεί να φανεί δύσκολη με την χρήση μιας μονάχα τεχνικής χαρακτηρισμού. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ποικιλία τεχνικών χαρακτηρισμού δομής (XRD, FT-IR, Raman, SEM) ενώ η τελική μορφή των παραγόμενων σωματιδίων υδροξυαπατίτη εξετάστηκε μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης TEM.

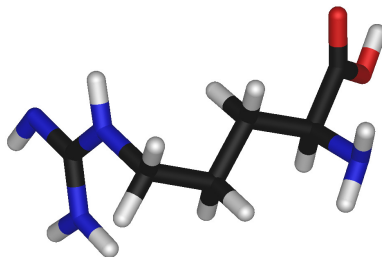
Για την καλύτερη κατανόηση του συστήματος αξίζει να γίνει αναφορά στα βιομόρια που αποτελούν μέρος αυτού, δηλαδή τα αμινοξέα (αργινίνη) και τις πρωτεΐνες (κολλαγόνο, χιτοζάνη).

διάλυση τους σε νερό υπάρχουν στο διάλυμα είτε ως διπολικά ιόντα είτε ως «υβριδικά ιόντα». Ένα «υβριδικό ιόν» μπορεί να λειτουργήσει είτε σαν οξύ, ως δότης πρωτονίων, είτε σαν βάση ως δέκτης πρωτονίων. Ουσίες με αυτήν την διττή φύση λέγονται αμφολύτες. Στα αμινοξέα οι πιο υδρόφιλες ομάδες R είναι αυτές που είναι πιο θετικά ή αρνητικά φορτισμένες. Η Αργινίνη έχει σημαντικό θετικό φορτίο σε φυσιολογικό pH ~7 λόγω της γουανιδικής της ομάδας με PKa= 12,48. [25][26]

- Δομή και ιδιότητες της L-Αργινίνης (Arg)



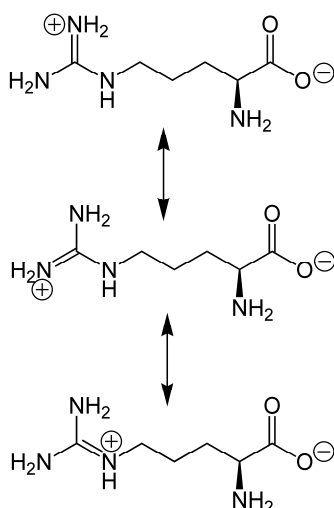
Εικόνα 5. Απεικόνιση Δομής της αργινίνης-L[25]



Εικόνα 6. Τρισδιάστατη απεικόνιση αργινίνης-L[25]

Η Αργινίνη (Arg ή (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid κατά IUPAC) είναι ένα αμινοξύ με μοριακό τύπο C₆H₁₄N₄O₂ και μοριακή μάζα 174.2 g mol⁻¹. Η L μορφή της αποτελεί ένα από τα πιο κοινά φυσικά αμινοξέα [25] Η αργινίνη αποτελείται από μια αλειφατική ευθεία αλυσίδα 4 ανθράκων, το τέλος της οποίας καλύπτεται από μια σύνθετη γουανιδιομάδα. Εξαιτίας της κλίσης μεταξύ του διπλού δεσμού και των απομονωμένων ζευγών αζώτου, το θετικό φορτίο είναι απεντοπισμένο, επιτρέποντας το σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου.[25][5] Η γεωμετρία, η διασπορά του φορτίου και η ικανότητα να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου καθιστά την αργινίνη ιδανική περίπτωση για τη σύνδεση αρνητικά φορτισμένων ομάδων. [5]

Με PKa= 12,48 η γουανιδική ομάδα είναι θετικά φορτισμένη σε ουδέτερα, όξινα και ακόμα και στα περισσότερα βασικά περιβάλλοντα και για τον λόγο αυτό προσδίδει στην βασικότητα του αμινοξέος.[25] Η αργινίνη ως βασικό αμινοξύ, έχει πολικές πλευρικές ομάδες γουανιδίνης πλήρως ιονισμένες, δηλαδή θετικά φορτισμένες σε ουδέτερο pH. Έτσι το μόριο της αργινίνης είναι ισχυρά πολικό και για τον λόγο αυτό και ισχυρά βασικό [28]. Λόγω της σύζευξης μεταξύ του διπλού δεσμού και των «μοναχικών» ζευγών αζώτου, το θετικό φορτίο μετατίθεται μεταφέρεται, επιτρέποντας τον σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου [25].



Εικόνα 7. Απεικόνιση της αργινίνης και της δυνατότητας της να "μεταφέρει" το θετικό φορτίο κατά μήκος της αλυσίδας της[25]

Πίνακας 2. Πίνακας ιδιοτήτων και παραδοχών των βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών

Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r	pK_a values			pI	Hydropathy index*	Occurrence in proteins (%) [†]
			pK_1 (-COOH)	pK_2 (-NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Positively charged								
R groups								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1

Μερικές ιδιότητες και παραδοχές των βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών φαίνονται στον παραπάνω πίνακα.

- Βιολογική χρήση και εφαρμογές της Αργινίνης στην επιστήμη

Η αργινίνη συντελεί πολλούς ρόλους στην κυτταρική φυσιολογία. Συμμετέχει στην σύνθεση των πρωτεϊνών, στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης, μέσα από την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και μέσα από τον μεταβολισμό της σε ορνιθίνη και άλλες πολυαμίνες. Λόγω των πολλαπλών του λειτουργιών, παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία επούλωσης των τραυμάτων και πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων αργινίνης οδηγούν στην κανονικοποίηση ή και βελτίωση της επούλωσης τραυμάτων.[29]

Εκτός από την χρήση της για την επούλωση τραυματισμών χρησιμοποιείται και σε άλλες ιατρικές εφαρμογές όπως για βελτίωση της ανοσοποιητικής αντίδρασης και στην νοσηλεία ανθρώπων που παρουσιάζουν χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Ακόμα χρησιμοποιείται σε έρευνες βιοχημείας, στην ιατρική και ως συμπλήρωμα διατροφής. [30].

Στην έρευνα ανάπτυξης νανοσωματιδίων υδροξυαπατίτη, η αργινίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διεύρυνση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων με επιφανειακή ενεργοποίηση. Επιπλέον οφέλη για αυτήν την χρήση της είναι το σχετικά χαμηλό κόστος της, η ενδογενής της βιοσυμβατότητα και η ικανότητα της να

αλληλεπιδρά με τις επιφάνειες του υδροξυαπατίτη. Παλαιότερες μελέτες που έχουν γίνει, έδωσαν έμφαση στη χρήση των αμινοξέων ως αναστολέων ανάπτυξης της κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη και όχι στην χρήση τους ως βοηθητικών μορίων για την παραγωγή νανοσωματιδίων με επιθυμητή λειτουργικότητα.[5]

Από προηγούμενη ερευνητική εμπειρία της ομάδας έχει επιτευχθεί η σύνθεση σταθερών υδάτινων κολλοειδών διαλυμάτων από νανοσωματίδια που περιέχουν αργινίνη και υδροξυαπατίτη, με ελεγχόμενο μέγεθος και σχήμα. Από τις συνθήκες παρασκευής τους (συγκεκριμένη μοριακή αναλογία Ca:αμινοξύ) εξασφαλίζεται αποτελεσματική παρεμπόδιση της ανάπτυξης με την απορρόφηση του αμινοξέος κυρίως πάνω στις επιφάνειες που είναι πλούσιες σε ασβέστιο κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της κρυστάλλωσης.

Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε κολλοειδή σταθεροποίηση με ηλεκτροστατική απόθεση μεταξύ των αμινοξέων που είναι επικολημένα στην επιφάνεια, τέτοια ώστε να δημιουργούνται Sol που αποτελούνται από μονοδιασπαρμένα λειτουργικά νανοσωματίδια Υδροξυαπατίτη. Η Αργινίνη διευκολύνει τη διαμόρφωση νανοσωματιδίων και πηκτωμάτων και ελέγχει το ιξώδες των διαλυμάτων. Τα αμινοξέα μπορούν να επικάθονται πάνω στη θετικά φορτισμένη επιφάνεια του Υδροξυαπατίτη μέσω της καρβοξυλιομάδας. Ουσιαστικά με την αύξηση της αργινίνης φαίνεται να ευνοείται η ύπαρξη άμορφου προϊόντος [5]

5.2.2 Πρωτεΐνες: Γενικά για τις πρωτεΐνες

Τα πεπτίδια είναι αμίδια που σχηματίζονται δια μέσου αντίδρασης των αμινομάδων και καρβοξυλομάδων αμινοξέων. Η αμινομάδα $-NHCO-$ καλείται και πεπτιδικός δεσμός. Με διαφορές μεθόδους τα πεπτίδια σχηματίζουν αλυσίδες οι οποίες με την σειρά τους συνδυάζονται για να σχηματίσουν πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες έχουν πολύ μεγαλύτερο μοριακό βάρος από αυτό των πολυπεπτιδίων και πιο πολύπλοκες δομές. Οι πρωτεΐνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τις ινώδεις, που είναι αδιάλυτες στο νερό και τις σφαιρικές οι οποίες είναι υδατοδιαλυτές σε νερό ή υδατικά διαλύματα οξέων, βάσεων ή αλάτων. Οι πρωτεΐνες δομούνται σε πολλά επίπεδα. Η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών είναι ο τρόπος, με τον οποίο τα άτομα των μορίων της πρωτεΐνης συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας αλυσίδες (covalent bonds). Στην συνέχεια η δευτεροταγής δομή είναι ο τρόπος με τον οποίο αυτές οι αλυσίδες είναι συνδεδεμένες στο χώρο, σχηματίζοντας φύλλα, σφαίρες ή σπείρες με δεσμούς υδρογόνου να συνδέουν διαφορετικές αλυσίδες ή διαφορετικά σημεία της ίδιας αλυσίδας. Οι πρωτεΐνες υφίστανται ακόμα ποιο περίπλοκο δίπλωμα (πτύχωση) το οποίο καλείται τριτοταγής δομή. Ο όρος τριτοταγής δομή περιγράφει το τελικό και λειτουργικό σχήμα που αποκτά η πρωτεΐνη μετά κι από την αλληλεπίδραση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων (π.χ. σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ δύο κυστεϊνικών καταλοίπων). Στις πρωτεΐνες που αποτελούνται από πολλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που είναι χαλαρά ενωμένες και αυτό αποτελεί τη λεγόμενη "τεταρτοταγή δομή". [31]

- **Δομή και ιδιότητες του Κολλαγόνου**

Το κολλαγόνο ανήκει σε μια οικογένεια ινωδών πρωτεϊνών που εμφανίζεται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Είναι το βασικό ινώδες συστατικό του δέρματος, των οστών, των τενόντων, των δοντιών και άλλων. Είναι χαρακτηριστικό φυσικό πολυμερές το οποίο απαντάται στο εξωκυττάριο υλικό των συνδετικών ιστών. Περισσότερο από το 90% του ποσοστού εξωκυττάριας πρωτεΐνης που παράγεται στους τένοντες και στα οστά είναι κολλαγόνο. Ο ρόλος του είναι δομικός και προσδίδει αντοχή και ακεραιότητα της δομής του συνδετικού ιστού και των οργάνων του σώματος.

Οι πιο σημαντικοί λόγοι της χρήσης του κολλαγόνου ως βιοϋλικό εστιάζεται στην μειωμένη ανοσοαντίδραση του οργανισμού προς το βιοπολυμερές και στην ικανότητα διαμόρφωσης του σε διάφορες μορφές, όπως φύλλα, ράβδοι, σπογγώδη υλικά, gel, σκόνη αλλά και ενέσιμα αιωρήματα.

Το κολλαγόνο αποτελείται από μια ομάδα γενετικώς διαφορετικών μορίων τα οποία έχουν κοινή δομή αυτήν της τριπλής έλικας. Το κολλαγόνο του δέρματος, των τενόντων, του κερατοειδούς χιτώνα και των οστών είναι κολλαγόνο τύπου I και αποτελείται, συχνότερα από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες του ίδιου μήκους δύο α1(I) και μια α2(I), και σπανιότερα από τρεις ίδιες αλυσίδες α1(I)₃. Η χημική σύσταση των αλυσίδων α1 και α2 φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:[1]

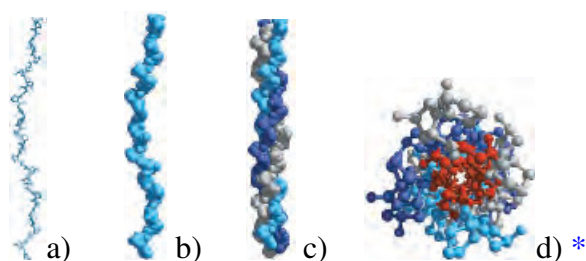
Πίνακας 3. Πίνακας Σύστασης σε αμινοξέα των αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου I

Πίνακας 1 Σύσταση σε αμινοξέα των Αλυσίδων του Κολλαγόνου τύπου I [1]		
Αμινοξύ	α1(I)	α2(I)
Αλανίνη	124	111
Αργινίνη	53	56
Ασπαραγίνη	13	23
Ασπαρτικό οξύ	33	24
Γλουταμινικό οξύ	52	46
Γλουταμίνη	27	24
Γλυκίνη	345	346
Ιστιδίνη	3	8
Υδροξυλυσίνη	4	9
Υδροξυπρολίνη	114	99
Ισολευκίνη	9	18
Λευκίνη	22	33
Λυσίνη	34	21
Μεθιονίνη	7	4
Φαινυλαλανίνη	13	15
Προλίνη	127	108
Σερίνη	37	35
Θρεονίνη	17	20
Πυροσίνη	5	4
Βαλίνη	17	34
Συνολικά Αμινοξέα ανά αλυσίδα	1056	1038

Η ακολουθία των αμινοξέων στο κολλαγόνο είναι πολύ κανονική και σχεδόν κάθε τρίτο αμινοξύ είναι γλυκίνη. Οι ακολουθίες αμινοξέων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων συμβολίζονται με τον γενικό τύπο: Gly(γλυκίνη)-X-Y όπου X και Y συνήθως τα αμινοξέα προλίνη και υδροξυ-προλίνη (Pro και HyPro) [1]. Ο πυρολιδικός δακτύλιος

της προλίνης και της υδροξυ-προλίνης, επηρεάζει την δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης.

Η παραγωγή του κολλαγόνου γίνεται από εξειδικευμένα κύτταρα όπως οι οστεοβλάστες, οδοντοβλάστες και άλλα. Αρχικά γίνεται σχηματισμός των πεπτιδικών αλυσίδων και στην συνέχεια η προλίνη και η λυσίνη υδροξυλιώνονται και στις παραγόμενες υδροξυλυσίνες προστίθενται σάκχαρα με την δράση ειδικών ενζύμων. Ακολουθεί ο σχηματισμός της τριπλής αλυσίδας «πρωτοκολλαγόνου» δέσμες του οποίου εκκρίνονται στο εξωκυττάριο χώρο όπου κόβονται τα μη ελικοειδή άκρα τους, από πρωτεάσες ώστε τελικά τα μόρια γίνονται «τροποκολλαγόνου». Τα μόρια του τροποκολλαγόνου συγκροτούνται σε σειρές μετατοπισμένες η μια προς την άλλη και δίνουν τις ίνες του κολλαγόνου. Οι ίνες του κολλαγόνου ισχυροποιούνται με διασύνδεση μεταξύ διαφορετικών μορίων του τροποκολλαγόνου μεταξύ καταλοίπων λυσίνης και υδροξυλυσίνης.[1]



Εικόνα 8. Απεικόνιση της δομής του κολλαγόνου a) μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα με δευτεροταγή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία τριών πεπτιδίων Gly-X-Pro, Gly-X-4-Hyp με ελικοειδή περιτύλιξη b) Η ίδια δομή σε τρισδιάστατη εικόνα c) Τρεις διαφορετικές αλυσίδες περιπλεγμένες μεταξύ τους αριστερόστροφα, d) Η τρίκλωβη υπερέλικα κολλαγόνου σε κάτωψη με τα υπολοιπόμενα μόρια – gly με κόκκινο χρώμα [26]

Η έλικα των αλυσίδων του κολλαγόνου είναι δεξιόστροφη και έχει τρία υπολοιπόμενα αμινοξέα σε κάθε στροφή. Κάθε ίνα κολλαγόνου αποτελείται από τρεις διαφορετικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων οι οποίες περιπλέκονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα νέο περιεστραμμένο ελατήριο με διακριτή τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή [26]. Η περιτύλιξη των ελίκων είναι αριστερόστροφη αντίστροφης φοράς από τις περιτυλίξεις της έλικας των αλυσίδων.

- Επίδραση θερμοκρασίας και οξέων στο κολλαγόνο

Το κολλαγόνο, διαφέρει ως προς την φυσική του δομή, ανάλογα με την πηγή από την οποία έχει προέλθει, τον βαθμό ύπαρξης σταυροδεσμών ή ακόμα και τα αμινοξέα που τα αποτελούν. Έτσι η επίδραση οξέων και θερμοκρασίας μπορεί να διαφέρει κατά περίπτωση. Το προϊόν που προκύπτει από την ήπια θερμική διάλυση και ήπια διάλυση (bovine hide) κολλαγόνου σε οξύ χωρίς το να έχει υποστεί προηγούμενη κατεργασία, δεν συμπεριφέρεται ως ζελατίνη αλλά περισσότερο ως προκολλαγόνο. Ακόμα η πιθανή αστάθεια της σύνδεσης μεταξύ των ινών (disaggregation) δεν είναι το μόνο πρόβλημα σταθερότητας των διαλυμάτων κολλαγόνου. Κάτω από ορισμένες συνθήκες μακροσκοπικές ίνες κολλαγόνου σχηματίζονται στους 40° κάτω μέσα από διαλύματα που φαινομενικά είναι ομοιογενή. Τα ινίδια αυτά σχηματίζονται αντιστρεπτά και μπορούν να ξαναδιασπαρούν. Στην περίπτωση αυτή μία ισορροπία του τύπου gel-διάλυμα-ίνες φαίνεται να είναι σε λειτουργία. [32] Άλλες έρευνες

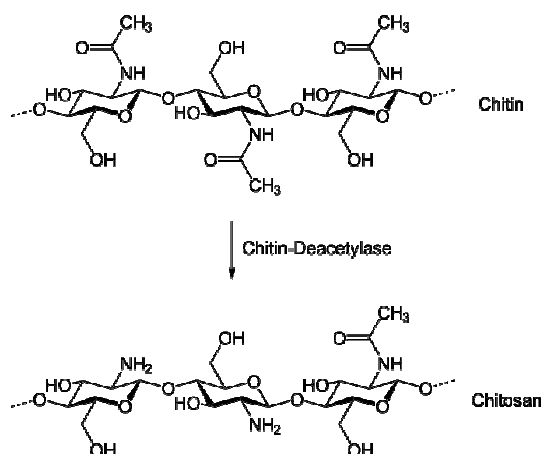
έχουν δείξει ότι το φωσφορικό οξύ υποβαθμίζει την σταθερότητα του κολλαγόνου τύπου-1 που προκύπτει από τον αχίλλειο τένοντα βοειδών.[33]

Τα φυσικά πολυμερή, όπως το κολλαγόνο, προτιμώνται για την παραγωγή βιολογικών καθώς παρουσιάζουν μειωμένη δημιουργία τοξικών αντιδράσεων και πρόκληση φλεγμονών στον δέκτη, λόγω χημικής ομοιότητας με τα μακρομόρια του περιβάλλοντος που εμφυτεύεται. Επιπλέον η ικανότητα αποικοδόμησης των υλικών αυτών από βιολογικά ένζυμα, δίνει την εγγύηση ότι το υλικό θα μεταβολιστεί με φυσιολογικό τρόπο. Η ιδιότητα αυτή δεν είναι πάντα επιθυμητή καθώς είναι υπεύθυνη για την μείωση των αντοχών του υλικού, είναι όμως πολύτιμη όταν το υλικό εμφυτεύεται και επιτελέσει το σκοπό του σε μικρό χρονικό διάστημα. [1]

- **Δομή και ιδιότητες της Χιτοζάνης**

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό, βιοαποικοδομήσιμο, πολυκατιονικό πολυμερές (πολυηλεκτρολύτης)[34]. Το μόριο της είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από γλυκοσαμίνη (glucosamine) και N-ακετυλογλυκοζαμίνη συνδεδεμένες κατά β(1-4))[36] που προκύπτει μετά από απακυλίωση της χιτίνης. Η χιτοζάνη, όπως και η χιτίνη μπορούν να απομονωθούν από φυσικά απόβλητα όπως τα κελύφη οστρακοειδών.[1],[36] Ανάλογα με την πηγή και την διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή της χιτοζάνης το μοριακό της βάρος μπορεί να εκτείνεται σε εύρος από 300 μέχρι 1000kD και ποσοστό απακυλίωσης από 30% μέχρι 95%. Στην κρυσταλλική της μορφή η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα pH>7, ενώ σε διαλυμένη σε οξέα δηλ σε υδατικά διαλύματα με pH<6 οι ελεύθερες αμινικές ομάδες στην γλυκοζαμίνη διευκολύνουν την διάλυση του μορίου.[36]

Η κατιοντική φύση της χιτοζάνης είναι κατ' αρχάς υπεύθυνη για την αντίδραση με τα αρνητικά φορτισμένα (ανιονικά) μόρια, όπως λ.χ. οι (GAG- glycosaminoglykans) γλυκοζαμινογλυκάνες. Αυτή η ιδιότητα σε συνδυασμό με την καλή βιοσυμβατότητα, την αντιβακτηριδιακή της ικανότητα και την ικανότητα της να συνδέεται με παράγοντες ανάπτυξης, καθιστούν την χιτοζάνη πολύ χρήσιμο υλικό για μελέτη της χρήσης της σε εφαρμογές ανάπτυξης οστικών ιστών σε κλινικές εφαρμογές. Ο ρυθμός αποδόμησης (degradation) της χιτοζάνης από βιολογικούς παράγοντες συνδέεται άμεσα με τον βαθμό κρυσταλλικότητας και κατ' επέκταση με το ποσοστό απακευλίωσης της ένωσης. Η έντονα απακυλιωμένες δομές μπορούν να διατηρηθούν αρκετούς μήνες in vivo, παράγοντας κατά την διάσπασή τους CS ολιγοσακχαρίτες ποικίλων διαφορετικών μηκών.

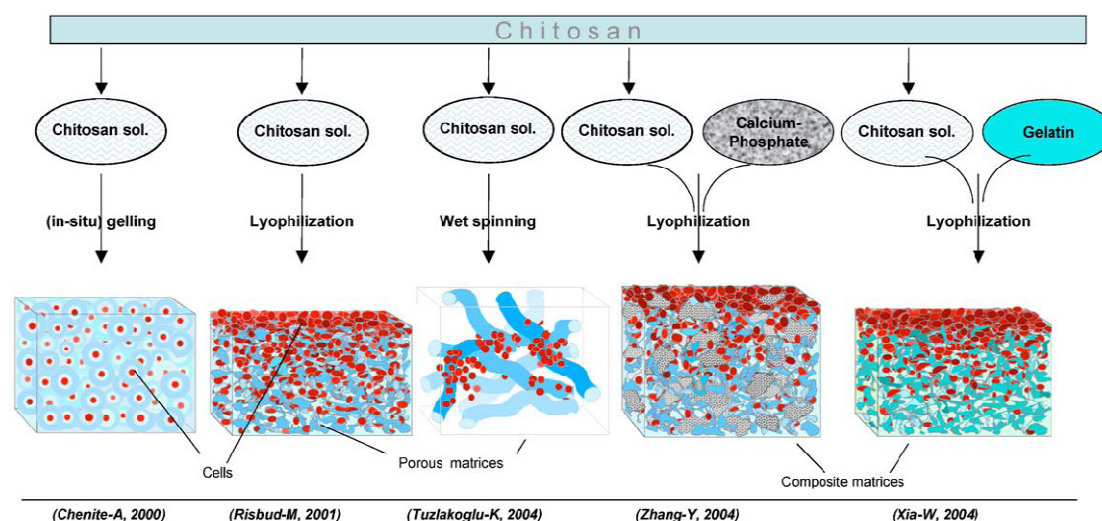


Εικόνα 9. Απακυλίωση της χιτίνης προς παραγωγή χιτοζάνης

- **Χρήσεις χιτοζάνης**

Οι βασικές εφαρμογές που βρίσκει η χιτοζάνη είναι κυρίως στην χρήση για την θεραπεία ασθενών με εγκαύματα, λόγω της εξαιρετικής βιοσυμβατότητας, της ικανότητας της να μορφοποιείται σε πορώδεις δομές καθώς και της ικανότητας να δημιουργεί ισχυρές, απορροφητικές μεμβράνες. Γενικά πορώδη ικρνώματα χιτοζάνης παράγονται με ψύξη και λυοφιλοποίηση διαλυμάτων χιτοζάνης ή με διαδικασίες προσθήκης ανθρακικού ασβεστίου CaCO₃ προς εσωτερικού αφρισμού (internal bubbling process) με την παραγωγή πηκτής χιτοζάνης-ανθρακικού ασβεστίου.[36] Τέλος η χιτοζάνη είναι διαπερατή στο οξυγόνο ώστε επιτρέπει στον τραυματισμένο ιστό να αναπνέει. Ακόμα, αποδομείται φυσικά από τα ενζυμα του οργανισμού και χρησιμοποιείται σαν αιμοστατική ουσία λόγω της προσκόλλησης της στα ερυθροκύτταρα και προώθησης της συγκόλλησης τους [1][36].

Πολύ σημαντική είναι και η χρήση της στην μηχανική οστών, η οποία είναι εκτεταμένη καθώς έχει αποδειχτεί πως η χιτοζάνη προωθεί την ανάπτυξη μήτρας πλούσιας σε εναποτιθέμενα άλατα σε καλλιέργεια οστεοβλαστών.[36] Ερευνητικά έχει μελετηθεί και στον τομέα ανάπτυξης υποκατάστατου οστού, όπου γίνεται συνδυασμός πολυμερούς με άλας ώστε το τελικό υλικό να έχει την δυσθραυστότητα (toughness) και ελαστικότητα του πολυμερούς και την σκληρότητα και αντοχή του πληρωτικού άλατος, το οποίο είναι συνήθως υδροξυαπατίτης. Τα πλεονεκτήματα τέτοιων συνθέτων είναι η αναβάθμιση της οστεογενικής δυνατότητας-δυναμικού (potential) με την ενσωμάτωση βιοενεργού υδροξυαπατίτη στην πολυμερή μήτρα η οποία λειτουργεί και ως συνδέτης εμποδίζοντας έτσι την «μετανάστευση» του υδροξυαπατίτη. Η χρήση της χιτίνης και των παραγώγων της σε αυτές τις εφαρμογές δίνει σημαντικά πλεονεκτήματα στο παραγόμενο υλικό αρχικά, καθότι είναι βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη ουσία μεγιστοποιώντας την δυνατότητα του οστού να αναγεννηθεί. Λόγω της δόμησης της σε παράλληλες διατάξεις αλυσίδων συνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου μπορεί να δώσει προϊόντα με μηχανικές ιδιότητες συγγενικές με το πραγματικό οστό, προσφέροντας σταθερότητα στο εμφύτευμα και μεγάλη φέρουσα ικανότητα φορτίου.[35],[36]



Εικόνα 10. Απεικόνιση επιλεγμένων παραδειγμάτων διεργασιών χιτοζάνης για χρήση στην μηχανική των ιστών. Ο συνδυασμός της χιτοζάνης με άλλα βιοσυμβατά υλικά όπως ζελατίνη και φωφορικό ασβέστιο γίνεται ώστε να επιτευχθεί τροποποίηση των βιομηχανικών ιδιοτήτων και της αλληλεπίδρασης της μήτρας με τα κύτταρα.

Η χιτοζάνη έχει μελετηθεί και για χρήση στην παραγωγή φορέων και συστημάτων μεταφοράς θεραπευτικών ουσιών, ειδικών μορίων πρωτεϊνών και γονιδίων, λόγω της ιδιότητας που έχει να μπορεί εύκολα να περιπλεχθεί γύρω από αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες και DNA χάρη στο θετικό της φορτίο. [34]

- Επίδραση θερμοκρασίας και οξέων στην χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι γραμμικός κατιονικός πολυηλεκτρολύτης ο οποίος παρουσιάζει διαλυτότητα μόνο σε όξινα υδατικά διαλύματα [37]. Η επίδραση των οξέων στην χιτοζάνη και ειδικά του φωσφορικού οξέος, έχει μελετηθεί βιβλιογραφικά. Η υδρόλυση της χιτοζάνης σε φωσφορικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους μέσω της έκθεσης χιτοζάνης σε φωσφορικό οξύ 85% για ποικίλους χρόνους και θερμοκρασίες επηρεάζοντας και το ιξώδες του τελικού προϊόντος. Ο ρυθμός αποδόμησης φάνηκε να μειώνεται αυξανόμενου του χρόνου υδρόλυσης και διαφορετικοί χρόνοι υδρόλυσης έδωσαν τελικά χιτοζάνη με διαφορετικά μοριακά βάρη. Ακόμα δείχθηκε ότι η διαλυτότητα της χιτοζάνης στο νερό αυξανόταν όσο μειώνεται το μοριακό της βάρος.[38]. Στην ίδια έρευνα μελετήθηκε και η επίδραση που έχει η θερμοκρασία στο τελικά παραγόμενο προϊόν χιτοζάνης. Φάνηκε ότι αυξανόμενης της θερμοκρασίας, για ίσους χρόνους υδρόλυσης, η τελική χιτοζάνη που προέκυπτε είχε χαμηλότερο μοριακό βάρος.[39]

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του οξέος στην δομή της χιτοζάνης είναι που οδηγεί σε ανιχνεύσιμη μεταβολή των ιδιοτήτων της χιτοζάνης. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης δημιουργίας σταυροδεσμών στην χιτοζάνη. Ο σχηματισμός πολυμερικών σταυροδεσμών χιτοζάνης οδηγεί στον σχηματισμό μόνιμου ομοιοπολικού δικτύου το οποίο επιτρέπει την διάχυση νερού ή βιοενεργών υλικών, ταυτόχρονα ενισχύοντας τις μηχανικές ιδιότητες του πολυμερους.[40]

Κεφάλαιο 6. Μηχανισμοί αντίδρασης σε διαλύματα.

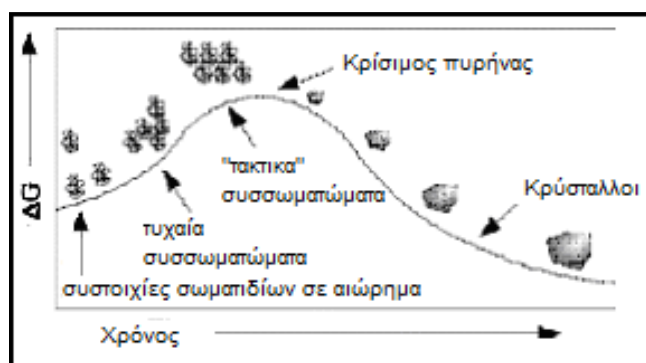
6.1 Βασικές έννοιες: Πυρήνωση και Κρυστάλλωση Αλάτων σε διαλύματα

Η διαδικασία κρυστάλλωσης ενός άλατος σε διάλυμα είναι μια πολυπαραμετρική διαδικασία και περιλαμβάνει τρία βήματα: την πυρήνωση, την ανάπτυξη και την διακοπή της ανάπτυξης. Κατά την κρυστάλλωση (ελάχιστα διαλυτού άλατος) σε υδατικό διάλυμα, γίνεται ουσιαστικά εξαναγκασμός των ιόντων να καταβυθιστούν σε τριών διαστάσεων δομές.

Για την έναρξη της κρυστάλλωσης υπάρχει ένα ενεργειακό φράγμα (energy barrier) το οποίο πρέπει να ξεπεραστεί από την ένωση πριν αυτή μπορέσει να κρυσταλλωθεί. Το μέγεθος του πυρήνα του προϊόντος που αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή της ενέργειας καλείται κρίσιμος.

Η πιθανότητα της πυρήνωσης αυξάνεται αυξανόμενου του υπερκορεσμού. Ο υπερκορεσμός αυξάνει την πιθανότητα σχηματισμού ενός κρίσιμου πυρήνα ενώ μικρότερου μεγέθους πυρήνες είναι απαραίτητοι για να προκαλέσουν σχηματισμό και ανάπτυξη κρυσταλλικών αλάτων.

Με την πάροδο του χρόνου τα σωματίδια αναπτύσσονται ώστε το μέγεθος τους μεγαλώνει και σχηματίζονται κρύσταλλοι. Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των κρυστάλλων προς την μία ή την άλλη διεύθυνση, η υποκίνηση της αντίδρασης ή η διευκόλυνση της συσσωμάτωσης σωματιδίων επιφανειοδραστικών ουσιών μπορεί να προκαλέσει ποικίλα αποτελέσματα στην τελική μορφολογία του υλικού.



Εικόνα 11. Απεικόνιση του ενεργειακού φράγματος πυρήνωσης και ανάπτυξης κρυστάλλων

Για την αποτελεσματικότερη μελέτη ενός συστήματος πυρήνωσης και κρυστάλλωσης είναι απαραίτητη η κατανόηση κάποιων βασικών στοιχείων χημείας διαλυμάτων.

6.2 Χημεία Διαλυμάτων-Αιωρήματα-Κολλοειδή αιωρήματα

Για την αποτελεσματικότερη μελέτη ενός υγρού συστήματος στο οποίο λαμβάνουν χώρα φαινόμενα πυρήνωσης και κρυστάλλωσης είναι απαραίτητη η κατανόηση κάποιων βασικών στοιχείων χημείας διαλυμάτων.

Η βασική διάκριση των υδατικών μιγμάτων μεταξύ τους γίνεται βάση του μεγέθους των σωματιδίων που περιέχονται σε αυτά. Οι τρεις γενικές κατηγορίες είναι τα διαλύματα, τα κολλοειδή και τα αιωρήματα. Ένα αιώρημα αποτελείται από σωματίδια σχετικά μεγάλου μεγέθους διασπαρμένα μέσα σε υγρή φάση. Τα σωματίδια αυτά έχουν μέγεθος αρκετά μεγάλο για να είναι ορατά με γυμνό μάτι. Σε περίπτωση που η ανάδευση σταματήσει κατακάθονται λόγω της βαρύτητας με ρυθμό που εξαρτάται από την μορφολογία του σωματιδίου. Αντίθετα με το αιώρημα, σε ένα διάλυμα όλα τα σωματίδια βρίσκονται σε αντίστοιχες διαστάσεις δηλαδή σε επίπεδο μορίων και ατόμων διαλύτη και διαλυμένης ουσίας, τα οποία είναι ομογενώς διεσπαρμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας μια ομογενή φάση. Λόγω του άμεσου τρόπου με τον οποίο τα σωματίδια είναι διεσπαρμένα μεταξύ τους οι ιδιότητες του διαλύματος διαφέρουν από αυτές του σκέτου διαλύτη. Τα κολλοειδή διαλύματα είναι διαλύματα κατάστασης ενδιάμεσης μεταξύ διαλύματος και αιωρήματος. [41][42] Η αδράνεια της διεσπαρμένης φάσης είναι αρκετή ώστε να παρουσιάζει κίνηση (ή διάχυση) Brown, η οποία μπορεί να περιγραφεί ως τυχαία διαδρομή των σωματιδίων που υποκινείται από τις στιγμιαίες συνθήκες που επικρατούν, λόγω συγκρούσεων των μορίων του μέσου στο οποίο βρίσκονται σε αιώρηση. [43]

Υπάρχουν πολλά είδη κολλοειδών που διαχωρίζονται βάσει της φύσης του διαλύτη και των εν διαλύσει φάσεων. Υγρές φάσης διαλύτη με στερεή διασπειρόμενη φάση μπορεί να δίνουν κολλοειδή της μορφής διαλυμάτων (sol) ή πηκτής (gel). Τα σωματίδια σε ένα κολλοειδές είναι πολύ μικρά σε μέγεθος (κυμαινόμενα από 1nm μέχρι 1000nm) για να είναι ορατά με γυμνό μάτι. Παρόλα αυτά έχουν επίδραση στο ορατό φως όταν η συγκέντρωση των σωματιδίων στο διαλύτη είναι μεγάλη καθώς προκαλεί διασκορπισμό του φωτός σε μεγάλες γωνίες. Το εισερχόμενο φως διασκορπίζεται από τα σωματίδια και απορροφάται, ενώ μέσα από τα διαλύματα το φως περνά ανεπηρέαστο. Το φαινόμενο διάχυσης-διασκορπισμός του φωτός μέσα από κολλοειδή υλικά είναι χαρακτηριστικό και καλείται φαινόμενο Tyndall. [41],[42]



Εικόνα 12. Εικόνα οργανικού-ανόργανου κολλοειδούς αιωρήματος υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου που παρήχθη στα πλαίσια της παρούσας εργασίας

6.2.1 Διάλυση στερεών σε υγρά

Κατά την διάλυση στερεού σε υγρό είναι απαραίτητο να ληφθούν υπ όψιν πολλοί παράγοντες. Σε ένα στερεό τα μόρια και τα ιόντα τακτοποιούνται σε επαναλαμβανόμενα μοτίβα και οι ελκτικές δυνάμεις είναι στα μέγιστα. Για να διαλυθούν στον διαλύτη πρέπει οι δυνάμεις διαλύτη-διαλυμένης ουσίας να είναι αρκετά μεγάλες, ώστε να υπερβούν τις ελκτικές δυνάμεις που κρατούν σχηματισμένο το στερεό.

Στην περίπτωση μοριακών κρυστάλλων, οι ελκτικές δυνάμεις που συγκρατούν τα στερεά είναι σχετικά ασθενείς (τύπου διπόλου-διπόλου και London) και έτσι οι ουσίες που συγκρατούνται από δυνάμεις London διαλύονται σε μη πολικούς διαλύτες, σε ικανοποιητικό βαθμό. Αντίθετα η διάλυση τους σε πολικούς διαλύτες είναι πολύ μικρή καθώς η δυνάμεις με τις οποίες έλκονται τα μόρια του πολικού διαλύτη μεταξύ τους είναι πολύ ισχυρή και δεν μπορεί να παραγκωνιστεί και να αντικατασταθεί από αυτή των μορίων αυτών των οποίων η έλξη είναι ασθενής.

Στερεά αποτελούμενα από πολικά μόρια ή ιόντα είναι αδιάλυτα σε μη πολικούς διαλύτες. Στα ιοντικά στερεά οι ελκτικές δυνάμεις είναι πολύ ισχυρές οπότε είναι αναγκαίος ένας εξαιρετικά πολικός διαλύτης για να λυθούν, όπως το νερό. [42]

Κατά την διάλυση πολικών κρυστάλλων (λ.χ. ενός άλατος) μέσα σε νερό παρατηρείται το εξής φαινόμενο: στον άμεσο περίγυρο του θετικού ιόντος ιοντικού άλατος τα μόρια του νερού που περιβάλλουν το ιόν προσανατολίζονται ώστε το αρνητικό μέρος του διπόλου τους «δείχνει» στην κατεύθυνση ενός θετικού φορτίου. Το αρνητικό ιόν περιβάλλεται από τα θετικά μέρη των μορίων του πολικού διαλύτη με αποτέλεσμα τα ιόντα να «εγκλείονται» μέσα σε μόρια νερού. Όταν ένα ιόν εγκλείεται έτσι μέσα σε ένα «κλουβί» από μόρια νερού λέγεται ενυδατωμένο. Όταν ένα σωματίδιο περιβάλλεται από μόρια διαλύτη λέγεται διαλυτοποιημένο. [42] Τα φαινόμενα αυτά είναι πολύ χρήσιμα στην κατανόηση της καταστασης στην οποία συνυπάρχουν ιόντα διαλυμένα σε ένα διαλύτη λ.χ. νερό.

6.2.2 Μελέτη Αντιδράσεων σε διαλύματα

Όλες οι παραπάνω αναφορές γίνονται στην μελέτη περιπτώσεων προϋπαρχόντων ουσιών που διαλύονται μέσα σε διαλύτη. Συχνά όμως η ουσία προκύπτει μέσα από αντιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ δύο η περισσότερων ουσιών εντός του διαλύτη. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη και η μελέτη των παραγόντων που οδηγούν στην αντίδραση των συστατικών και από τους οποίους εξαρτάται η δημιουργία ή μη συγκεκριμένων προϊόντων. Οι δύο θεωρίες που προσδιορίζουν εάν θα πραγματοποιηθεί μια αντίδραση είναι η *θερμοδυναμική* και η *κινητική*.

Η θερμοδυναμική θα απαντήσει στην ερώτηση εάν μια αντίδραση είναι δυνατή, αν θα γίνει από μόνη της ή αν θα χρειαστεί βοήθεια, ποια θα είναι η θέση της ισορροπίας όταν η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης παύει να αλλάζει. Σχετίζεται με τις ενεργειακές αλλαγές που συνοδεύουν τις χημικές και φυσικές διεργασίες και ιστορικά εξελίχθηκε χωρίς λεπτομερή γνώση της δομής της ύλης.

Βασικά μεγέθη της θερμοδυναμικής αποτελούν η εσωτερική ενέργεια, η ενθαλπία, η μεταβολή της εντροπίας, το ωφέλιμο έργο και η ελεύθερη ενέργεια.

- ✓ Η εσωτερική ενέργεια E
- ✓ Το ωφέλιμο έργο
- ✓ Η ενθαλπία ΔH
- ✓ Η εντροπία ΔS
- ✓ Η ελεύθερη ενέργεια G

Η κινητική ασχολείται με την ταχύτητα με την οποία λαμβάνουν χώρα χημικές αλλαγές. Ασχολείται με τις ταχύτητες ή ρυθμούς των χημικών αντιδράσεων. Συντελεστές που επηρεάζουν την χημική κινητική είναι

- α) η φύση των αντιδρώντων και των προϊόντων (άλλες αντιδράσεις συμβαίνουν από την φύση τους γρήγορα),
- β) οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων (με την αύξηση των συγκεντρώσεων δύο αντιδρώντων σε ομογενή διαλύματα η πιθανότητα να συναντηθούν τα αντιδρώντα είναι μεγαλύτερη),
- γ) η επίδραση της θερμοκρασίας (σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις επιταχύνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας) και
- δ) την επίδραση εξωτερικών παραγόντων που καλούνται καταλύτες (οι ρυθμοί σχεδόν όλων των βιοχημικών αντιδράσεων επηρεάζονται από καταλύτες που δεν υφίστανται οι ίδιοι δομικές μεταβολές κατά την διάρκεια της αντίδρασης).

Τα σημαντικότερα οφέλη που προκύπτουν από την μελέτη των ρυθμών αντίδρασης είναι η λεπτομερής γνώση σχετικά με τον τρόπο που λαμβάνουν χώρα χημικές μεταβολές. Οι χημικές αντιδράσεις συνήθως δεν ολοκληρώνονται σε ένα μοναδικό βήμα, που περιλαμβάνει την ταυτόχρονη σύγκρουση όλων των μορίων των αντιδρώντων όπως περιγράφονται στην χημική εξίσωση της αντίδρασης, αλλά η τελική αλλαγή είναι αποτέλεσμα μιας ακολουθίας απλών αντιδράσεων. Αυτή η ακολουθία καλείται **μηχανισμός της αντίδρασης**. [42]

Και οι δύο αυτοί παράγοντες, ο αυθορμητισμός και η ταχύτητα μιας αντίδρασης πρέπει να είναι ευνοϊκοί για να παρατηρηθεί ο σχηματισμός των προϊόντων μιας χημικής αλλαγής. Η ταχύτητα της αντίδρασης πρέπει να είναι αρκετά αργή ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί και η ενέργεια του συστήματος να είναι τέτοια ώστε να μην ολοκληρώνεται αυθόρμητα η αντίδραση κάτω από τις μελετώμενες συνθήκες.

6.2.3 Μηχανισμοί δημιουργίας κρυστάλλων μέσα από διαλύματα

Όπως έχει προαναφερθεί, οι χημικές αντιδράσεις συνήθως δεν ολοκληρώνονται σε ένα μοναδικό βήμα, όπως περιγράφονται στην χημική εξίσωση της αντίδρασης, αλλά είναι αποτέλεσμα μιας ακολουθίας απλών αντιδράσεων, που αποτελεί τον **μηχανισμό της αντίδρασης**. [42]

Για την μελέτη παρασκευής υδροξυαπατίτη, με υγρή μέθοδο μέσω αντίδρασης υδροξειδίου του ασβεστίου και φωσφορικού οξέος η χημική εξίσωση της αντίδρασης είναι η ακόλουθη:

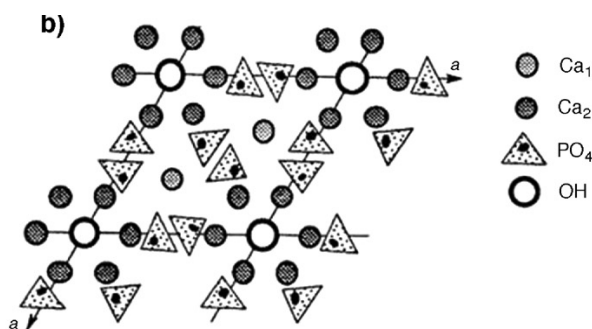


Βιβλιογραφικά έχουν προταθεί πολλοί διαφορετικοί τρόποι εξέλιξης αυτής της αντίδρασης ανάλογα με την απλότητα του συστήματος, την θερμοκρασία, το pH, τις συγκεντρώσεις των ιόντων που αντιδρούν, το ρυθμό προσθήκης των αντιδρώντων και τον υπερκορεσμό των τελικών αλάτων στο διάλυμα. Αυτοί είναι μερικοί από τους παράγοντες που διαφοροποιούν τα ενδιάμεσα προϊόντα. Ακόμα ο τρόπος δημιουργίας των αρχικών φύτρων (πυρήνωση ή εισαγωγή φύτρων υδροξυαπατίτη στα διαλύματα προς αντίδραση) φαίνεται να διαφοροποιεί την ταχύτητα, την θερμοκρασία και κατά προτίμηση σχηματιζόμενες φάσεις.

6.2.4 Φάσεις του Φωσφορικού Ασβεστίου

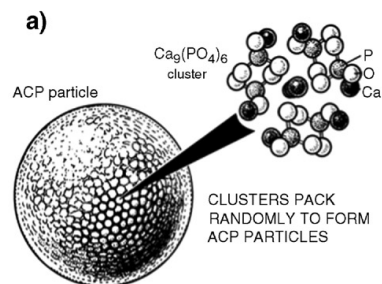
Κατά την μελέτη του συστήματος $\text{Ca(OH)}_2 - \text{H}_3\text{PO}_4$ απαντάται μεγάλη ποικιλία αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου. Αυτά είναι:

- ✓ Ο υδροξυαπατίτης ($\text{HA} = \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ -κρυστάλλωση στο εξαγωνικό σύστημα-Ca/P=1,67) είναι το πιο σταθερό και λιγότερο διαλυτό από τα άλατα του φωσφορικού ασβεστίου. [2]



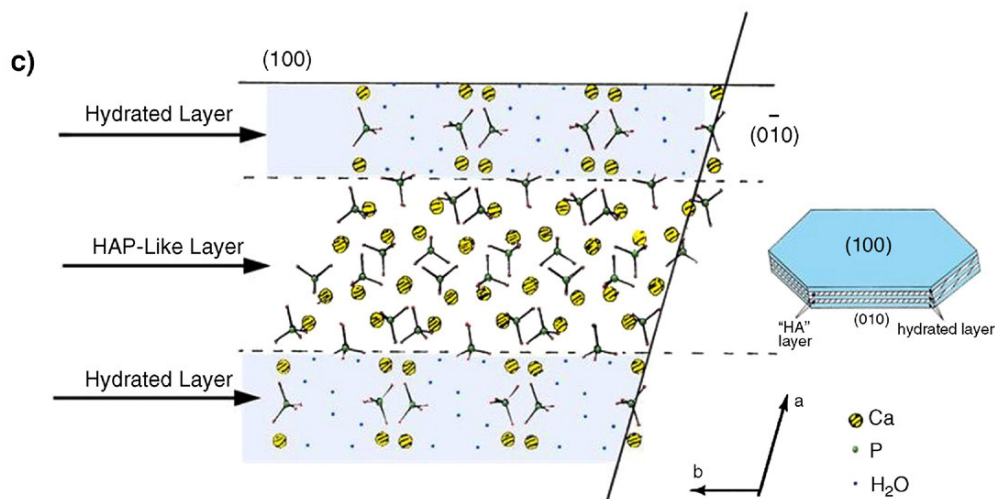
Εικόνα 13. Δομή υδροξυαπατίτη [45]

- ✓ Το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο (ACP) από το οποίο απουσιάζει η τάξη μεγάλης εμβέλειας. Τα άμορφα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου εμφανίζονται σε βασικά pH > 7 και συνήθως ακολουθούνται από τον σχηματισμό πυρήνων φωσφορικού οκτασβεστίου που αποτελεί «πλαίσιο» για την ανάπτυξη υδροξυαπατίτη. Το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο περιέχει εκτός από φωσφορικά ιόντα PO_4^{2-} και ιόντα HPO_4^{2-} . [46]



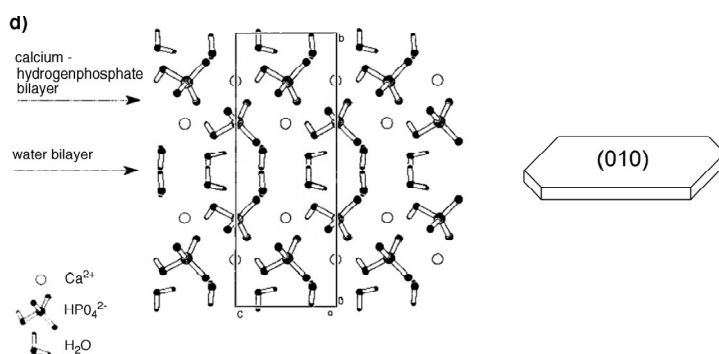
Εικόνα 14. Δομή άμορφου φωσφορικού ασβεστίου[45]

- ✓ Το φωσφορικό οκτασβέστιο (**OCP=Ca₈H₂(PO₄)₆·5H₂O**-τρικλινές-Ca/P=1,3) εμφανίζεται συχνά σαν ενδιάμεση φάση, όταν γίνεται προσπάθεια παραγωγής υδροξυαπατίτη μέσω καταβύθισης, λόγω ομοιοτήτων στην δομή μεταξύ των δύο αλάτων. Η δομή του αποτελείται από στοιβάδες απατίτη που διαχωρίζονται από στοιβάδες νερού.



Εικόνα 15. Δομή φωσφορικού οκτασβεστίου[45]

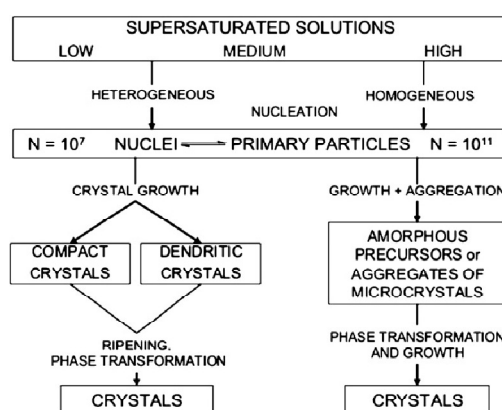
- ✓ Το ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο (μπρουσίτης) (**DCPD = CaHPO₄·2H₂O**-μονοκλινές-Ca/P=1) αποτελείται από παράλληλες διασυνδεδεμένες αλυσίδες ομάδων φωσφορικού ασβεστίου που σχηματίζουν φύλλα, με μόρια νερού μεταξύ αυτών. Η ένωση αυτή σχηματίζεται κατά προτίμηση σε θερμοκρασίες δωματίου ή χαμηλότερες και όξινο pH. Σε αυτές τις συνθήκες κρυσταλλώνεται αυθόρμητα χωρίς να προηγηθούν πρόδρομες φάσεις. Η παρουσία του άλατος αυτού σε «ανώριμα» οστά αποδεικνύει ότι αποτελεί πρώιμη φάση του υδροξυαπατίτη.



Εικόνα 16. Δομή ένυδρου φωσφορικού διασβεστίου[45]

- ✓ Το φωσφορικό δι-ασβέστιο (μονετίτης) (**DCP=CaHPO₄-τρικλινές-Ca/P=1**) απαντάται συνήθως στην ένυδρη μορφή του (βλ. DCPD) μπορεί όμως να μετατραπεί στην άνυδρη μέσω απλής θερμικής κατεργασίας. Είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό (διαλυτότητα 0.02g/110ml στους 25 °C).[47]
- ✓ Το φωσφορικό τετρασβέστιο (**TTCP=Ca₄P₂O₉-μονοκλινές**) σχηματίζεται γενικά σε πολύ υψηλές T >1300° C και αποτελεί το μόνο φωσφορικό αλάτι του ασβεστίου με λόγο Ca/P μεγαλύτερο από του υδροξυαπατίτη. [48]
- ✓ Το φωσφορικό τριασβέστιο (**α-,β-TCP=Ca₃(PO₄)₂**) εμφανίζεται σε διάφορες πολυμορφικές δομές. Από αυτές η α- και β- μπορούν να σχηματιστούν σε συνθήκες περιβάλλοντος ενώ για τον σχηματισμό της β- μπορεί να συμβεί σταθεροποίηση με ιόντα. Η ένωση αυτή γενικά δεν παρατηρείται σε υδατικά διαλύματα καθώς σαν ένωση είναι ασταθής στο νερό και σχηματίζεται σε υψηλές θερμοκρασίες.[4] Για τον λόγο αυτόν προκύπτοντα προϊόντα με λόγο Ca/P= 1,5 δεν θεωρούνται φωσφορικό τριασβέστιο αλλά απατίτης με ατέλειες πλέγματος. [2],[49]

6.3 Σχηματισμός υδροξυαπατίτη με υγρές μεθόδους



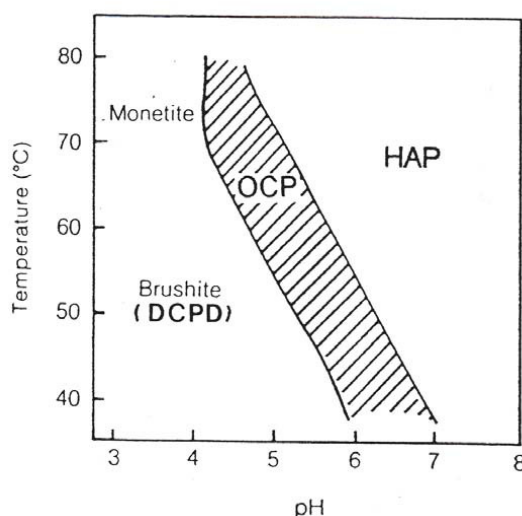
Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση των πιθανών διαδρομών κρυστάλλωσης αλάτων από υπερκορεσμένα διαλύματα[45]

Οι προσπάθειες παρασκευής του υδροξυαπατίτη μέσω καταβύθισης (precipitation) από διαλύματα, συνήθως γίνεται με την χρήση πρόδρομων διαλυμάτων πολύ πιο υπερκορεσμένων από τα βιολογικά υγρά του οργανισμού. Ο βασικός λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι η έμφυτη δυσκολία στην αντίχνευση της ακριβούς στιγμής

κατά την οποία το διάλυμα φτάνει σε υπερκορεσμό που σηματοδοτείται με την καταβύθιση του πρώτου φύτρου καθώς στις διαστάσεις αυτές το άλας είναι ακόμα αόρατο μέσα στο διάλυμα και δεν γίνεται ορατό πρώτου καταβυθιστεί σημαντική ποσότητα αυτού. Σε συνθήκες υψηλού υπερκορεσμού η καταβύθιση του άλατος γίνεται με τρόπο που προσομοιάζει την ομοιογενή πυρήνωση. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ο σχηματισμός του υδροξυαπατίτη προκύπτει μέσα από πρόδρομες φάσεις.

Στο μελετούμενο σύστημα βάσης $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και ασθενούς οξέος H_3PO_4 υπάρχει μεγάλη πληθώρα παραγόντων που επηρεάζουν τόσο τα ενδιάμεσα προϊόντα όσο και τις τελικές φάσεις φωσφορικών αλάτων που προκύπτουν. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, οι συγκεντρώσεις των ιόντων που αντιδρούν, ο ρυθμός προσθήκης των αντιδρώντων και ο βαθμός υπερκορεσμού κάτω από τον οποίο παράγονται τα τελικά άλατα είναι μερικοί από τους παράγοντες που πρέπει να ρυθμιστούν για να προκύψει ως τελικό προϊόν υδροξυαπατίτης.

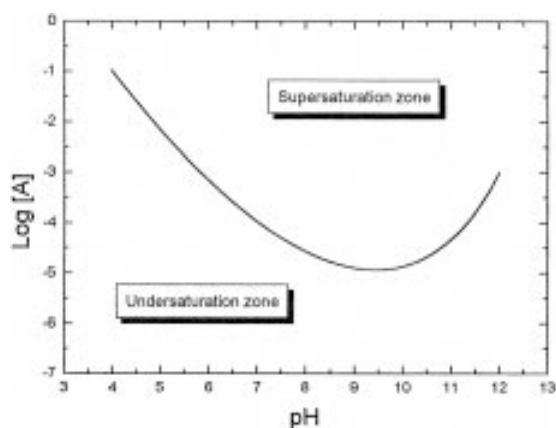
Μια πρώτη πηγή πληροφοριών για την περιοχή pH και θερμοκρασιών στην οποία σχηματίζεται αυθόρμητα υδροξυαπατίτης δίνεται από διαγράμματα όπως το ακόλουθο. Ενδεικτικά παρατίθεται ένα διάγραμμα φωσφορικών αλάτων παραγόμενων από υπερκορεσμένο διάλυμα στο οποίο φαίνονται τα παραγόμενα φωσφορικά άλατα σε σχέση με την θερμοκρασία και το pH. Σε θερμοκρασίες γύρω από τους 40° ο υδροξυαπατίτης σχηματίζεται αυθόρμητα αντί των άλλων φάσεων για pH υψηλότερο του 7. Είναι δηλαδή απαραίτητο τα δύο αντιδρώντα να έρθουν σε επαφή μέσα σε διάλυμα βασικού pH.



Εικόνα 18. Ενδεικτικό διάγραμμα παραγόμενων φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου συναρτήσει θερμοκρασίας και pH [2]

Η ωθούσα δύναμη που ελέγχει την διάλυση και καταβύθιση σχετίζεται με τα επίπεδα κορεσμού του υδατικού διαλύματος στο άλας, τα οποία καθορίζονται με βάση την θερμοδυναμική διαλυτότητα του. Το προϊόν της θερμοδυναμικής διαλυτότητας, περιγράφει την κατάσταση ισορροπίας μεταξύ του άλατος και τις υδατικής φάσης. Η ισορροπία αυτή για ένα προϊόν ελέγχεται από την αντίδραση από την οποία παράγεται. Η διαλυτότητα ενός άλατος με δεδομένη χημική δομή σε υδατικό διάλυμα, μπορεί να περιγραφεί ικανοποιητικά μέσω των αναλυτικών συγκεντρώσεων των θετικών και αρνητικών ιόντων που λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση.

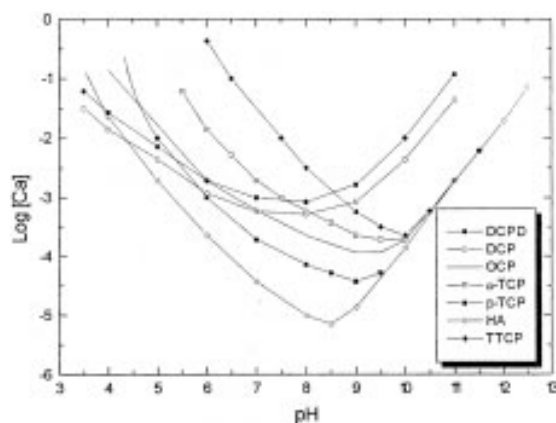
Η περιγραφή της συμπεριφοράς των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου γίνεται μέσω της διαλυτότητάς τους για την οποία το pH παίζει βασικό ρόλο. Η γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ αυτών των μεταβλητών καλείται διάγραμμα διαλυτότητας και παρουσιάζει τα διαδοχικά σημεία ισορροπίας με την μορφή καμπύλης στα οποία το διάλυμα είναι κορεσμένο ως προς το συγκεκριμένο άλας. Η καμπύλη αυτή περικλείεται από μια περιοχή στην οποία το διάλυμα είναι υπερκορεσμένο στο άλας (πάνω από την καμπύλη κορεσμού) και μια περιοχή στην οποία είναι ακόρεστο (κάτω από την καμπύλη κορεσμού). [50]



Εικόνα 19. Διάγραμμα διαλυτότητας τυχαίου άλατος AX

Για τα φωσφορικά άλατα, με βάση τον κανόνα φάσεων του Gibbs, για ένα τριμερές σύστημα δύο φάσεων, ενός στερεού άλατος και μίας υγρής φάσης (διαλύματος) σε ισορροπία υπό συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας έχει ένα βαθμό ελευθερίας.

Οι καμπύλες διαλυτότητας των προϊόντων αλάτων του συστήματος $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ απεικονίζονται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 20. Ισόθερμες καμπύλες διαλυτότητας διαφορετικών αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου σε ισορροπία με το μητρικό διάλυμα για το τριμερές σύστημα $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ στους 37° C σε απεικόνιση $\log [\text{Ca}]$ ως προς το pH.[50]

Από το διάγραμμα διαλυτότητας της προηγούμενης εικόνας μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι ισόθερμες καμπύλες έχουν αρνητική κλίση στην ουδέτερη και όξινη περιοχή, γεγονός που μεταφράζεται ως αύξηση της διαλυτότητας των ενώσεων καθώς το pH μειώνεται. Ο βαθμός της κλίσης δίνει μια εικόνα της αύξησης της διαλυτότητας του άλατος με την μείωση του pH. Ακόμα, οι καμπύλες δίνουν με αυτόν τον τρόπο μια εικόνα της βασικότητας του κάθε άλατος, καθώς πιο βασικό άλας θα παρουσιάζει πιο μεγάλη διαλυτότητα από ένα πιο όξινο για ίση μείωση του pH. Η ιδιότητα ενός άλατος να έχει μικρή διαλυτότητα είναι που το καθιστά σταθερό σε διάλυμα ορισμένων συνθηκών. Για τον λόγο αυτό ο σχηματιζόμενος υδροξυαπατίτης, που είναι το άλας με την μικρότερη διαλυτότητα από τα υπόλοιπα φωσφορικά άλατα σε βιομιμητικές συνθήκες (βασικό pH, θερμοκρασία μέχρι 40°) μετά την σύνθεση του δεν διαλύεται εύκολα μέσα στο διάλυμα εφόσον οι συνθήκες δεν μεταβληθούν δραματικά.

Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν τα διαγράμματα διαλυτότητας, την σχετική σταθερότητα και την αντιδραστικότητα διάφορων αλάτων είναι ο λόγος ασβεστίου προς φώσφορο (Ca/P), η θερμοκρασία ή και η επίδραση του σχηματισμού ανθρακικών (CO_3^{2-}).

Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας, η διαλυτότητα των αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου μειώνεται και η μεταβολή αυτή είναι πιο αισθητή όσο πιο όξινο είναι το υδατικό διάλυμα. Παρ' όλα αυτά σε θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 37°C η επίδραση της θερμοκρασίας στις ισόθερμες καμπύλες δεν είναι σημαντική. Έτσι οι καμπύλες των ισόθερμων για τους 25°C μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση της θερμοδυναμικής συμπεριφοράς των αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου και για τους 37°C όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμες αντίστοιχες ισόθερμες καμπύλες διαλυτότητας. [50]

Ο σχηματισμός του CO_3^{2-} μέσα στο διάλυμα μπορεί να τροποποιήσει την συμπεριφορά της διαλυτότητας. Η διαλυτότητα του υδροξυαπατίτη σε ισορροπία με το κορεσμένο καθαρό διάλυμα νερού αυξάνεται αξιοσημείωτα πάνω από συγκεκριμένη τιμή pH. Η αύξηση της διαλυτότητας σχετίζεται με τον σχηματισμό συμπλεγμάτων ανθρακικού ασβεστίου, στα οποία οφείλεται η μεταβολή του λόγου Ca/P (μείωση του «ελεύθερου» για να λάβει μέρος στην κύρια αντίδραση ασβεστίου). Σε δεδομένες συνθήκες, η διαλυτότητα του φωσφορικού ασβεστίου αυξάνεται σε υψηλές τιμές pH μέχρι ενός σημείου, του σημείου όπου το ανθρακικό ασβέστιο αποτελεί την λιγότερη ευδιάλυτη στερεή φάση του διαλύματος. Σε αυτό το σημείο μειώνεται το εύρος της σταθερότητας των φωσφορικών αλάτων και το φαινόμενο αυτό καλείται «apatite stability field reduction». Ακόμα, η ύπαρξη διοξειδίου του άνθρακα μέσα στο διάλυμα, και ειδικά η μερική πίεση του, επηρεάζει την θερμοδυναμική συμπεριφορά του συστήματος και το κάνει ακόμα πιο περίπλοκο.

Μεταβαλλόμενου του λόγου Ca/P σε διάλυμα μπορούν να παρατηρηθούν διαφορετικά προϊόντα αλλά και μεταβολές του pH. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι στο σύστημα το pH στο τριμερές σύστημα ρυθμίζεται αποκλειστικά μέσω της προσαρμογής της ποσότητας οξέος (H_3PO_4) ή βάσης ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) που προστίθενται στο διάλυμα. Έτσι για pH=8 η απαραίτητη τιμή του λόγου Ca/P για τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη είναι 1 και ακόμα μεγαλύτερος για πιο μεγάλα pH. [50]

Τέλος, ο σχηματισμός φάσεων δεν συνεπάγεται και την διατήρησή τους. Με την μεταβολή του pH στο διάλυμα παραγωγής των φωσφορικών αλάτων, η τελική φάση μπορεί να μετασχηματιστεί. Επομένως αν το pH πέσει κάτω από το 4.3 η θερμοδυναμικά σταθερότερη φάση είναι το DCPD ενώ για $\text{pH} > 6,4$ η σταθερότερη είναι το φωσφορικό οκτασβεστίο OCP και ο ρυθμός μετασχηματισμού του υδροξυαπατίτη είναι ανάλογος με την αύξηση του pH. Με την αύξηση του pH, το DCPD έχει δείχθει ότι μετασχηματίζεται σε OCP μέσω αντίδρασης που περιλαμβάνει δύο διακριτά στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την περίοδο σχηματισμού πυρήνων φωσφορικού οκτασβεστίου και το δεύτερο την ανάπτυξη του φωσφορικού οκτασβεστίου με ίσως διάλυση του ένυδρου φωσφορικού διασβεστίου. Ακολουθεί ένα αργό στάδιο κατά το οποίο συμβαίνουν σχετικά μικρές αλλαγές στην συνολική συγκέντρωση των αλάτων φωσφορικού ασβεστίου [49].

6.3.1 Η απλή περίπτωση: καταβύθιση υδροξυαπατίτη μέσω απλής εξουδετέρωσης

Πολλές ερευνητικές προσπάθειες έχουν γίνει για την παρασκευή βιοκεραμικού υδροξυαπατίτη μέσω εξουδετέρωσης της ισχυρής βάσης υδροξειδίου του ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) από το ασθενές ορθοφωσφορικό οξύ (H_3PO_4) και καταβύθισης του τελικού προϊόντος υπό την μορφή ιζήματος. Αν και ο υδροξυαπατίτης είναι θερμοδυναμικά σταθερότερος από τα άλλα προϊόντα, είναι γενικά αποδεκτό πως άλλες φάσεις όπως το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο ACP ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$), το ένυδρο φωσφορικό διασβεστίο DCPD ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) και το φωσφορικό οκτασβεστίο OCP ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) καθώς και ατελώς σχηματισμένος απατίτης μπορεί να συμμετέχουν στην αντίδραση.

Σε κινητικές μελέτες καταβύθισης αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου που έχουν γίνει σε διαλύματα πιο υπερκορεσμένα από τα τυπικά βιολογικά διαλύματα, προηγείται του σχηματισμού του απατίτη η καταβύθιση μιας ή περισσότερων πρόδρομων φάσεων όπως το ACP, στο οποίο δεν παρατηρείται καμία τάξη ευρείας κλίμακας. Η σύνθεση αυτής της φάσης φαίνεται να βασίζεται στις συνθήκες καταβύθισης και συχνά εμφανίζεται σε έντονα υπερκορεσμένα διαλύματα με $\text{pH} > 7$. Πειραματικά έχει δείχθει ότι ο αρχικός σχηματισμός ACP μπορεί να ακολουθείται από την πυρήνωση OCP, μια φάση που λειτουργεί ως πλαίσιο για την ανάπτυξη της φάσης του υδροξυαπατίτη. [49], [51] Ο μετασχηματισμός μετάβασης από το άμορφο προϊόν στο φωσφορικό οκτασβεστίο αποτελεί κατά κοινή ομολογία μια ασυνεχή διαδικασία. Το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο περιέχει εκτός από φωσφορικά ιόντα PO_4^{2-} και ιόντα HPO_4^{2-} . Αυτή η υπόθεση στηρίζεται έμμεσα από το γεγονός ότι σε επαφή με το μητρικό διάλυμα έχει φανεί να δίνει και προϊόντα απατίτη ατελή ως προς τη δομή τους (DA) εκτός από το φωσφορικό οκτασβεστίο [51]. Υδρόλυση του φωσφορικού οκτασβεστίου δίνει υδροξυαπατίτη και περαιτέρω υδρόλυση του υδροξυαπατίτη έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ατελών ως προς την δομή τους απατίτες (DA) [51]. Υπάρχουν πειραματικές αναφορές φασμάτων περίθλασης που αποδεικνύουν την ύπαρξη φωσφορικού οκτασβεστίου σε διαλύματα με pH που πλησιάζει το φυσιολογικό [52],[49].

Με την αύξηση της οξύτητας του διαλύματος φαίνεται πως η προτιμητέα πρόδρομη φάση είναι η DCPD. Το συγκεκριμένο φωσφορικό άλας του ασβεστίου αποτελεί την λιγότερο σταθερή ένωση με την μεγαλύτερη διαλυτότητα και σχηματίζεται κατά προτίμηση σαν ενδιάμεσο προϊόν-στάδιο σε καταβύθιση που συμβαίνει σταδιακά

[49]. Τα άλατα με σειρά αύξουσας διαλυτότητας είναι υδροξυαπατίτης, φωσφορικό τριασβέστιο, φωσφορικό οκτασβέστιο, ένυδρο φωσφορικό διασβέστιο.

Άλλες ερευνητικές προσπάθειες έχουν καταλήξει σε πρόδρομα άλατα με σύσταση που προσεγγίζει αυτή του φωσφορικού τριασβεστίου [52]. Γενικά όμως η ένωση δεν θεωρείται σταθερή σε χαμηλές θερμοκρασίες και υδατικό περιβάλλον και οι ενδείξεις ύπαρξης της συχνά δεν είναι αξιόπιστες και χρήζουν εναλλακτικής ερμηνείας [4],[44].

Στην περίπτωση μίξης αντιδρώντων με χαμηλό λόγο ιόντων ασβεστίου/ιόντων φωσφόρου ή λόγω μεγάλου ρυθμού προσθήκης ορθοφωσφορικού οξέος υπάρχουν αναφορές για σχηματισμό υδροξυαπατίτη ελλιπή σε ασβέστιο ως προϊόντος της αντίδρασης $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και H_3PO_4 . Τα OH^- που είναι παρόντα στο διάλυμα υδροξειδίου του ασβεστίου, καταναλώνονται με μεγάλη ταχύτητα από το φωσφορικό οξύ είτε λόγω ταχείας προσθήκης είτε λόγω χαμηλού λόγου Ca/P , χαμηλώνοντας το pH στον κύριο όγκο του διαλύματος ή και τοπικά. Η ανεπάρκεια σε ασβέστιο, μπορεί να εξηγηθεί μέσω της μείωσης του ρυθμού της διάλυσης του υδροξειδίου του ασβεστίου, που οφείλεται στην προετοιμασία σε χαμηλή θερμοκρασία, και στην ταχεία προσθήκη του φωσφορικού οξέος που καθιστά αδύνατη την διατήρηση του pH σε αρκετά υψηλές τιμές κατά την αντίδραση. Η ανάπτυξη μη στοιχειομετρικών κρυστάλλων μπορεί να αναιρεθεί και να επιτευχθεί η επιθυμητή στοιχειομετρία μετά από μεγάλης διάρκειας ωρίμανση [44]. Σε ορισμένες έρευνες αποδείχθηκε ότι ατελείς απατίτες μπορούν να σχηματιστούν κάτω από συνθήκες συνεχούς υπερκορεσμού [49].

Εκτός από την παραγωγή αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου μέσω εξουδετέρωσης στο τριμερές σύστημα $(\text{Ca}(\text{OH})_2)-(\text{H}_3\text{PO}_4)-\text{H}_2\text{O}$, έχουν χρησιμοποιηθεί ερευνητικά ως αντιδραστήρια – πηγές ιόντων ασβεστίου και φωσφορικών, ποικιλία συνδυασμών αλάτων, οξέων και βάσεων. Εκτός εξαιρέσεων (λ.χ. συστήματα που περιέχουν φώσφορο), τα άλατα αυτά δεν έχουν επίδραση στις σχηματιζόμενες φάσεις. Η μόνη διαφοροποίηση είναι η δημιουργία ανάγκης απόπλυσης του τελικού προϊόντος για να γίνει απομάκρυνση των παραπροϊόντων πριν την ξήρανση σε σκόνη. Μερικά παραδείγματα περιπτώσεων τέτοιων συστημάτων είναι $\text{CaCl}_2-\text{Na}_3\text{PO}_4-\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2-\text{K}_2\text{HPO}_4-\text{H}_2\text{O}$ και $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2-\text{K}_3\text{PO}_4-\text{H}_2\text{O}$. Και τα τρία αυτά συστήματα βρίσκουν ισορροπία σε pH μεταξύ 7 και 8, δηλαδή σε pH ουδέτερο και ελαφρά βασικό..

Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το σύστημα χλωριούχου ασβεστίου-φωσφορικού νατρίου, με παραπροϊόντα ιόντα νατρίου και χλωρίου περιβάλλον βασικού pH η αντίδραση παραγωγής του υδροξυαπατίτη φαίνεται να ακολουθεί την ίδια αλληλουχία μετασχηματισμών που υπήρχε στο αρχικό σύστημα $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$. Η καταβύθιση των αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου γίνεται σε διαδοχικά στάδια που περιλαμβάνουν τον σχηματισμό άμορφου φωσφορικού ασβεστίου με μικρή ταυτόχρονη πτώση του pH, σταθεροποίηση της φάσης του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου, την ανάπτυξη φωσφορικού οκτασβεστίου (και εδώ πτώση του pH) κ.ο.κ.[53].

6.3.2 Εναλλακτικές προσπάθειες παραγωγής υδροξυαπατίτη

- ✓ Μέσω ετερογενούς πυρήνωσης σε κρύσταλλα-φύτρα

Για να διευκολυνθεί η αντίδραση ως προς ένα ορισμένο προϊόν, μια τεχνική που συχνά χρησιμοποιείται είναι η τέλεση της αντίδρασης μεταξύ των αντιδραστηρίων που δίνουν τον τελικό υδροξυαπατίτη, σε περιβάλλον που έχουν ήδη προστεθεί σπόροι (seeds) υδροξυαπατίτη. Η προσθήκη αυτή επηρεάζει τον μηχανισμό της αντίδρασης καθώς μεταβάλλει τον μηχανισμό πυρήνωσης του συστήματος. Σε ένα απόλυτα ελεύθερο από εξωτερικές προσμίξεις διάλυμα υψηλού υπερκορεσμού, η πυρήνωση των αλάτων προσεγγίζει την ομογενή πυρήνωση. Η ομογενής πυρήνωση ενεργοποιείται μέσα από έντονες τοπικές διακυμάνσεις στην πυκνότητα του υπερκορεσμένου μέσου. Από τις διακυμάνσεις σχηματίζονται συστοιχίες μορίων από τα οποία ξεκινάει η ανάπτυξη του άλατος. Όταν στο διάλυμα περιέχονται άλλα μόρια, κρύσταλλοι ή ακαθαρσίες, συμβαίνει ετερογενής πυρήνωση και οι σχηματιζόμενες συστοιχίες μορίων της νεοσχηματιζόμενης φάσης «κολλούν» και αναπτύσσονται πάνω στην επιφάνεια του προσθέτου που βρίσκεται εντός του υπερκορεσμένου διαλύματος [54].

Η ετερογενής πυρήνωση μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρεις διαδοχικές διαδικασίες: τον σχηματισμό ενός προσροφημένου στρώματος πάνω στο υπόστρωμα από την αρχική υπερκορεσμένη φάση, τον σχηματισμό ενός κρίσιμου πυρήνα από τα προσροφημένα άτομα και την ανάπτυξή του σε μέγεθος μεγαλύτερο του κρίσιμου [54].

Η ετερογενής πυρήνωση είναι μεγάλης σημασίας στις διεργασίες σύνθεσης βιοαλάτων. Κατά την σύνθεση αλάτων μέσα στον οργανισμό, σε επαφή με το μητρικό διάλυμα απ' όπου θα προκύψει το άλας βρίσκονται δεκάδες ουσίες οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως εστίες πυρήνωσης όπως πρωτεΐνες, κύτταρα, ιστοί και εμφυτεύματα. Η ύπαρξη άλλων μορίων ή ακαθαρσιών σε ένα διάλυμα επηρεάζει σημαντικά τον ρυθμό πυρηνογένεσης αν και οι επιπτώσεις δεν είναι ίδιες σε κάθε περίπτωση και μπορούν να λειτουργήσουν είτε επιταχυντικά είτε επιβραδυντικά ανάλογα το σύστημα και την εξωτερική ουσία[55].

Σαν φύτρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε υδροξυαπατίτης [56] είτε κάποια από τις πρώιμες φάσεις του φωσφορικού ασβεστίου όπως το DCPD [52]. Τυπικοί παρεμποδιστές που μειώνουν τον ρυθμό ανάπτυξης κρυστάλλων-φύτρων σε υπερκορεσμένα διαλύματα μπορεί να είναι τελικώς υπεύθυνοι για τον σχηματισμό φάσεων φωσφορικού ασβεστίου, όταν ακινητοποιηθούν πάνω σε αρχικά αδρανείς επιφάνειες. Αυτό μπορεί να είναι παράγοντας στην ρύθμιση της κρυσταλλικής ανάπτυξης σε πολλά βιολογικά συστήματα [49].

Με την χρήση φύτρων DCPD σε διάλυμα με $pH < 6$ παρατηρήθηκε μεγέθυνση των κόκκων του με ανάπτυξη πάνω στα φύτρα DCPD και τράχυνση της επιφανείας των φύτρων. Αυτό συνεπάγεται περεταιίρω αύξηση του υλικού με αύξηση της συνολικής καταβυθισμένης ποσότητας των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου πάνω στα φύτρα, δεκαπέντε φορές σε σχέση με την αρχική ποσότητα φύτρων που προστέθηκε στο διάλυμα [52]. Με την μεταβολή του pH σε πιο μεγάλες τιμές μπορεί να

ακολουθήσει μετασχηματισμός του DCPD σε OCP μέσω σχηματισμού πυρήνων φωσφορικού οκτασβεστίου και ανάπτυξης του φωσφορικού οκτασβεστίου, με ενδεχόμενη ταυτόχρονη διάλυση του ένυδρου φωσφορικού διασβεστίου. Σε διαλύματα με κρυστάλλους DCPD, ο μετασχηματισμός του σε φωσφορικό οκτασβεστίο, επηρεάζεται από την επιφανειακή τραχύτητα της αρχικής φάσης [49]. Η λειτουργία του OCP σαν πρόδρομη φάση για τον μετασχηματισμό σε υδροξυαπατίτη είναι γνωστή.

Με την χρήση φύτρων υδροξυαπατίτη σε διαλύματα φωσφορικών ιόντων και ιόντων ασβεστίου υψηλού υπερεκρεσμού, παρατηρείται σταδιακή αύξηση των καταβυθισμένων αλάτων φωσφορικού ασβεστίου. Εκτός της φάσης του υδροξυαπατίτη, επιβεβαιώνεται μέσω XRD και η παρουσία πρόδρομης φάσης φωσφορικού οκτασβεστίου [52]. Ακόμα, κάτω από συνθήκες συνεχούς υπερκορεσμού έχουν ανιχνευτεί [49] ατελείς απατίτες με μη στοιχειομετρικό συντελεστή εξαρτώμενους από το pH του μέσου στο οποίο γίνεται η ανάπτυξη της φάσης.

Σε διαλύματα με χαμηλή συγκέντρωση φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου (διαλύματα χαμηλού υπερεκρεσμού), υπερεκρεσμένων μόνο αναφορικά με την επιθυμητή φάση του υδροξυαπατίτη, που αποτελεί και την θερμοδυναμικά σταθερότερη φάση, ο μηχανισμός της ανάπτυξης του υδροξυαπατίτη αλλάζει και είναι δυνατή η ανάπτυξη μακροσκοπικών προϊόντων καθαρού υδροξυαπατίτη πάνω σε φύτρα υδροξυαπατίτη χωρίς τον σχηματισμό πρόδρομων φάσεων σε pH περίπου 7,4 [52].

Σημαντικό παράγοντα αποτελεί η αρχική επιφανειακή τροποποίηση και οι διαδικασίες ανταλλαγής ιόντων που εμπλέκουν ιόντα H^+ και Ca^{2+} , μετά από τον εμβολιασμό με τους κρυστάλλους-φύτρα των υπερεκρεσμένων διαλυμάτων. Το μέγεθος της επίδρασης αυτών των παραγόντων είναι φανερό ότι εξαρτάται από την επιφάνεια του κρυστάλλου-φύτρου. Έτσι η εισαγωγή κρυσταλλιτών υδροξυαπατίτη μεγάλης ειδικής επιφάνειας μέσα σε διαλύματα φωσφορικών ιόντων του ασβεστίου μπορεί να συνοδευτούν από πολύ ταχείς αντιδράσεις ιονεναλλαγής μέσα στις οποίες τα ιόντα H^+ και Ca^{2+} εκροφούνται από την επιφάνεια ή επαναπροσορφούνται. Καθώς η αντίδραση προχωράει προς την ισορροπία, εφ' όσον χρησιμοποιηθούν στερεά πολύ μεγάλης επιφάνειας, τότε μεγάλες ποσότητες ιόντων φωσφορικών και ασβεστίου μπορούν να συμμετέχουν σ' αυτές τις διαδικασίες ανταλλαγής, ώστε να ρυθμίσουν την επίτευξη ισορροπίας. Τα ενεργά κέντρα ανάπτυξης τείνουν να εξαλειφθούν καθώς οι κρύσταλλοι υφίστανται τελειοποίηση του πλέγματός τους.

✓ Σχηματισμός κρυστάλλων υπό την επίδραση οργανικών μορίων

Σαν κέντρα ετερογενούς πυρήνωσης και ανάπτυξης εκτός από κρυστάλλους-φύτρα, μπορούν να λειτουργήσουν και μακρομόρια τα οποία συμπεριφέρονται ως τύποι στην κρυστάλλωση των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου. Στην περίπτωση ύπαρξης μακρομορίων μεγάλης ακαμψίας ή και πολύ-ηλεκτρολυτών ή πρωτεϊνών (που παρουσιάζουν τεταρτοταγή μοριακή δομή, όπως μερική διαμόρφωση σε φύλλα β), οι θέσεις αλληλεπίδρασης με την αναπτυσσόμενη κρυσταλλική φάση είναι σε δύο διαστάσεις. Και επομένως η ύπαρξη στερεοχημικής συμβατότητας είναι προαπαιτήση για την αναγνώριση συγκεκριμένων κρυσταλλικών επιπέδων από την πρωτεΐνη. Ως στερεοχημική συμβατότητα μπορεί να οριστεί η κατάσταση στην οποία

παρατηρείται, οι αποστάσεις μεταξύ κατιόντων στα κρυσταλλικά επίπεδα που αναπτύσσονται, να προσεγγίζουν κατά πολύ τις αποστάσεις μεταξύ των λειτουργικών ομάδων πάνω στον κλώνο της πρωτεΐνης. Λόγω του πλεονάσματος καρβοξυλικών ριζών μέσα στους ιστούς, οι μελέτες ξεκίνησαν με σκοπό τον έλεγχο των διαδικασιών ανάπτυξης με απλούστερα πολυμερή σαν πολυηλεκτρολύτες για να ελέγξουν την κρυστάλλωση.

Σε μακρομόρια με μερική διαμόρφωση σε β-φύλλα μπορεί να αναγνωρίζονται κρυσταλλικά επίπεδα των φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου με μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτό οφείλεται στη στερεοχημική αντιστοιχία των αποστάσεων μεταξύ των ανιοντικών λειτουργικών ομάδων των μακρομοριακών δομών και τις σφαίρες ιόντων του ασβεστίου που προεξέχουν από τα επηρεαζόμενα επίπεδα.

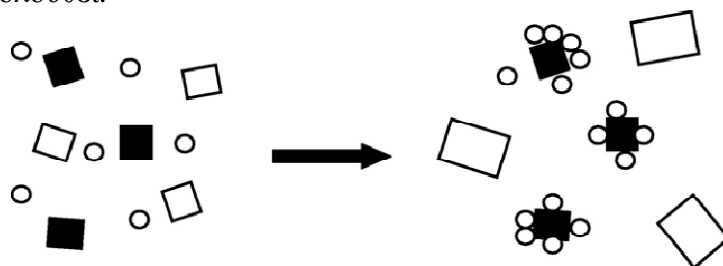
Τα μακρομόρια μπορούν να διευκολύνουν ή να καθυστερήσουν την κρυστάλλωση των αλάτων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα μόρια προσθέτων σε διαλύματα μπορεί να συμπεριφερθούν σαν κέντρα ετερογενούς πυρήνωσης, ενώ όταν η συγκέντρωση του προσθέτου αυξηθεί, τα ίδια μόρια μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη εκκολλαπτόμενων πυρήνων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι πολυηλεκτρολύτες και πρωτεΐνες σε διαλύματα δρουν σαν παρεμποδιστές αλλά όταν «σταθούν» πάνω στις επιφάνειες μπορεί να προωθήσουν την ανάπτυξη αλάτων.

Ένα παράδειγμα της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων των οργανικών πολυηλεκτρολυτών είναι η περίπτωση μετασχηματισμού του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου από διάλυμα υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μακρομορίων πολυηλεκτρολύτη. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπήρχαν ενδείξεις ότι η ύπαρξη του πολυηλεκτρολύτη διευκόλυνε τον μετασχηματισμό φάσης. Αντίθετα, η ίδια ουσία σε υψηλές συγκεντρώσεις παρεμπόδιζε τον μετασχηματισμό φάσης. Η αποτελεσματικότητα της ουσίας φάνηκε να εξαρτάται από το είδος και το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Η επίδραση εξηγήθηκε μέσω διαφοροποίησης στον τρόπο με τον οποίο συμβαίνει προσρόφιση των πολυηλεκτρολυτών, στην διεπιφάνεια άμορφου φωσφορικού ασβεστίου και του υγρού.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα μόρια των πολυμερών προσροφούνται σε τυχαία διάρθρωση και η διαδικασία είναι αντιστρεπτή. Σαν αποτέλεσμα η συσσωμάτωση των κρυσταλλιτών του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου καθυστερεί και ένας μεγάλος αριθμός ισχυρά φορτισμένων, μικρού μεγέθους σωματιδίων σχηματίζεται, στα οποία συγκεντρώνονται αντίθετα φορτισμένα ιόντα Ca^{2+} ή HPO_4^{2-} . Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται με αποτελεσματικό τρόπο κέντρα πυρήνωσης της νέας κρυσταλλικής φάσης. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις πολυηλεκτρολυτών απλώνονται και διατάσσονται σε επίπεδες θέσεις στις επιφάνειες των σωματιδίων του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου. Αυτό το είδος της προσρόφισης θεωρείται μη αντιστρεπτή και παρεμποδίζει την μεταφορά των ιόντων στις επιφάνειες των μακρομορίων (υλικών αποτύπωσης) και έτσι παρεμποδίζει την πυρήνωση της φάσης του άλατος.

Μικρού μεγέθους οργανικά μόρια μπορούν να επηρεάσουν τις αναπτυσσόμενες φάσεις (και κατ' επέκταση τον μηχανισμό της αντίδρασης), μέσω εκλεκτικής προσρόφισης τους στις επιφάνειες φύτρων ορισμένης φάσης, εμποδίζοντας την ανάπτυξη της και επιτρέποντας σε άλλη φάση να αναπτυχθεί με μεγαλύτερη ευκολία. Πιο συγκεκριμένα, σε διαλύματα υπερκορεσμένα σε δύο ή περισσότερα πολύμορφα ή

σε διαφορετικές ενώσεις των κρυστάλλων (hydrates) επιλεκτική προσρόφηση μιας ακαθαρσίας μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη ενός ή περισσότερων από αυτά. Με αυτό τον τρόπο να ευνοηθεί η ανάπτυξη ενός άλλου πολύμορφου όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 21. Απεικόνιση προσρόφησης ουσίας σε ένα κατά προτίμηση είδος κρυστάλλου [45]

Η αλληλεπίδραση μεταξύ ακαθαρσίας ή προσθέτου και αναπτυσσόμενου κρυστάλλου ποικίλουν από καθαρά ηλεκτροστατικές μέχρι εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις που οφείλονται σε δομική και στερεοχημική συμβατότητα. Επιλεκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να παρουσιαστούν ανάμεσα σε ισχυρά φορτισμένα μικρά μόρια ή επιφανειοδραστικές ουσίες και κρυσταλλογραφικά επίπεδα και γι' αυτό, η ανάπτυξη των επιπέδων δεν είναι ισάξια προς όλες τις κατευθύνσεις. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κρυσταλλογραφικών επιπέδων και ουσιών επηρεάζονται και από παράγοντες όπως η μερική κάλυψη επιφανειακών μορίων του αναπτυσσόμενου κρυστάλλου από ενυδατωμένο στρώμα κατά τόπους ενώ σε άλλες θέσεις θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα είναι εκτεθειμένα. Ο ίδιος μηχανισμός επιλεκτικής προσρόφησης μπορεί να προκαλέσει και επίδραση στην τελική μορφολογία των παραγόμενων κρυστάλλων [45].

Οι τελευταίες ερευνητικές προσπάθειες έχουν γίνει με προσανατολισμό προς την εκτέλεση της κρυστάλλωσης και της ανάπτυξης των αλάτων του φωσφορικού ασβεστίου και ειδικά του υδροξυαπατίτη μέσα από την μέθοδο του sol-gel, η οποία δίνει δυνατότητα καλύτερου ελέγχου της μορφολογίας των παραγομένων προϊόντων. Η σύνθεση των αλάτων γίνεται όσο το μίγμα βρίσκεται σε κατάσταση κολλοειδούς αιωρήματος και κατόπιν της γήρανσης (υδρόλυση για τα μη πυριτικά συστήματα ή συμπύκνωση για τα πυριτικά) το σύστημα μετατρέπεται σε gel μέσα στο οποίο βρίσκεται διεσπαρμένη η φάση του άλατος. Σαν οργανικά κολλοειδή μπορούν να περιγραφούν τα υλικά των οποίων τα σωματίδια αποτελούνται από 1000 μέχρι 10^9 άτομα αυτά τα σωματίδια μπορούν να είναι είτε μακρομόρια είτε συσσωματώματα μορίων μικρού μοριακού βάρους [57]. Η υδρόλυση, γίνεται σε δύο στάδια: τον σχηματισμό και ανάπτυξη πολυμερών συστοιχίων μορίων ή μικρών πρόδρομων σωματιδίων μεγέθους μερικών νανομέτρων και στην συνέχεια η σταθεροποίηση και πήξη του gel [58]

- ✓ Κρυστάλλωση φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου σε πιο πολύπλοκα συστήματα

Όπως προαναφέρθηκε ο μηχανισμός της αντίδρασης και κατ' επέκταση, η δομή και οι ιδιότητες του παραγόμενου υλικού, μπορεί να επηρεαστεί από την ύπαρξη ετερογενών προσμίξεων στο διάλυμα κατά την παρασκευή του. Έχουν γίνει προσπάθειες εκμετάλλευσης των διαφορετικών επιδράσεων με την προσθήκη πολλαπλών προσμίξεων κατά την παρασκευή του τελικού προϊόντος [20][59]. Με τη ρύθμιση του μεγέθους των σωματιδίων, του σχήματος τους, του κρυσταλλικού τους

προσανατολισμού και της πολυμορφικής τους δομής, (ρυθμίσεις που σχετίζονται άμεσα με την πυρήνωση και ανάπτυξη των δομών και τον μηχανισμό που οδηγεί στις τελικές φάσεις που κρυσταλλώνονται) επιτυγχάνεται σημαντικός έλεγχος πάνω στις ιδιότητες των τελικά παραγόμενων βιοαλάτων.

Οργανικές ουσίες όπως το κολλαγόνο τύπου I είναι αποτελεσματικές στον έλεγχο της τροποποίησης των κρυστάλλων. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η μήτρα κολλαγόνου τύπου I δεν έχει την δυνατότητα να οδηγήσει στον σχηματισμό συγκεκριμένων βιοαλάτων από μετασταθή διαλύματα φωσφορικού ασβεστίου, που δεν καταβυθίζονται αυθόρμητα, αλλά απλά παρέχει το οργανωτικό πλαίσιο και τον χωρικό περιορισμό για την κρυσταλλική απόθεση. Αντίθετα πρωτεΐνες διαφορετικής δομής από αυτές του κολλαγόνου μπορεί να συμμετέχουν στην διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων καθώς μετά από ορισμένη επεξεργασία μπόρεσαν να δώσουν την κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη ενώ υπολείμματα (residues) άκρων που προέκυψαν από τις ίδιες πρωτεΐνες φάνηκαν να σταθεροποιούν άμορφη φάση φωσφορικού ασβεστίου και να παρεμποδίζουν την κρυστάλλωση υδροξυαπατίτη [60].

Το κολλαγόνο τύπου I, η βασική πρωτεΐνη των οστών κατέχει ιδιότητες αυτό-διάταξης (self-assembly) και σχηματίζει κλειστούς χώρους μέσα στους οποίους αναπτύσσεται η ανόργανη ενισχυτική φάση. Ποικιλία παραγόντων ελέγχουν την ροή των οργανικών συστατικών και διατηρούν στα απαραίτητα επίπεδα τον υπερκορεσμό των επιθυμητών ιόντων στους σχηματιζόμενους χώρους [60]. Τα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου πυρηνώνονται απευθείας πάνω σε ίνες κολλαγόνου και σε μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την επιφάνεια του κολλαγόνου [61].

Βάση της εργασίας του M. Kikutsi et al κατά την οποία το κολλαγόνο έχει υποστεί επεξεργασία με το φωσφορικό οξύ, πριν λάβει χώρα η αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη, η χημική αντίδραση μεταξύ ναοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη και μορίων κολλαγόνου, είναι ουσιαστική για την αυτό-οργάνωση του συνόλου. Στο οστό τρία μόρια κολλαγόνου σχηματίζουν μια τρισδιάστατη (3 fold) σπειροειδή κατασκευή μέσω δεσμών υδρογόνου. Τα υπολειμματικά αμινοξέα κάθε μορίου κολλαγόνου είναι σχεδόν 1000, 20% από τα οποία έχουν καρβοξυλικές ομάδες ή αμινομάδες στις πλευρικές τους αλυσίδες που κλείνουν προς τα έξω στο τρισδιάστατο σπείρωμα [62]. Η ετερογενής πυρήνωση του υδροξυαπατίτη φαίνεται ότι εξαρτάται από την περιεκτικότητα του συστήματος σε καρβοξυλομάδες και την διευθέτηση τους στο χώρο. Επομένως η πυρήνωση υδροξυαπατίτη αποδεικνύεται να είναι ευαίσθητη σε δομικές διευθετήσεις λειτουργικών ομάδων αυτού του είδους [63]. Τα ιόντα ασβεστίου και φωσφορικά ιόντα που υπάρχουν στην επιφάνεια των ναοκρυστάλλων υδροξυαπατίτη, αυτό-οργανώνονται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιόντων και πλευρικών ομάδων [62].

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την εξάρτηση του μηχανισμού πυρήνωσης και ανάπτυξης του υδροξυαπατίτη από τις πλευρικές ομάδες του κολλαγόνου, έχει μεγάλη σημασία για το σύστημα εάν η κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη ακολουθεί τον σχηματισμό του κολλαγόνου ή εάν οι δύο διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα. Στην περίπτωση ταυτόχρονης ανάπτυξης ινών κολλαγόνου και υδροξυαπατίτη μέσα από κοινό μητρικό διάλυμα, έχει δείχτει ότι είναι δυνατόν ο σχηματισμός του πρώτου ινιδίου κολλαγόνου να συμπέσει με την καταβύθιση άμορφου φωσφορικού ασβεστίου, που θα λειτουργήσει σαν πρόδρομη φάση μετασχηματιζόμενη τελικά σε κρυσταλλική φάση που προσομοιάζει απατίτη [64].

Σε περίπτωση που η εναπόθεση του υδροξυαπατίτη ξεκινάει πάνω σε ήδη σχηματισμένες ίνες κολλαγόνου, από μελέτες του σχηματισμού φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου έχει αποδειχθεί η συνύπαρξη φωσφορικού οκτασβεστίου και υδροξυαπατίτη. Οι δύο φάσεις αναπτύχθηκαν σε pH κυμαινόμενο μεταξύ 6,5 και 7 πάνω σε ίνες κολλαγόνου με προτιμητέο προσανατολισμό (c-άξονας του κρυστάλλου παράλληλος με τις ίνες του κολλαγόνου) [65].

Σε άλλες πειραματικές προσπάθειες [66] παρατηρήθηκε ο σχηματισμός και άλλων πρόδρομων και μετασταθών φάσεων φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου, σε επαφή με το κολλαγόνο όπως ο μπρουσίτης (DCPD) και ο Μονετίτης (DCP). Όπως φαίνεται υπάρχουν ενδείξεις ότι και σε συστήματα μεγαλύτερης πολυπλοκότητας παρατηρούνται μετασταθείς και ενδιάμεσες φάσεις κάνοντας την μελέτη του μηχανισμού της αντίδρασης σχηματισμού υδροξυαπατίτη ένα πολύ ενδιαφέροντα τομέα έρευνας.

6.3.3 Μηχανισμός βιομημικού σχηματισμού υδροξυαπατίτη στα οστά

Στις περισσότερες έρευνες, στις οποίες επιδιώκεται η παραγωγή υδροξυαπατίτη, ακολουθείται μια διεργασία «βιο-εμπνευσμένη», είτε με την χρήση βιομορίων που είναι παρόντα στους οργανισμούς κατά την παραγωγή του οστού, είτε με την τέλεση της αντίδρασης κάτω από βιομιμητικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας.

Η διαδικασία σχηματισμού του βιοαπατίτη των οστών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία λαμβάνουν μέρος ποικιλία ουσιών και παραγόντων, οι οποίοι δεν έχουν μελετηθεί εξ' ολοκλήρου. Έρευνες που έχουν εκτελεστεί δίνουν διαφορετικές θεωρίες για την περιγραφή του μηχανισμού σύνθεσης των οστών από τους οργανισμούς.

Η επικρατέστερη θεωρία για την περιγραφή του μηχανισμού είναι η θεωρία των πρόδρομων φάσεων. Σύμφωνα με αυτή ο μηχανισμός του σχηματισμού του βιοαπατίτη προσομοιάζεται με τον μηχανισμό του σχηματισμού υδροξυαπατίτη λόγω της εξαιρετικής χημικής και δομικής συγγένειας μεταξύ τους. Με βάση την θεωρία αυτή, πρόδρομες φάσεις για τον σχηματισμό βιοαπατίτη αποτελούν οι μετασταθείς φάσεις που εμφανίζονται κατά τον σχηματισμό του υδροξυαπατίτη με χημικές μεθόδους. Η εγκυρότητα αυτής της θεωρίας δεν είχε επιβεβαιωθεί μέχρι πρόσφατα, καθώς δεν είχε καταστεί δυνατό να ανιχνευτούν οι πρόδρομες αυτές ενώσεις κατά τα αρχικά στάδια της ασβεστοποίησης των οστών. Πρόσφατα όμως με την χρήση της μικροσκοπίας Raman διαπιστώθηκε η ύπαρξη πρόδρομων φάσεων OCP και πιθανώς και ACP στα αρχικά στάδια ασβεστοποίησης κρυστάλλων ποντικών [Crane]. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί την πιο απτή απόδειξη για την ισχύ της θεωρίας των προδρομών φάσεων.

Άλλες θεωρίες υποστηρίζουν ότι η παρατηρούμενη αύξηση της κρυσταλλικότητας οφείλεται σε μεγέθυνση των κρυστάλλων βιοαπατίτη και όχι από μετασχηματισμό φάσης του άμορφου φωσφορικού ασβεστίου προς βιοαπατίτη. Η ύπαρξη μη απατιτικών προϊόντων, όπως τα όξινα φωσφορικά που εντοπίζονται στο νεοσχηματισμένο οστό και που μειώνονται αυξανόμενης της ηλικίας στον άνθρωπο, δεν θεωρήθηκαν ένδειξη της ύπαρξης DCPD ή OCP αλλά περιέχονται στην «άμορφη» στοιβάδα που περιβάλλει τους νανοκρυστάλλους του βιο-απατίτη.

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Πειραματικής διαδικασίας

1.1 Διαδικασία παρασκευής του υλικού

Στην παρούσα πειραματική εργασία η σκόνη υδροξυαπατίτη παράγεται μέσα από υγρό διάλυμα νερού και αργινίνης (Arg) στο οποίο προστίθενται στάγδην αιώρημα κολλαγόνου (Col) (ή χιτοζάνης (Chit)) διαλυμένου σε ορθοφωσφορικό οξύ (H_3PO_4) για περίπου 2 ώρες (και 1 ώρα αντίστοιχα) ταυτόχρονα με αιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου σε νερό ($Ca(OH)_2$) ώστε μέσα στο διάλυμα συμβαίνει εξουδετέρωση της βάσης και του οξέος με παραγωγή νερού και φωσφορικού άλατος του ασβεστίου (υδροξυαπατίτη). Τα φωσφορικά ιόντα του ορθοφωσφορικού οξέος υδρολύονται στα υγρά του σώματος χωρίς να προκαλέσουν ασβεστοποίηση σε ανεπιθύμητες θέσεις όταν βρεθούν στον οργανισμό σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως μπορεί να συμβεί με τα πύρο- και μετά- φωσφορικά ιόντα [50]. Η υδρόλυση των φωσφορικών αλάτων του εμφυτεύματος οφείλεται στις συνθήκες του περιβάλλοντος διαλύματος που δημιουργούνται μετά την εμφύτευση. Λόγω κυτταρικής λειτουργίας και της ύπαρξης ενζύμων στο περιβάλλον του εμφυτεύματος δημιουργούνται όξινες συνθήκες και ενεργοποιείται μερική διαλυτοποίηση του υδροξυαπατίτη προκαλώντας απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} , HPO_4^{2-} και PO_4^{3-} αυξάνοντας τοπικά τον υπερκορεσμό του μικρο-περιβάλλοντος ως προς τα άλατα φωσφορικού ασβεστίου [67]. Το pH κατά την αντίδραση οξέος και βάσης παρουσία αργινίνης αφέθηκε να μεταβληθεί χωρίς την προσθήκη ρυθμιστικού διότι τα πειραματικά μοντέλα στα οποία επιτρέπεται η ελεύθερη μεταβολή του pH προσεγγίζουν καλύτερα τις συνθήκες που επικρατούν στον ανθρώπινο οργανισμό κατά τον σχηματισμό του οστού. Κατά την σύνθεση του, το pH στο περιβάλλον του οστού κυμαίνεται μεταξύ 7 και 6,8 και δεν μένει απολύτως σταθερό [51].

Τα δείγματα φωσφορικών αλάτων (κεραμικού υδροξυαπατίτη) που εξετάστηκαν είχαν παρασκευαστεί ώστε στο τελικό προϊόν να διατηρείται η αναλογία υδροξυαπατίτη (HAp)/(Col) κολλαγόνου=70/30 και η αναλογία Arg/ Ca^+ =1/1. Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία 40°C και pH (μεταξύ 9 και 11). Το παραγόμενο αιώρημα φωσφορικού άλατος του ασβεστίου στην συνέχεια γηραίνεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία 40°C και στην συνέχεια φυγοκεντρείται ώστε να διαχωριστεί η υγρή φάση από το gel υδροξυαπατίτη-φυσικού πολυμερούς (κολλαγόνου ή χιτοζάνης) το οποίο θερμαίνεται στους 60°C μέχρι ξήρανσης του οπότε και λειοτριβείται μέχρι να φτάσει σε κατάσταση λεπτής σκόνης.



Εικόνα 22-Απεικόνιση της χρησιμοποιούμενης Πειραματικής Διάταξης.

1.2 Αντιδραστήρια και εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των βιοκεραμικών προϊόντων ήταν : Διάλυμα Ορθοφωσφορικού οξέος H_3PO_4 85% (Sigma-Altrich), υδροξείδιο του ασβεστίου $CaOH$ σε μορφή σκόνης από την Neolab Migge Laborbedarf-Vertribs GmbH, κολλαγόνο (Bovine) τύπου I από αχίλλειο τένοντα βοειδών (Sigma-Altrich) ή Χιτοζάνη ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) της Sigma-Altrich και L-Αργινίνη ($C_6H_{14}N_4O_2$ Sigma – Altrich) σε σκόνη.

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε ένα αναμεικτήρα μέσα στον οποίο έγινε η ανάμιξη των πρόδρομων διαλυμάτων φωσφορικού οξέος-κολλαγόνου, φωσφορικού οξέος-χιτοζάνης και του υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του ασβεστίου. Η ανάδευση κατά την διάρκεια της αντίδρασης των πρόδρομων διαλυμάτων έγινε σε αυτοσχέδιο λουτρό με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα πάνω σε κατάλληλες θερμαινόμενες πλάκες μέσω των οποίων ελέγχονταν ο ρυθμός ανάδευσης και η θερμοκρασία του λουτρού. Η παρακολούθηση της θερμοκρασίας του λουτρού γινόταν μέσω θερμοστοιχείου και οι μετρήσεις pH με ηλεκτρονικό πεχαμέτρο με ηλεκτρόδιο καλομέλινα .

Η γήρανση του παραγόμενου προϊόντος γίνεται σε κατάλληλο υδατόλουτρο, ο διαχωρισμός του στερεού προϊόντος από το υπερκείμενο υγρό έγινε με την χρήση φυγοκέντρου και η ξήρανση του τελικού κολλοειδούς προϊόντος σε σκόνη έγινε σε πυραντήριο.

1.3 Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

Η πειραματική διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα στάδια:

Στο **πρώτο** στάδιο γίνεται παραγωγή των απαραίτητων διαλυμάτων αργινίνης, φωσφορικού οξέος και υδροξειδίου του ασβεστίου που θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια για την παρασκευή της σκόνης υδροξυαπατίτη. Το διάλυμα της αργινίνης παράγεται με ζωηρή ανάδευση της σκόνης της L-αργινίνης με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα μέσα σε κατάλληλη ποσότητα νερού. Το αιώρημα του υδροξειδίου του ασβεστίου παράγεται με έντονη ανάδευση του στερεού υδροξειδίου σε κατάλληλη ποσότητα νερού με την χρήση αναδευτήρα, με ρυθμό ανάδευσης 9.000 rpm περίπου και διατήρηση του αιωρήματος υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα σε όλη την διάρκεια του πειράματος ώστε να παραμείνει το αιώρημα ομοιογενές και να

διατηρηθεί σε αιώρηση το υδροξείδιο. Για την παρασκευή του διαλύματος φωσφορικού οξέος, το οξύ αραιώνεται με ορισμένη ποσότητα νερού και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα. Στο διάλυμα του οξέος προστίθεται το αντίστοιχο βιοπολυμερές και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση 9000-9200 rpm με τον αναμεικτήρα για μια ή δύο ώρες για την χιτοζάνη και το κολλαγόνο αντίστοιχα. Κατά το στάδιο αυτό παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας μέσα στο δοχείο κατά την ανάδευση γεγονός που μπορεί να επηρεάζει την διάλυση των ινών του κολλαγόνου.

Στο **δεύτερο** στάδιο τα αιωρήματα φωσφορικού οξέος-βιοπολυμερούς προστίθενται στάγδην ταυτόχρονα με το αιώρημα υδροξειδίου του ασβεστίου μέσα στο διάλυμα της αργινίνης που αποτελεί το «περιβάλλον» σχηματισμού του υδροξυαπατίτη. Το διάλυμα της αργινίνης είναι τοποθετημένο μέσα σε λουτρό ώστε η θερμοκρασία του να διατηρείται στους 40°C και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα καθ' όλη την διάρκεια της προσθήκης των διαλυμάτων ώστε το μίγμα να ομογενοποιείται. Η θερμοκρασία ελέγχεται μέσω θερμοστοιχείου. Η μέτρηση του pH στα αρχικά διαλύματα και στα ενδιάμεσα στάδια γίνεται με πεχάμετρο.

Στο **τρίτο** στάδιο το ποτήρι ζέσεως με το μίγμα τοποθετείται σε υδατολουτρό σταθερής θερμοκρασίας 40°C για 24 ώρες όπου συμβαίνει γήρανση του δημιουργούμενου gel. Μετά την ολοκλήρωση των 24 ωρών το δοχείο αφαιρείται από το υδατολουτρό για να διαχωριστεί η φάση του gel από την υγρή φάση.

Στο **τέταρτο** στάδιο το μίγμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο νερό απομακρύνεται ώστε το προκύπτον gel να διαχωριστεί και να τοποθετηθεί προς ξήρανση σε πυραντήριο. Με την απομάκρυνση του νερού το στεγνό προϊόν τρίβεται σε γουδί μέχρι να αποκτήσει την υφή λεπτής σκόνης.

Σαν δείγματα προς μελέτη των προϊόντων, εκτός από την τελική σκόνη φωσφορικών αλάτων (υδροξυαπατίτη)-βιομορίων συλλέχθηκαν και δείγματα τελικών αιωρημάτων φωσφορικών αλάτων (υδροξυαπατίτη)-βιομορίων μετά την γήρανση και πριν την φυγοκέντριση.

Για να μελετηθεί η εξέλιξη των παραγόμενων φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου μέχρι τον τελικό σχηματισμό υδροξυαπατίτη (μηχανισμός της αντίδρασης παραγωγής υδροξυαπατίτη), η προσθήκη των αντιδραστηρίων επαναλήφθηκε πολλές φορές με διακοπή της προσθήκης σε δεδομένο ενδιάμεσο ποσοστό της μοριακής συγκέντρωσης του συνολικού τελικού προϊόντος στο τελικό διάλυμα αναφοράς. Στην συνέχεια έγινε μελέτη των προϊόντων από ενδιάμεσα στάδια γήρανσης σαν προσπάθεια παρατήρησης των μεταβολών που υφίσταται το παραγόμενο βιοάλας μεταξύ της κατάστασης του προ γήρανσης και αυτής μετά από γήρανση 24 ωρών.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την τροποποίηση συνταγής παραγωγής σκόνης νάνο-υδροξυαπατίτη βέλτιστων χαρακτηριστικών με την προαναφερθείσα μέθοδο. Η συνταγή που ακολουθήθηκε είναι HA/Col=70/30, Ca⁺: Arg =1:1 1ml H₃PO₄, 0,06M συγκέντρωση H₃PO₄ στο διάλυμα, $V_{\text{διαλArg}}=2 \cdot V_{\text{διαλCa}}=2 \cdot V_{\text{διαλP}}$ και αναλογία Ca/P=1/1. Η αναλογία ιόντων ασβεστίου-φωσφόρου στον υδροξυαπατίτη παρουσιάζει αναλογία Ca/P=1.67=10/6 όμως βάση της βιβλιογραφίας προτιμάται [68][69] η χρήση περίσσειας οξέος σε υδατικό σύστημα με σκοπό την εξουδετέρωση τυχόν ακαθαρσιών ή αλάτων του νερού καθώς και επιφανειακών φαινομένων που μπορεί να επηρεάσουν την αναλογία ιόντων και κατ' επέκταση το τελικό προϊόν της

αντίδρασης. Με σκοπό την παρατήρηση των διαφοροποιήσεων που ανιχνεύονται τόσο ως προς τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης, όσο και ως προς τον μηχανισμό της αντίδρασης μελετήθηκαν και δείγματα τα οποία παρήχθησαν υπό συνθήκες πλήρους εξουδετέρωσης φωσφορικού οξέος και υδροξειδίου του ασβεστίου προς σχηματισμό υδροξυαπατίτη (Ca/P=10/6) χωρίς την παρουσία περίσσειας οξέος.

Για την μελέτη των διαφορών μεταξύ του βιοκεραμικού που προκύπτει με την χρήση βιοπολυμερούς κολλαγόνου και βιοάλατος που έχει προκύψει με την χρήση χιτοζάνης τα παραπάνω πειράματα επαναλήφθηκαν με ακριβώς τις ίδιες συνθήκες και συγκεντρώσεις διαφοροποιούμενα μόνο ως προς την χρήση της χιτοζάνης αντί του κολλαγόνου. Το σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους συγκεντρωτικούς πίνακες που παρατίθενται στην συνέχεια (πίνακες 1 έως 4).

Πίνακας 4-Συγκεντρωτικός πίνακας ποσοτήτων χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων (Col-Ca/P=1/1)

Δείγμα Col-Ca/P=1/1	H ₃ PO ₄ +Col (0,25M H ₃ PO ₄)	Ca(OH) ₂ (0,25M)	Arg (0,1M)	Υδροξυαπατίτης (M=0,01M)
4A-100%-24h ageing	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
4A-100%-8h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
4A-100%-4h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
4A-100%-0h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
4A-60%	8 ml	8 ml	17,33 ml	60%*M
4A-50%	4 ml	4 ml	12 ml	50%*M
4A-40%	4 ml	4 ml	17 ml	40%*M
4A-20%	2 ml	2 ml	21 ml	20%*M
4A-10%	2 ml	2 ml	46 ml	10%*M
4A-1%	100μ l	100 μl	24,8 ml	1%*M #
# Το 1% δεν έδωσε επαρκούσα ποσότητα για ξήρανση και για τον λόγο αυτόν το δείγμα διατηρήθηκε σε μορφή αιωρήματος.				

Πίνακας 5- Συγκεντρωτικός πίνακας ποσοτήτων χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων (Col-Ca/P=10/6)

Δείγμα Col-Ca/P=10/6	H ₃ PO ₄ +Col (0,15M H ₃ PO ₄)	Ca(OH) ₂ (0,25M)	Arg (0,5M)	Υδροξυαπατίτης (M=0,02M)
B1-100%-24h ageing	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
B1-100%-8h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
B1-100%-4h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
B1-100%-0h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
B1-60%	8 ml	8 ml	17,33 ml	60%*M
B1-50%	4 ml	4 ml	12 ml	50%*M
B1-40%	4 ml	4 ml	17 ml	40%*M
B1-20%	2 ml	2 ml	21 ml	20%*M
B1-10%	2 ml	2 ml	46 ml	10%*M
B1-1%	100 μl	100 μl	25 ml	1%*M #
# Το 1% δεν έδωσε επαρκούσα ποσότητα για ξήρανση και για τον λόγο αυτόν το δείγμα διατηρήθηκε σε μορφή αιωρήματος.				

Πίνακας 6-Συγκεντρωτικός πίνακας ποσοτήτων χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων (Chit-Ca/P=1/1)

Δείγμα Chitosan- Ca/P=1/1	H ₃ PO ₄ +Col (0,25M H ₃ PO ₄)	Ca(OH) ₂ (0,25M)	Arg (0,1M)	Υδροξυαπατίτης (M=0,01M)
C1-100%-24h ageing	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
C1-100%-8h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
C1-100%-4h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
C1-100%-0h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
C1-60%	8 ml	8 ml	17,33 ml	60%*M
C1-50%	4 ml	4 ml	12 ml	50%*M
C1-40%	4 ml	4 ml	17 ml	40%*M
C1-20%	2 ml	2 ml	21 ml	20%*M
C1-10%	2 ml	2 ml	46 ml	10%*M
C1-1%	100μ l	100 μl	24,8 ml	1%*M #

Το 1% δεν έδωσε επαρκή ποσότητα για ξήρανση και για τον λόγο αυτόν το δείγμα διατηρήθηκε σε μορφή αιωρήματος.

Πίνακας 7- Συγκεντρωτικός πίνακας ποσοτήτων χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων (Chit-Ca/P=10/6)

Δείγμα Chitosan- Ca/P=10/6	H ₃ PO ₄ +Col (0,15M H ₃ PO ₄)	Ca(OH) ₂ (0,25M)	Arg (0,5M)	Υδροξυαπατίτης (M=0,02M)
D1-100%-24h ageing	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
D1-100%-8h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
D1-100%-4h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
D1-100%-0h	8 ml	8 ml	4 ml	100%* M
D1-60%	8 ml	8 ml	17,33 ml	60%*M
D1-50%	4 ml	4 ml	12 ml	50%*M
D1-40%	4 ml	4 ml	17 ml	40%*M
D1-20%	2 ml	2 ml	21 ml	20%*M
D1-10%	2 ml	2 ml	46 ml	10%*M
D1-1%	100 μl	100 μl	25 ml	1%*M #

Το 1% δεν έδωσε επαρκή ποσότητα για ξήρανση και για τον λόγο αυτόν το δείγμα διατηρήθηκε σε μορφή αιωρήματος.

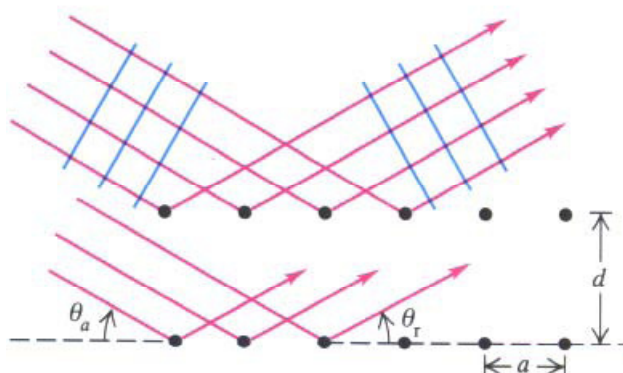
1.4 Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών

1.4.1 Περιθλασιμετρία ακτίνων X (XRD)

Η τεχνική χαρακτηρισμού με βάση τις ακτίνες X περίθλασης (XRD) εκμεταλλεύεται την αλληλεπίδραση της ύλης και της ακτινοβολίας X, κάτω από ορισμένες συνθήκες, κάνοντας δυνατή την μελέτη της κρυσταλλικής δομής και τον χαρακτηρισμό των υλικών τόσο σε ερευνητικές όσο και σε βιομηχανικές εφαρμογές.

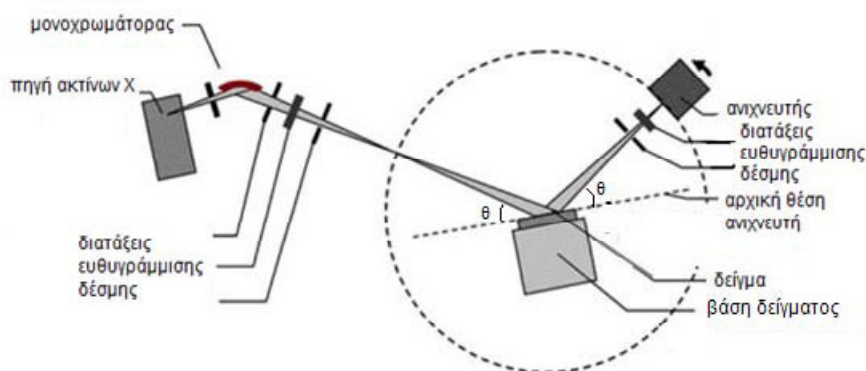
Η περίθλαση των ακτίνων χ είναι μια διαδικασία εκπομπής ακτίνων χ συγκεκριμένου μήκους κύματος λ σε στερεό παράλληλων επιπέδων. Με την πρόσπτωση των ακτίνων

πάνω στο κρυσταλλικό στερεό, μπορεί είτε οι διάφορες ανακλώμενες δέσμες να μην είναι ομοφασικές (οπότε δεν παρατηρείται ενίσχυση της έντασης της ακτινοβολίας) είτε οι ανακλώμενες δέσμες για κάποια συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης θ (γωνία Bragg) να είναι ομοφασικές (οπότε συμβάλλουν με αποτέλεσμα την ενίσχυση της εξερχόμενης ακτινοβολίας). Η σχέση μεταξύ της γωνίας θ , του μήκους κύματος λ , των ακτίνων χ αλλά και της διαπλεγματικής απόστασης d , η οποία στα κρυσταλλικά στερεά είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το μήκος κύματος λ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δίνεται από την εξίσωση Bragg $n\lambda = 2d\eta\mu\theta$.



Εικόνα 23. Κατευθύνσεις συμβολής των περιθλώμενων ακτίνων χ

Η συσκευή περιθλασιμετρίας ακτίνων X αποτελείται από: πηγή ακτίνων X συγκεκριμένου μήκους κύματος λ , έναν ανιχνευτή ακτίνων χ και ένα γωνιόμετρο. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με την γωνία 2θ καταγράφεται. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση Bragg υπολογίζονται οι χαρακτηριστικές διαπλεγματικές αποστάσεις d για τα διάφορα επίπεδα. Από βάσεις δεδομένων λαμβάνονται οι φάσεις του προς εξέταση υλικού.



Εικόνα 24. Βασικά μέρη περιθλασίμετρου ακτίνων X

Η περιθλασιμετρία ακτίνων X βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην έρευνα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης φάσεων κυρίως μεταλλικών και κεραμικών υλικών, στον προσδιορισμό της κρυσταλλικότητας πολυμερών και ταχέως στερεοποιούμενων μετάλλων και στην ανίχνευση κρυσταλλογραφικού ιστού [70]. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, οι έλεγχοι με περιθλασιμετρία ακτίνων X έγιναν με την χρήση περιθλασίμετρου XRD D8 Brucker της σχολής Μεταλλειολόγων-Μεταλλουργών.

1.4.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μίας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Μία ένωση ονομάζεται ενεργά υπέρυθρη εφ' όσον οι δονήσεις και οι περιστροφές των ατόμων τους έχουν μια διαρκή διπολική ροπή, όπως στα μόρια τα αποτελούμενα από δύο ετεροάτομα. Για διατομικά μόρια όπως τα H₂, Cl₂, N₂ που δεν παρουσιάζουν διπολική ροπή είναι αδρανής στην υπέρυθρη φασματομετρία καθώς δεν διεγείρεται η περιστροφή και η δόνηση τους με απορρόφηση ακτινοβολίας.

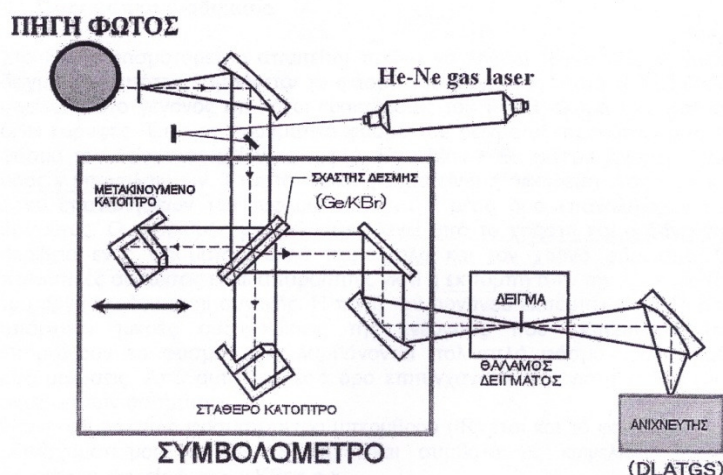
Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και στην διαλεύκανση της δομής μιας ένωσης (φύση ατόμων των μορίων, διάταξη στον χώρο). Για να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς την συγκέντρωση ενός συστατικού σε δείγμα (λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το ποσό απορροφούμενης ενέργειας είναι συνάρτηση του αριθμού των υπαρχόντων μορίων) γίνεται σύγκριση του βάθους μιας χαρακτηριστικής ταινίας απορρόφησης, προς το βάθος της ίδιας ταινίας ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του συστατικού αυτού.

Το φασματόμετρο υπέρυθρου αποτελείται από, μια σταθερή πηγή ακτινοβολίας, ένα σύστημα κατόπτρων και φακών που ρυθμίζουν την ένταση της πηγής και ευθυγραμμίζουν και εστιάζουν την δέσμη, ένα συμβολόμετρο, μία διαφανής κυψελίδα για το δείγμα, ένας ανιχνευτής φωτοβολίας και μια μονάδα επεξεργασίας και ανάγνωσης του σήματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή ή ψηφιακό ή αναλογικό όργανο και καταγραφέα.

Η φασματοσκοπία χρησιμοποιείται κυρίως στην περιοχή 4000-650cm⁻¹. Στην περιοχή αυτή η ευαισθησία του φασματόμετρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα οι ταινίες απορρόφησης να «κρύβονται» πίσω από τον θόρυβο. Το πρόβλημα λύνεται με την χρήση φασματόμετρου μετασχηματισμού Fourier.

Φασματόμετρα μετασχηματισμού Φουριέ (FT-IR)

Μια πολυχρωματική ακτινοβολία IR εκπέμπεται από μια ηλεκτρικά θερμαινόμενη πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας και διαχωρίζεται, με την βοήθεια διασκορπιστή δέσμης (κάτοπτρα), σε δύο δέσμες που διέρχονται από το δείγμα και το δείγμα αναφοράς (αέρας) αντίστοιχα. Η ένταση των δύο δεσμών εξισώνεται με την χρήση «εξασθενητή» στην δέσμη αναφοράς, και επανενώνονται σε μία δέσμη με την χρήση περιστρεφόμενου καθρέπτη. Η ανάλυση των επιμέρους ακτινοβολιών γίνεται με την βοήθεια ενός φράγματος. Οι διαχωριζόμενες ακτινοβολίες διέρχονται μέσω μιας σχισμής μεταβαλλόμενου πλάτους στον ανιχνευτή, του οποίου το σήμα ενισχύεται μέσω ενός συγχρονισμένου ανορθωτή, συνδεδεμένου με ένα τεμαχιστή δέσμης ώστε να συγχρονίζεται με την δέσμη φωτός που διέρχεται από αυτόν. Το δείγμα εκτίθεται σε όλη την εκπεμπόμενη από την πηγή ακτινοβολία και η σκεδαζόμενη από τις κυψελίδες ακτινοβολία εξουδετερώνεται από τον μονοχρωμάτορα προτού φτάσει στον ανιχνευτή. Η διάταξη αυτή αφορά φασματόμετρο διπλής δέσμης. Η διάταξη αυτή υπερέχει ως προς το φασματόμετρο απλής δέσμης, καθώς αντισταθμίζει τις διακυμάνσεις της πηγής και της απορρόφησης του υποστρώματος.

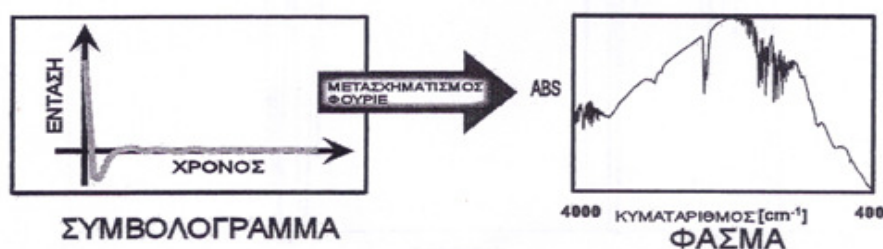


Εικόνα 25. Διάταξη σε Φασματομέτρο μετασχηματισμού Φουριέ και αναλυτική κάτοψη συμβολομέτρου Michelson

Η μέθοδος φασματομετρίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, βασίζει την λειτουργία της στην καταγραφή του φάσματος με συμβολομετρικές μετρήσεις. Η βασική διαφορά μεταξύ της κοινής συσκευής φασματοσκοπίας και της συσκευής FT-IR είναι το συμβολόμετρο Michelson.

Η παραγόμενη υπέρυθρη ακτινοβολία περνάει μέσω ενός σχάστη δέσμης ο οποίος χωρίζει το φως σε δύο, κάθετες μεταξύ τους, δέσμες. Η μία προσπίπτει σε σταθερό κάτοπτρο και ανακλάται πίσω στον σχάστη δέσμης, ενώ η δεύτερη προσπίπτει σε κάτοπτρο κινούμενο πάνω σε απόσταση 2,5 μικρόμετρων. Η κίνηση του κατόπτρου κάνει το συνολικό μήκος διαδρομής της δεύτερης δέσμης μεταβαλλόμενο σε σχέση με της πρώτης. Με τον επανασυνδυασμό των δύο ακτίνων στο σχάστη δέσμης δημιουργείται μία διάταξη παρεμβολών, λόγω της διαφοράς μήκους των διαδρομών. Αυτή η διάταξη παρεμβολών δίνει ένα συμβολόγραμμα.

Όταν η επανασυνδυασμένη ακτίνα διαπεράσει το δείγμα, τα χαρακτηριστικά για το φάσμα του δείγματος μήκη κύματος απορροφώνται από το δείγμα και αφαιρούνται από το συμβολόγραμμα (και άρα παραλείπονται από το νέο-τελικό συμβολόγραμμα). Στο τέλος ο ανιχνευτής μετρά την διακύμανση της ενέργειας ως προς τον χρόνο για όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα. Τα στοιχεία που προκύπτουν από το παραγόμενο συμβολόγραμμα (ένταση 5προς χρόνο) μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό, μετατρέπονται σε στοιχεία φάσματος μέσω μετασχηματισμού Φουριέ (ένταση προς συχνότητα) [71].



Εικόνα 26. Μετατροπή συμβολογράμματος σε φάσμα [71]

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας οι έλεγχοι φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Φουριέ έγιναν με την χρήση ενός Φασματόμετρου Nicolet 6700 (thermo Scientific, Waltham, MA) εξοπλισμένο με κρύσταλλο διαμαντιού (Smart Orbit™ Thermo Electron Corporation, Madison, WI).

1.4.3 Φασματοσκοπία Raman

Μια από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάλυσης στερεών αποτελεί η φασματοσκοπία Raman η οποία βασίζει την λειτουργία της στο ομώνυμο φαινόμενο. Το φαινόμενο Raman είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μονοχρωματικής ακτινοβολίας που παράγεται από μια πηγή laser και των χημικών δεσμών ενός υλικού. Η απορρόφηση ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα μήκη κύματος παριστάνεται σε ένα φάσμα ανάλογο με τα φάσματα απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας [70].

Με την βοήθεια της μικροσκοπίας Raman είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των διαφόρων φάσεων ενός υλικού μέσα από την μελέτη των χαρακτηριστικών ενεργειών των χημικών δεσμών. Επίσης μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για την παραμόρφωση του κρυσταλλικού πλέγματος του υλικού [70].

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια χαρακτηρισμού δειγμάτων στην παρούσα εργασία είναι το Ramascope RM1000 της Renishaw. Βασίζεται στο οπτικό μικροσκόπιο της Leica DM LM στο οποίο είναι συνδεδεμένο το φασματόμετρο. Το λέιζερ είναι He-Ne με συχνότητα δέσμης στα 632.8nm. Το φασματόμετρο αποτελείται από ένα διάφραγμα με άνοιγμα 50μm, ένα φράγμα (grating) με 1800γραμμές/mm και μια κάμερα CCD που ψύχεται με Peltrier plates. Το μικροσκόπιο διαθέτει τέσσερις αντικειμενικούς φακούς με μεγεθύνσεις των x5, x20, x50 και x100. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ο φακός x100, οπότε και το σημείο εστίασης έχει διάμετρο μικρότερη των 2μm και ενέργεια μικρότερη των 5mW. Αυτό έγινε ώστε να είναι δυνατή η εστίαση σε μικρότερη και επίπεδη επιφάνεια για να μειωθεί το μεγάλο υπόβαθρο θορύβου στα φάσματά. Ελήφθησαν φάσματα από τα 180wn έως τα 4000wn για να καλυφθεί όλο το εύρος κορυφών των δειγμάτων. Στις τελικές αναλύσεις αποτελεσμάτων δεν παρουσιάστηκαν το σύνολο του εύρους του φάσματος όπου, λόγω του υψηλού θορύβου που προέρχεται από την διάχυση της δέσμης πάνω στην συνήθως ανώμαλη επιφάνεια των δειγμάτων και ενισχύεται παρουσιάζοντας δομή χαρακτηριστική του edge φίλτρου που χρησιμοποιούμε για μείωση της σκέδασης Rayleigh, αλλά παράθυρα αυτών. Δεν έγινε διόρθωση των φασμάτων με αφαίρεση του θορύβου από το υπόβαθρο ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή σφαλμάτων λόγω της επεξεργασίας αυτής. Η ανάγνωση των φασμάτων έγινε μέσω continues mode του λογισμικού Wire 3.1 της Renishaw με το οποίο έγινε η ανάγνωση των φασμάτων μέσω του Grams λογισμικού.

1.4.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης (TEM)

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης παράγει, μέσω θερμαινόμενου νήματος βολφραμίου, δέσμη ηλεκτρονίων που παράγεται υπό συνθήκες κενού. Η δέσμη των ηλεκτρονίων επιταχύνεται με μια τάση από 75-120kV ενώ συγκεντρώνεται και εστιάζεται με ηλεκτρομαγνητικούς φακούς. Όταν η δέσμη των ηλεκτρονίων διαπερνά το εξεταζόμενο δοκίμιο, η απεικόνιση του υλικού προκύπτει από την διαθλώμενη από το δοκίμιο δέσμη, ενώ ένα μέρος των ηλεκτρονίων απορροφάται από τα άτομα του υλικού ή και σκεδάζεται αλλάζοντας την διεύθυνση τους. Η σκέδαση αυτή ενισχύεται από τις αλλαγές του κρυσταλλογραφικού

προσανατολισμού. Το ποσοστό της δέσμης που τελικά διαπερνά το δοκίμιο συγκεντρώνεται και εστιάζεται με την βοήθεια μαγνητικών φακών σε οθόνη φθορισμού.

Για να είναι δυνατή η παρατήρηση ενός δοκιμίου, το πάχος του πρέπει να είναι της τάξης των 100 nm και μικρότερο ενώ η επιφάνεια προς παρατήρηση πρέπει να είναι πολύ μικρή. Το δοκίμιο μπορεί να προετοιμαστεί είτε με την τεχνική του εκμαγείου είτε με την τεχνική δημιουργίας λεπτού φύλλου του δοκιμίου, πραγματοποιώντας ηλεκτρολυτική λείανση ή βομβαρδισμό ιόντων.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης δίνει την δυνατότητα παρατήρησης της μικροδομής και νανοδομής σε υψηλή μεγέθυνση από $\times 10\ 000$ έως $100\ 000$ [70]. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, οι εικόνες που ελήφθησαν με την χρήση του TEM FEI CM20 του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

1.4.5 Μέτρηση ζ-δυναμικού (zeta potential)

Το ζ-potential είναι μια φυσική ιδιότητα που παρουσιάζει κάθε σωματίδιο που βρίσκεται σε αιώρηση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη και βελτιστοποίηση των μελετώμενων εν αιώρηση συστατικών ενός διαλύματος. Η συνολική σταθερότητα ενός συστήματος δίνεται από τον τύπο:

$$V_T = V_A + V_R + V_S$$

όπου

V_T :Συνολική Δυναμική Ενέργεια ,

V_A :Ελκτικό δυναμικό (από δεσμούς Van Der Waals)

V_R :Απωστικό δυναμικό

V_S :Η δυναμική ενέργεια του διαλύτη

Από τους παράγοντες αυτούς η V_A και V_R έχουν την επίδραση με την μεγαλύτερη εμβέλεια στο τελικό προϊόν και η ισορροπία μεταξύ τους έχει την μεγαλύτερη σημασία. Το απωστικό δυναμικό V_R δίνεται από τον τύπο $V_R = 2\pi\epsilon a\zeta^2 \exp(-kD)$ όπου ζ = το ζ δυναμικό που μπορεί να βρεθεί πειραματικά, $2\pi\epsilon$ η διαπερατότητα του διαλύτη, a η ακτίνα των σωματιδίων και $-kD$ η συνάρτηση της ιοντικής σύνθεσης του συστήματος. Αν το ενεργειακό εμπόδιο μεταξύ των σωματιδίων ξεπεράσει την ενέργεια έλξης, τότε τα σωματίδια θα συνδεθούν μεταξύ τους κατά αναντίστροφο τρόπο. Αν τα σωματίδια έχουν αρκετές απωστικές δυνάμεις δεν γίνεται κροκίδωση. Σε αιωρήματα με υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων το ζ δυναμικό θα μειωθεί και κατ' επέκταση μειωθεί το απωστικό δυναμικό σχηματίζοντας δευτερεύον ελάχιστο, όπου μπορεί να συμβεί ασθενής αντιστρεπτή διασύνδεση μεταξύ των σωματιδίων.

Το ζ δυναμικό εξαρτάται από δύο παράγοντες : το pH και την αγωγιμότητα του αιωρήματος. Με την προσθήκη βάσης αυξάνεται το αρνητικό φορτίο των σωματιδίων και με την προσθήκη οξέος αυξάνεται το θετικό φορτίο στα σωματίδια. Η αγωγιμότητα του αιωρήματος εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα και το σθένος αυτών.

Η καταγραφή της μεταβολής του ζ δυναμικού συναρτήσει της μεταβολής του pH ενός διαλύματος δίνει μια καμπύλη που παίρνει θετικές και αρνητικές τιμές. Το σημείο pH όπου η καμπύλη δίνει τιμή ζ δυναμικού ίση με 0, καλείται ισοηλεκτρικό σημείο. Αυτό, αποτελεί το σημείο μέγιστης αστάθειας ενός κolloειδούς συστήματος.

Όσο πιο θετικές ή πιο αρνητικές είναι οι τιμές του δυναμικού τόσο πιο σταθερό είναι το διάλυμα.

Για να επιτευχθεί σταθερότητα σε ένα κolloειδές σύστημα πρέπει οι απωστικές δυνάμεις να ελεγχθούν. Αυτό γίνεται μέσα από δύο βασικούς μηχανισμούς:

- ✓ Με προσθήκη πολυμερών τα οποία προσροφούνται πάνω στην επιφάνεια των σωματιδίων και εμποδίζουν τις επιφάνειες των σωματιδίων να έρθουν σε κοντινή επαφή.
- ✓ Με σταθεροποίηση των σωματιδίων ηλεκτροστατική ή φορτίου δηλαδή με προσαρμογή τις συγκέντρωσης των ιόντων στο διάλυμα.

Σταθερά θεωρούνται αιωρήματα των οποίων το ζ δυναμικό είναι είτε μεγαλύτερο από +30 mV και μικρότερο από -30mV. Το ζ δυναμικό είναι καλός δείκτης του εύρους της αλληλεπίδρασης μεταξύ των σωματιδίων του κolloειδούς.

Λόγω ύπαρξης ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνεια σωματιδίων υπάρχει η δυνατότητα αλλαγών στη συμπεριφορά των σωματιδίων με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Οι αλλαγές αυτές καλούνται ηλεκτροκινητικές. Ένα από τα φαινόμενα, που μπορούν να παρουσιαστούν κατά την εφαρμογή φορτίου είναι η ηλεκτροφόρηση. Ηλεκτροφόρηση καλείται η κίνηση φορτισμένων σωματιδίων σε σχέση με το υγρό, στο οποίο βρίσκονται σε αιώρηση υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος ενός ηλεκτρολύτη, τα φορτισμένα αιωρούμενα σωματίδια προσελκύονται και κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Η ταχύτητα κίνησης ενός σωματιδίου μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο συχνά καλείται ηλεκτροφορητική κινητικότητα.

Μια κλασική τεχνική μέτρησης της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας χρησιμοποιεί ένα κελί με ηλεκτρόδια σε κάθε άκρο του οποίου εφαρμόζεται δυναμικό. Τα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια αντίθετου φορτίου και η ταχύτητα κίνησης τους μετράται. Με γνωστή την ταχύτητα των σωματιδίων (ηλεκτροφορητική κινητικότητα) μπορεί μέσω της εξίσωσης Henry ($U_E = [2ez f(ka)] / [3 \eta]$) να ληφθούν τιμές ζ δυναμικού [72].

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας οι μετρήσεις ζ δυναμικού έγιναν με την χρήση ενός οργάνου μέτρησης δυναμικού Malvern zetasizer 3000.

1.4.6 Μετρήσεις Ιξώδους –Ιξωδόμετρο

Η μελέτη μεταβολής του ιξώδους αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο χαρακτηρισμού ρευστών υλικών καθώς η ρεολογική συμπεριφορά των αιωρημάτων παρουσιάζει αντιστοιχία με ιδιότητές τους, όπως το μοριακό βάρος της στερεής φάσης και η κατανομή του. Η έμμεση παρακολούθηση της μεταβολής των ιδιοτήτων που συμβαίνουν κατά την διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης μπορεί να δώσει στοιχεία για τον μηχανισμό της. Ακόμα, τέτοιες μετρήσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στον ποιοτικό έλεγχο των πρόδρομων και τελικών αιωρημάτων ώστε να ελέγχεται η επαναληψιμότητα της ακολουθούμενης πειραματικής διαδικασίας.

Η λειτουργία ενός απλού περιστροφικού ιξωδομέτρου τύπου “Brookfield” βασίζεται στην μέτρηση του ιξώδους ενός υγρού υπό συνθήκες σταθερής ταχύτητας περιστροφής κατάλληλου στελέχους το οποίο βρίσκεται βυθισμένο εντός του εξεταζόμενου υγρού. Το στέλεχος είναι συνδεδεμένο σε διακριβωμένο ελατήριο

μέτρησης ροπής το οποίο λόγω της αντίστασης του υγρού κόντρα στο στέλεχος, υφίσταται εκτροπή ανάλογη της ροπής. Η διατημητική τάση που χρειάζεται το στέλεχος για να συνεχίσει περιστρέφεται με σταθερή ταχύτητα υπολογίζεται βάσει της ταχύτητας, της γεωμετρίας του εργαλείου και το σχήμα και το μέγεθος του δοχείου της συσκευής. Το ιξώδες υπολογίζεται βάσει της μετρούμενης ροπής βάσει των δεδομένων διαστάσεων της συσκευής. [73] Αυτό το είδος μέτρησης ανήκει στην κατηγορία μετρήσεων που ελέγχονται από το ρυθμό της περιστροφής του στελέχους της συσκευής. Για τα νευτώνεια υγρά η ροπή είναι ανάλογο με την ταχύτητα περιστροφής και το τελικά υπολογιζόμενο ιξώδες ενώ στα μη νευτώνεια υγρά η αναλογία δεν ισχύει.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, οι μετρήσεις του ιξώδους έγιναν με την χρήση ενός ιξωδομέτρου Brookfield LVDV-II+ Pro viscometer όπως το εικονιζόμενο.



Εικόνα 27. Εικόνα Ιξωδομέτρου Brookfield LVDV-II +Pro

Η έμμεση παρακολούθηση της μεταβολής των ιδιοτήτων που συμβαίνουν κατά την διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης μπορεί να δώσει στοιχεία για τον μηχανισμό της. Ακόμα, τέτοιες μετρήσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στον ποιοτικό έλεγχο των πρόδρομων και τελικών αιωρημάτων ώστε να ελέγχεται η επαναληψιμότητα της ακολουθούμενης πειραματικής διαδικασίας.

Κεφάλαιο 2 : Αποτελέσματα-Συζήτηση

2.1 Μελέτη αρχικών αιωρημάτων

Στην παρούσα πειραματική εργασία έγινε προσπάθεια μελέτης του μηχανισμού που ακολουθεί η αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη και η εν γένει μελέτη των μεταβολών που συμβαίνουν και συνθηκών που υφίστανται μέσα στο διάλυμα όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση εξουδετέρωσης μεταξύ φωσφορικού οξέος και υδροξειδίου του ασβεστίου και κολλαγόνου ή χιτοζάνης.

Μελετήθηκαν δύο διαφορετικές περιπτώσεις σύνθεσης υδροξυαπατίτη παρουσία κολλαγόνου και δύο περιπτώσεις παρουσία χιτοζάνης. Στην πρώτη περίπτωση η σύνθεση γίνεται με περίσσεια ποσότητας φωσφορικού οξέος ώστε η τελική αναλογία Ca/P στο διάλυμα μετά το τέλος της αντίδρασης να είναι 1/1. Η αναλογία αυτή επιλέχθηκε καθώς βάσει βιβλιογραφίας [69] αναφέρεται ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη περίσσειας φωσφορικού οξέος για την καταβύθιση υδροξυαπατίτη στο διάλυμα.

Στην δεύτερη μελετώμενη περίπτωση η σύνθεση του άλατος γίνεται με συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων τέτοιες ώστε η αναλογία Ca/P να είναι αυτή του υδροξυαπατίτη (10/6) δηλαδή γίνεται προσπάθεια διευκρίνισης εάν εξακολουθεί η παραγωγή υδροξυαπατίτη και χωρίς την παρουσία περίσσειας φωσφορικού οξέος καθώς και πως διαφοροποιείται ο μηχανισμός της αντίδρασης στην περίπτωση αυτή.

Από πρωτότερη εργαστηριακή εμπειρία έγινε φανερή η σημασία που είχε για το τελικό προϊόν υδροξυαπατίτη που προκύπτει η θερμοκρασία κατά την διάλυση του κολλαγόνου στο φωσφορικό οξύ. Αποδείχθηκε ότι ελλιπής διάλυση κολλαγόνου είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή τελικού προϊόντος σύνθετου βιοκεραμικού υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου που προσομοίαζε περισσότερο σε συνονθύλευμα ινών παρά σε ομοιόμορφο κolloειδές αιώρημα.



Εικόνα 28-Φωτογραφία τελικού αιωρήματος υδροξυαπατίτη που προέκυψε μετά από ικανοποιητική διάλυση του κολλαγόνου σε φωσφορικό οξύ.

Η παρακολούθηση των μεταβολών που συμβαίνουν στο κολλαγόνο και την χιτοζάνη κατά την διάλυση τους στο οξύ σε συνάρτηση με την θερμοκρασία και τον χρόνο ανάδευσής τους με το διάλυμα φωσφορικού οξέος έγινε μέσω της μελέτης της μεταβολής του ιζώδους.

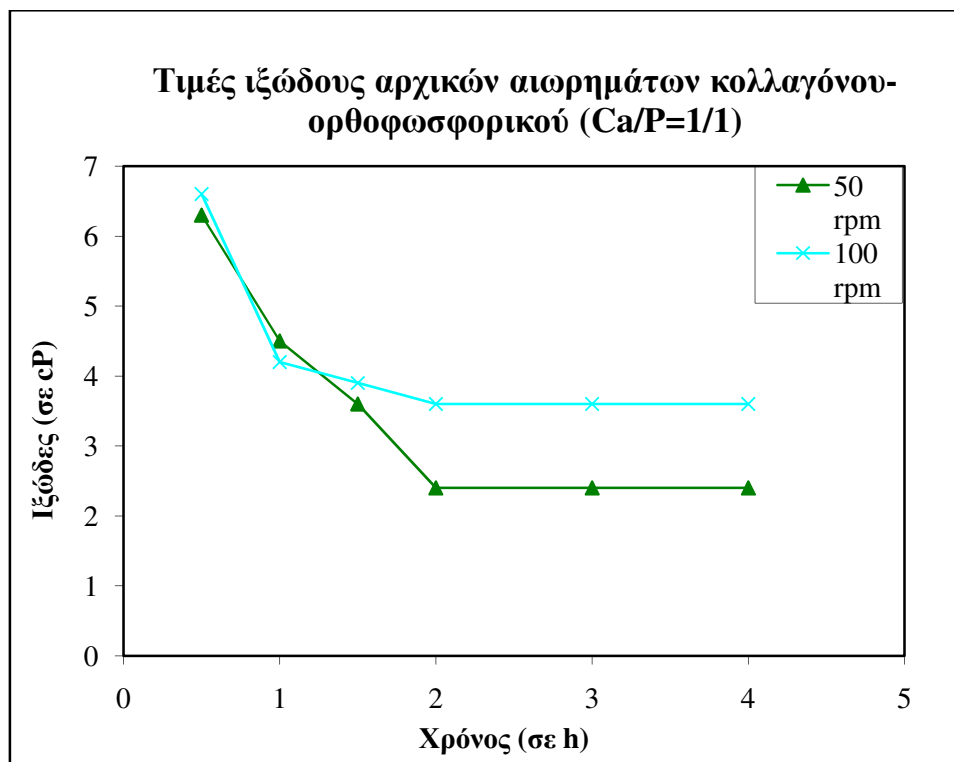
2.1.1 Μελέτη μεταβολής ιζώδους

Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, έγινε προσπάθεια έμμεσης παρακολούθησης της μεταβολής των ιδιοτήτων των αιωρημάτων μέσω παρακολούθησης των μεταβολών του ιζώδους. Μετρήσεις ιζώδους έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιβλιογραφία σε περιπτώσεις μελέτης των χαρακτηριστικών κάποιων συνθετικών πολυμερών σε διαλύματα. Για παράδειγμα, μέσω της μελέτης του ιζώδους είναι δυνατή η παρακολούθηση μεταβολών στο χρόνο χαλάρωσης πολυμερών αλυσίδων, η οποία συσχετίζεται με την μορφή της κίνησης των αλυσίδων του πολυμερούς και επηρεάζει την συμπεριφορά του υλικού [74].

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση της μεταβολής των χαρακτηριστικών των αιωρημάτων του κολλαγόνου και της χιτοζάνης στο διάλυμα του οξέος συναρτήσει του χρόνου έντονης ανάδευσής τους με σκοπό την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αποδόμηση/διάλυσή τους. Κάθε μεταβολή θα ληφθεί σαν ένδειξη της συνέχισης της αλληλεπίδρασης μεταξύ των βιομορίων και του οξέος. Παύση της μεταβολής του ιζώδους θα θεωρηθεί ως ένδειξη της σταθεροποίησης του αιωρήματος.

Τα ιξώδη μελετήθηκαν ξεχωριστά για την περίπτωση κάθε αιωρήματος φωσφορικού οξέος-βιομορίων κάτω από συνθήκες ανάδευσης 50 και 100 rpm και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εκτός εάν σημειώνεται διαφορετικά.

Στις καμπύλες μεταβολής ιξώδους συναρτήσει του χρόνου με ταχύτητες μέτρησης 50 και 100 rpm (εικόνα 3) παρατηρείται μικρή σταδιακή μείωση του ιξώδους μέχρι σταθεροποίηση στις 2 ώρες σε ιξώδες 2,5 περίπου για ανάδευση υπό συνθήκες 50 rpm και στις 2 ώρες σε ιξώδες περίπου 3,5 για ανάδευση σε 100 rpm.



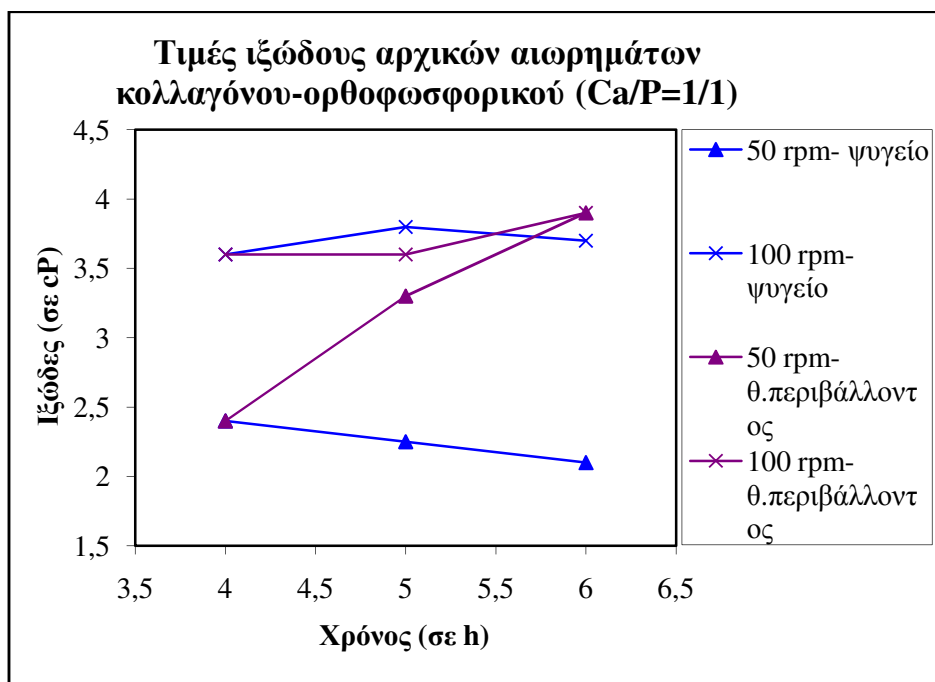
Εικόνα 29-Διάγραμμα απεικόνισης των τιμών ιξώδους πρόδρομου αιωρήματος ορθοφωσφορικού οξέος-κολλαγόνου

Συμπερασματικά φαίνεται ότι μετά την ανάμιξη για 2 περίπου ώρες το ιξώδες του παραγόμενου αιωρήματος παύει να μεταβάλλεται και κατ' επέκταση μπορεί να θεωρηθεί ότι σταθεροποιείται και δεν είναι αναγκαία περαιτέρω ανάδευση. Παρατηρήθηκε ακόμα αύξηση του ιξώδους αυξανόμενης της διατμητικής τάσης γεγονός που αποδόθηκε σε σφάλμα της μέτρησης.

Επιβεβαιώθηκε ότι δύο ώρες ανάδευσης του αιωρήματος $\text{CoI-H}_3\text{PO}_4$ είναι αρκετά ώστε να επέλθει ομογενοποίηση του αιωρήματος. Ο χρόνος αυτός όπως φαίνεται βάσει των συνολικών παρατηρήσεων καλύπτει όλες τις περιπτώσεις συγκεντρώσεων και βιομορίων.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίο μεταβάλλεται το ιξώδες των αιωρημάτων μετά από την σταθεροποίηση του υπό συνθήκες συντήρησης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό συντήρηση σε συνθήκες ψυγείου (θ ψυγείου~7°C). Τα αιωρήματα εξετάστηκαν μετά από παραμονή για 1 και 2 ώρες στο ψυγείο και τα αποτελέσματα αντιπαρατέθηκαν με αιώρημα που συντηρήθηκε χωρίς ανάδευση σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Πιο συγκεκριμένα, κάθε διάλυμα H_3PO_4 -Col που προέκυψε μετά από 4 ώρες ανάδευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίστηκε στα δύο και το ένα μέρος του αφέθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος χωρίς ανάδευση ενώ το δεύτερο μέρος διατηρήθηκε στην ψύξη. Και τα δύο αιωρήματα μελετήθηκαν ως προς το ιζώδες τους ανά μία ώρα και για δύο επιπλέον ώρες. Τα αιωρήματα Col- H_3PO_4 μελετήθηκαν υπό διαφορετικές ταχύτητες μέτρησης και από τις τιμές ιζώδους που προέκυψαν καταρτίστηκε το ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 30- Διάγραμμα απεικόνισης των τιμών ιζώδους πρόδρομου αιωρήματος ορθοφωσφορικού οξέος-κολλαγόνου μετά από διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό συνθήκες ψύξης χωρίς ανάδευση.

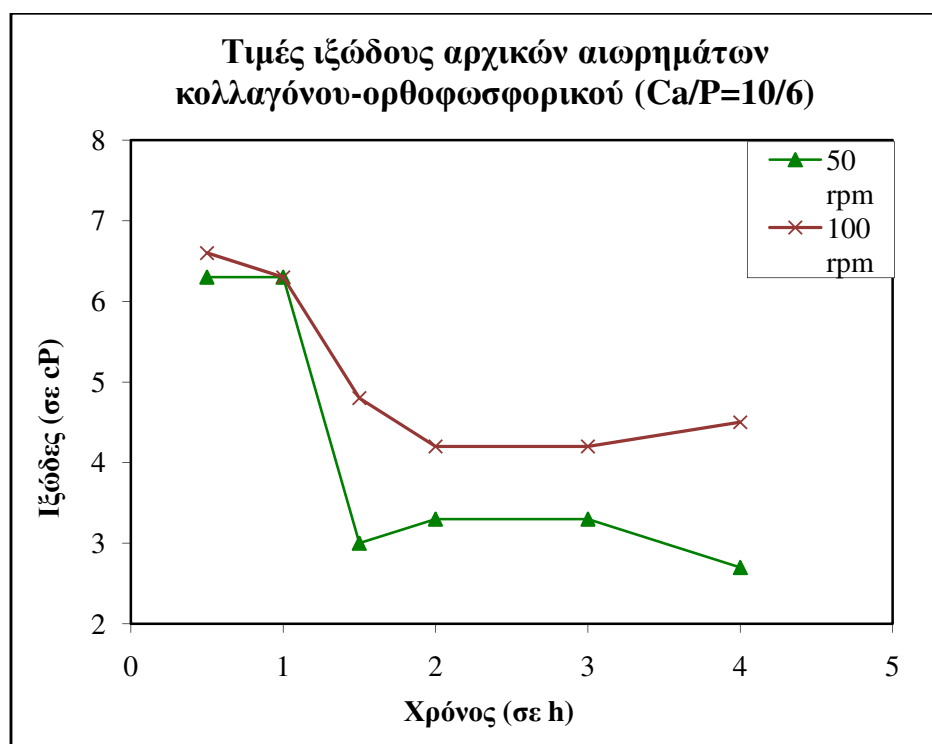
Από το αιώρημα ορθοφωσφορικού-κολλαγόνου που μετρήθηκε υπό ταχύτητα μέτρησης 50 rpm παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του ιζώδους από 2,4 σε 3,3 και 3,9 ενώ υπό συνθήκες ψύξης το ιζώδες φάνηκε να μειώθηκε σταδιακά από 2,4 σε 2,25 και 2,1. Το σφάλμα των μετρήσεων αυτών, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 5, κυμαίνεται μεταξύ 0,3 και 0,75 μονάδες για τα δείγματα που διατηρήθηκαν στο ψυγείο και 0,3 για αυτά που διατηρήθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος. Επομένως ενώ μπορεί να θεωρηθεί ότι το δείγμα που διατηρήθηκε στο ψυγείο παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητο μετά την ολοκλήρωση της διάλυσης, στο αιώρημα που διατηρήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος φάνηκε ότι επήλθε αύξηση του ιζώδους της τάξης των 2 μονάδων μετά από δύο ώρες ανάπαυσης. Οι μετρήσεις αυτές δεν συμφωνούν με τις μετρήσεις που ελήφθησαν υπό υψηλότερη ταχύτητα.

Στο αιώρημα που μετρήθηκε υπό ταχύτητα 100 rpm, παρατηρήθηκε αμελητέα μεταβολή του ιζώδους τόσο ως προς το χρόνο όσο και ως προς την θερμοκρασία (συνολικά οι τιμές κυμαίνονταν από 3,6 μέχρι 3,9) ένδειξη ότι η πλήρης ομογενοποίηση όταν επιτευχθεί διατηρείται.

Πίνακας 8- Πίνακας τιμών ιξώδους πρόδρομου αιωρήματος φωσφορικού οξέος-κολλαγόνου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ΗΑρ με αναλογία αντιδραστηρίων Ca/P=1/1

Κολλαγόνο-H ₃ PO ₄ για την παραγωγή ΗΑρ(Ca/P=1/1)						
Στροφές ανάδευσης (rpm)	Ιξώδες (σε cp)	Σφάλμα Μέτρησης	Χρόνος (σε h)	Ιξώδες αρχικού διαλύματος Αργινίνης	Ιξώδες ΗΑρ (0h)	Ιξώδες ΗΑρ (24h) T=19°C
50	6,3	0,3	0,5	3	3	4,2
	4,5	0,3	1			
	3,6	0,6	1,5			
	2,4	0,6	2			
	2,1	0,3	3			
	2,4	0,6	4			
(+1h ψυγείο) (Τμέτρ=17° C)	2,25	0,75	5			
(+2h ψυγείο) (Τμέτρ=19°C)	2,1	0,3	6			
(+1h σε Τδωμ) (Τμέτρ =22°C)	3,3	0,3	5			
(+2h σε Τδωμ) (Τμέτρ =20.8°C)	3,9	0,3	6			
100	6,6	-	0,5	2,7	2,7	3,9
	4,2	-	1			
	3,9	-	1,5			
	3,6	-	2			
	3,6	-	3			
	3,6	-	4			
(+1h ψυγείο) (Τμέτρ=17° C)	3,8	-	5			
(+2h ψυγείο) (Τμέτρ=19°C)	3,7	-	6			
(+1h σε Τδωμ) (Τμέτρ =22°C)	3,6	-	5			
(+2h σε Τδωμ) (Τμέτρ =20.8°C)	3,9	-	6			

Οι ίδιοι έλεγχοι ιξώδους εκτελέστηκαν και στο αρχικό αιώρημα ορθοφωσφορικού οξέος-κολλαγόνου που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιοαλάτων σε περιβάλλον ιόντων Ca/P =10/6 η οποία αποτελεί και την στοιχειομετρική αναλογία των δύο στοιχείων που απαντάται στον υδροξυαπατίτη. Η μελέτη του ιξώδους οδήγησε στις ακόλουθες παρατηρήσεις:



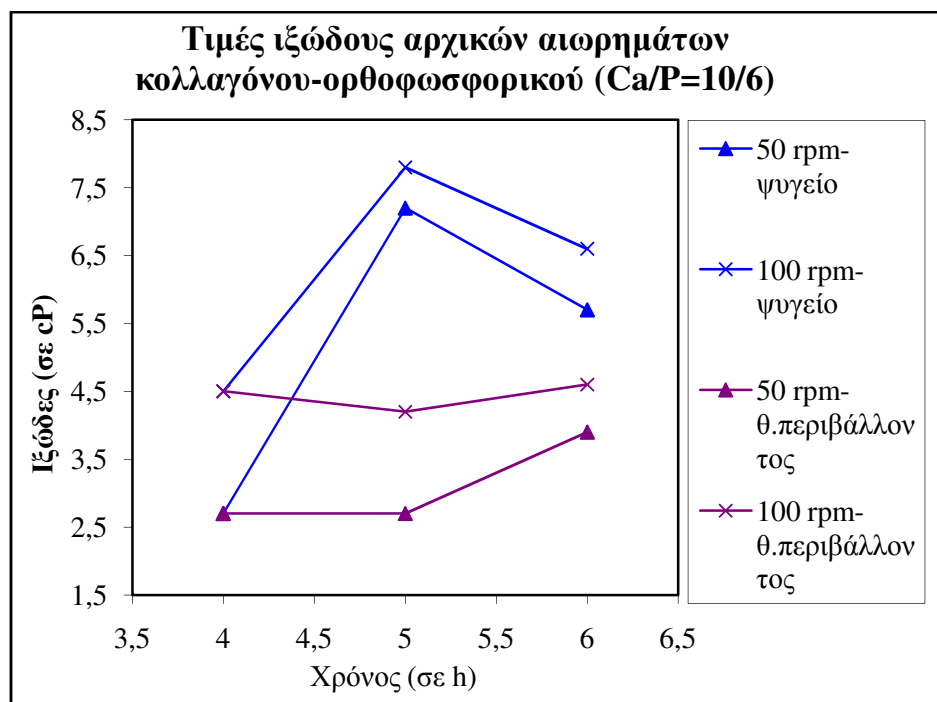
Εικόνα 31-Διάγραμμα απεικόνισης των τιμών ιξώδους πρόδρομου αιωρήματος ορθοφωσφορικού οξέος-κολλαγόνου

Από την καμπύλη μεταβολής ιξώδους που προέκυψε από μετρήσεις ιξώδους στο αιώρημα μετά από χρόνους ανάδευσης 0,5, 1, 1,5, 2, 3 και 4 ώρες και μετρήθηκαν υπό συνθήκες ανάδευσης 50 rpm, παρατηρήθηκε μείωση του ιξώδους του αιωρήματος μέχρι τις μιάμιση ώρα από τιμή ίση με 6,3 σε 3 και «σταθεροποίηση» του σε τιμές γύρω από το 3,3.

Αντίστοιχη εικόνα φαίνεται να παρουσιάζει και το αιώρημα που μελετήθηκε υπό 100 rpm ανάδευση. Οι τιμές ιξώδους του διατηρήθηκαν στα ίδια περίπου επίπεδα κατά την πρώτη ώρα της ανάδευσης, παρουσίασαν πτώση μετά την μία ώρα και σταθεροποίηση μετά την μιάμιση ώρα ανάδευσης γύρω από την τιμή 4,2.

Συνολικά, η μεταβολή του ιξώδους ακολουθεί κοινή πορεία και υπό τις δύο συνθήκες μέτρησης ιξώδους με διατήρηση των τιμών του ιξώδους σε σταθερά επίπεδα μέχρι την πρώτη 1 ώρα ανάδευσης, μείωση μέχρι τη 1,5 ώρα και σταθεροποίηση στην συνέχεια από τη 1,5 ώρα και εξής.

Η μελέτη της περαιτέρω συμπεριφοράς των αιωρημάτων $\text{CoI-H}_3\text{PO}_4$ μετά από ανάδευση για 4 ώρες σε διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης, έγινε με διαίρεση των αιωρημάτων σε τέσσερα μέρη και εξέταση των μισών μετά από ψύξη μίας και δύο ωρών και των υπολοίπων μετά από διατήρηση σε συνθήκες περιβάλλοντος.



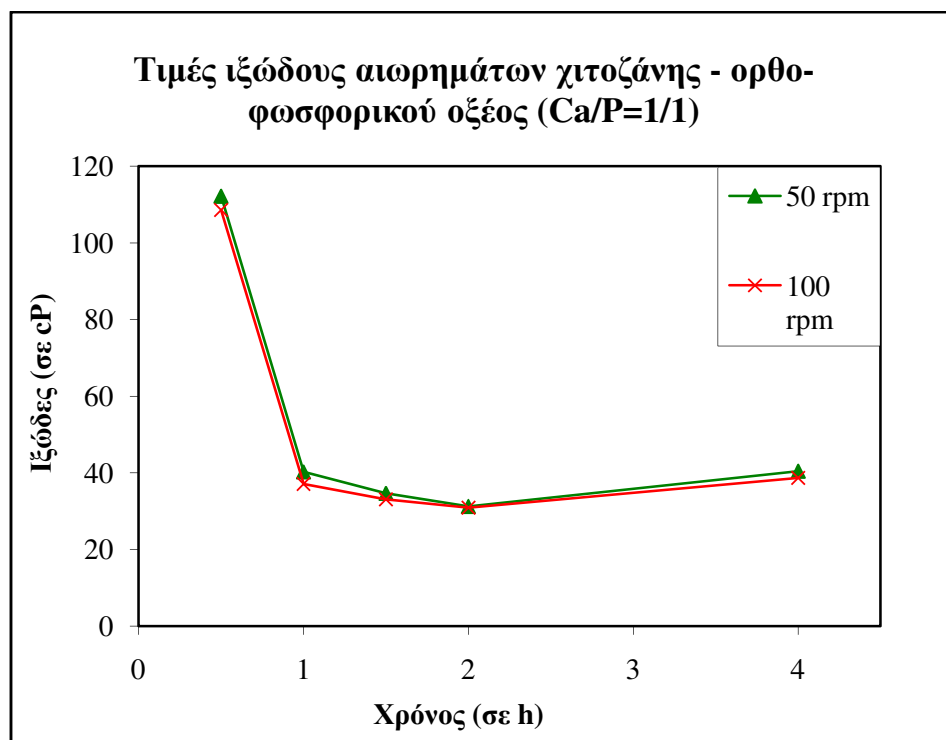
Εικόνα 32- Διάγραμμα απεικόνισης των τιμών ιξώδους πρόδρομου αιωρήματος ορθοφωσφορικού οξέος-κολλαγόνου μετά από διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό συνθήκες ψύξης χωρίς ανάδευση.

Τα αιωρήματα που μελετήθηκαν υπό ταχύτητα ανάδευσης 50 grm και 100 grm μετά από διατήρηση στην ψύξη έδειξαν τάση αύξησης του ιξώδους κατά την πρώτη ώρα και μείωση μέχρι την δεύτερη. Στα αιωρήματα που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, οι τιμές παρουσίασαν διατήρηση στις ίδιες περίπου τιμές κατά την πρώτη ώρα και μικρή αύξηση κατά την δεύτερη. Φαίνεται, λοιπόν πως η διατήρηση του αιωρήματος σε συνθήκες περιβάλλοντος για μεγάλη διάρκεια, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους του αιωρήματος κολλαγόνου-οξέος.

Πίνακας 9- Πίνακας τιμών ιξώδους πρόδρομου αιωρήματος φωσφορικού οξέος-κολλαγόνου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ΗΑρ με αναλογία αντιδραστηρίων Ca/P=10/6

Κολλαγόνο-H ₃ PO ₄ για την παραγωγή ΗΑρ (Ca/P=10/6)						
Στροφές ανάδευσης (rpm)	Ιξώδες (σε cP)	Σφάλμα ±	Χρόνος (σε h)	Ιξώδες αρχικού διαλύματος Αργινίνης	Ιξώδες ΗΑρ (0h) (23°C)	Ιξώδες ΗΑρ (24h) T=19°C
50	6,3	0,3	0,5	3,9	13,95	6,9
	6,3	0,3	1			
	3	0,6	1,5			
	3,3	0,3	2			
	3,3	0,3	3			
	2,7	0,3	4			
(+1h ψυγείο) (Τμέτρ=17° C)	7,2	0,6	5			
(+2h ψυγείο) (Τμέτρ=19°C)	5,7	0,3	6			
(+1h σε Τδωμ) (Τμέτρ =22°C)	2,7	0,3	5			
(+2h σε Τδωμ) (Τμέτρ =20.8°C)	3,9	0,3	6			
100	6,6	-	0,5	3,6	10,2	6
	6,3	-	1			
	4,8	-	1,5			
	4,2	-	2			
	4,2	-	3			
	4,5	-	4			
(+1h ψυγείο) (Τμέτρ=17° C)	7,8	-	5			
(+2h ψυγείο) (Τμέτρ=19°C)	6,6	-	6			
(+1h σε Τδωμ) (Τμέτρ =22°C)	4,2	-	5			
(+2h σε Τδωμ) (Τμέτρ =20.8°C)	4,6	-	6			

Για να εξακριβωθεί κατά πόσον η συμπεριφορά του αρχικού αιωρήματος χιτοζάνης-φωσφορικού οξέος διαφέρει από αυτή των αντίστοιχων αιωρημάτων κολλαγόνου και οξέος εκτελέστηκαν αντίστοιχοι έλεγχοι ιξώδους και σε δείγματα αρχικών αιωρημάτων χιτοζάνης-ορθοφωσφορικού οξέος κατάλληλα για χρήση προς παραγωγή βιοαλάτων υδροξυαπατίτη με λόγο ασβέστιο προς φώσφορο 10/6 και 1/1 μετά από χρόνους ανάδευσης 0.5, 1, 1.5, 2, 3 και 4 ώρες. Οι μετρήσεις ιξώδους έγιναν υπό συνθήκες ανάδευσης 50 και 100 rpm.



Εικόνα 33- Διάγραμμα απεικόνισης των τιμών ιξώδους πρόδρομου αιωρήματος ορθοφωσφορικού οξέος-χιτοζάνης.

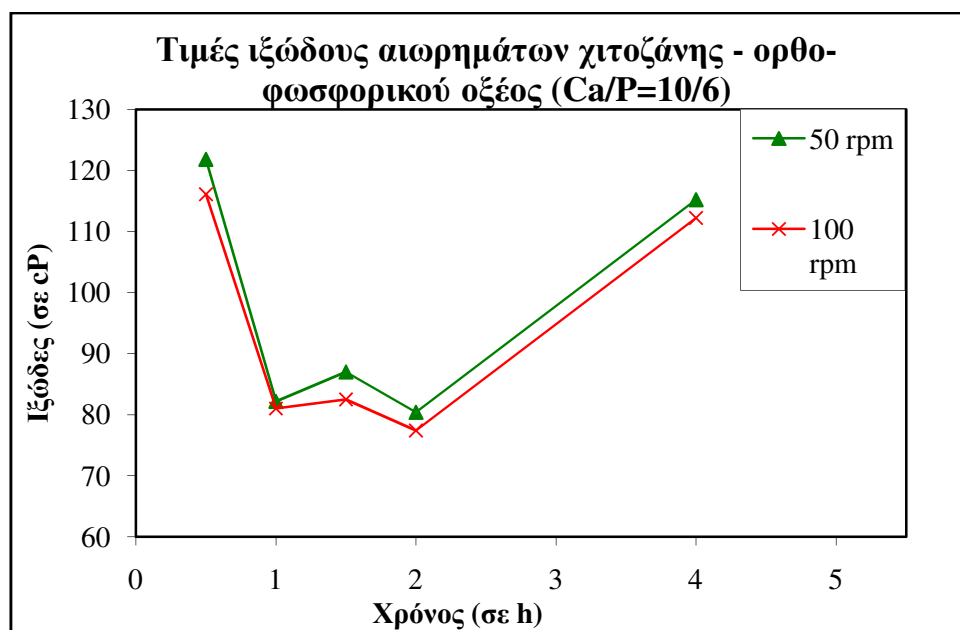
Από τις καμπύλες μεταβολής ιξώδους που προέκυψαν για την πρώτη κατηγορία αιωρημάτων ορθοφωσφορικού οξέος-χιτοζάνης, παρατηρήθηκε ομοιογένεια στην συμπεριφορά του διαλύματος ως προς την μεταβολή του ιξώδους του. Πιο συγκεκριμένα το ιξώδες κατά την πρώτη μισή ώρα της ανάδευσης φάνηκε να διατηρείται σε πολύ υψηλές τιμές (μεταξύ 100 και 120 cP) οι οποίες μέχρι την πρώτη ώρα σημείωσαν απότομη πτώση δίνοντας τιμές γύρω από το 40 cP ενώ η μείωση του ιξώδους συνεχίζεται, όσο συνεχίζεται η διάλυση της χιτοζάνης από το οξύ μέχρι τις 2 ώρες ανάδευσης. Στις δύο ώρες οι τιμές του ιξώδους παρουσιάζουν την ελάχιστη τιμή και στην συνέχεια το ιξώδες παρουσιάζει μικρή αύξηση.

Πίνακας 10- Πίνακας τιμών ιξώδους πρόδρομου αιωρήματος φωσφορικού οξέος-χιτοζάνη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή HAp με αναλογία αντιδραστηρίων Ca/P=1/1

Χιτοζάνη-H ₃ PO ₄ για την παραγωγή HAp (Ca/P=1/1)						
Στροφές ανάδευσης (rpm)	Ιξώδες (σε cP)	Σφάλμα Μέτρησης ±	Χρόνος (σε h)	Ιξώδες αρχικού διαλύματος Αργινίνης	Ιξώδες Hap (0h)	Ιξώδες Hap (24h) T=19°C
50	112,2	-	0,5	3,3	60,6	
	40,2	-	1			
	34,6	-	1,5			
	31,2	-	2			
	40,4	-	4			
100	108,6	-	0,5	4,5	39,6	
	37,1	-	1			
	33,1	-	1,5			
	30,9	-	2			
	38,7	-	4			

Από τις μετρήσεις ιζώδους του αρχικού αιωρήματος οξέος-χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή βιοάλατος υδροξυαπατίτη από αντιδραστήρια με λόγο Ca/P 10/6, έγινε καμπύλη μεταβολής του ιζώδες για χρόνους ανάδευσης 0.5, 1, 1.5, 2 και 4 ώρες και για ταχύτητες μετρήσεων 50 και 100 rpm.

Μετά την πρώτη μισή ώρα της ανάδευσης οι τιμές του ιζώδους παρουσίασαν μείωση και στη επόμενη μισή ώρα αύξηση και ξανά μείωση στην ελάχιστη τιμή της στις δύο ώρες . Μεταξύ δύο και τεσσάρων ωρών το ιζώδες και πάλι αυξήθηκε. Οι αναλυτικές τιμές του ιζώδους που ελήφθησαν από τις μετρήσεις δίνονται στον πίνακα 11. Η αρχική μείωση του ιζώδους αποδίδεται στην διάλυση της χιτοζάνης.



Εικόνα 34- Διάγραμμα απεικόνισης των τιμών ιζώδους πρόδρομου αιωρήματος ορθοφωσφορικού οξέος-χιτοζάνης.

Πίνακας 11 Πίνακας τιμών ιζώδους πρόδρομου αιωρήματος φωσφορικού οξέος-χιτοζάνης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή HAp με αναλογία αντιδραστηρίων Ca/P=10/6

Χιτοζάνη-H ₃ PO ₄ για την παραγωγή HAp (Ca/P= 10/6)						
Στροφές ανάδευσης (rpm)	Ιζώδες (σε cP)	Σφάλμα μέτρησης ±	Χρόνος (σε h)	Ιζώδες αρχικού διαλύματος Αργινίνης	Ιζώδες HAp (0h)	Ιζώδες Hap (24h) T=19°C
50	121,8	-	0,5	4,2	112	105
	82,2	-	1			
	87	-	1,5			
	80,4	-	2			
	115,2	-	4			
100	116,1	-	0,5	3,6	85,8	80
	81	-	1			
	82,5	-	1,5			
	77,4	-	2			
	112,2	-	4			

2.2 Μελέτη του αιωρήματος του παραγόμενου προϊόντος

2.2.1 Μελέτη μεταβολής ιζώδους

Εκτός από το ιζώδες των πρόδρομων διαλυμάτων, μετρήσεις ιζώδους έγιναν και στα τελικά αιωρήματα υδροξυαπατίτη-βιομορίων που προέκυψαν για κάθε συνδυασμό αντιδρώντων. Γενικά θα αναμενόταν τα αιωρήματα υδροξυαπατίτη που παρήχθησαν υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος να παρουσιάζουν μεγαλύτερο ιζώδες σε σχέση με τα αντίστοιχα αιωρήματα που παρήχθησαν με χαμηλότερο λόγο ασβεστίου/φωσφόρου καθώς η ποσότητα των βιομορίων που αντιστοιχούν είναι μικρότερη σε τελικό παραγόμενο αιώρημα ίδιου όγκου. Από τις μετρήσεις ιζώδους που ελήφθησαν από τα διαλύματα δεν επιβεβαιώθηκε η υπόθεση. Αντίθετα, αυτά τα αιωρήματα έδωσαν τελικά προϊόντα με χαμηλότερες τιμές ιζώδους, γεγονός που αποδόθηκε στην καλύτερη διάλυση των βιομορίων από μεγαλύτερη ποσότητα οξέος.

Πιο αναλυτικά τα λαμβανόμενα αποτελέσματα φαίνονται στην συνέχεια.

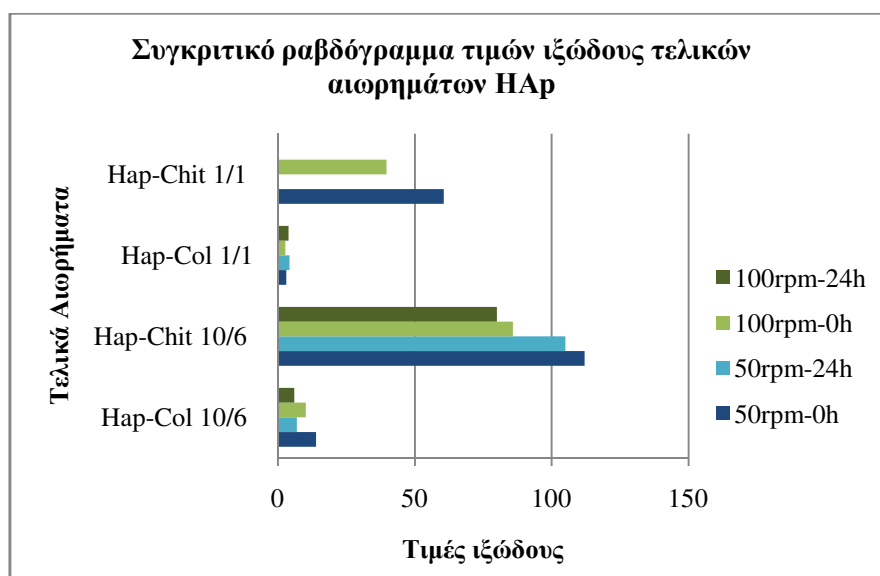
Πίνακας 12-Πίνακας ιζώδους τελικών αιωρημάτων βιοαλάτων-βιομορίων πριν την γήρανση.

	Υδροξυαπατίτης- Κολλαγόνο 10/6	Χιτοζάνη- Υδροξυαπατίτης 10/6	Υδροξυαπατίτης -Κολλαγόνο 1/1	Χιτοζάνη- Υδροξυαπατίτης 1/1
rpm	Ιζώδες HA (0h)	Ιζώδες HA (0h)	Ιζώδες HA (0h)	Ιζώδες HA (0h)
50	13,95	112	3	60,6
100	10,2	85,8	2,7	39,6

Πίνακας 13- Πίνακας ιζώδους τελικών αιωρημάτων βιοαλάτων-βιομορίων μετά από γήρανση 24 ωρών

	Υδροξυαπατίτης- Κολλαγόνο 10/6	Χιτοζάνη- Υδροξυαπατίτης 10/6	Υδροξυαπατίτης -Κολλαγόνο 1/1
rpm	Ιζώδες HAp (24h)	Ιζώδες HAp (24h)	Ιζώδες HAp (24h)
50	6,9	105	4,2
100	6	80	3,9

Από τους πίνακες 9 και 10 κατασκευάστηκε ένα ραβδόγραμμα στο οποίο απεικονίστηκαν οι τιμές ανάλογα με το εξεταζόμενο αιώρημα, την ταχύτητα μέτρησης και το στάδιο της γήρανσης. Βάσει αυτού, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές ιζώδους των αιωρημάτων χιτοζάνης-υδροξυαπατίτη παρουσίασαν μεγαλύτερο ιζώδες σε σχέση με αυτά του κολλαγόνου, ενώ τα αιωρήματα που παρουσίαζαν μικρότερη ποσότητα βιομορίων και οξέος (10/6) παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές ιζώδους σε σχέση με τα αντίστοιχα αιωρήματα που περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα βιομορίων αλλά και οξέος.



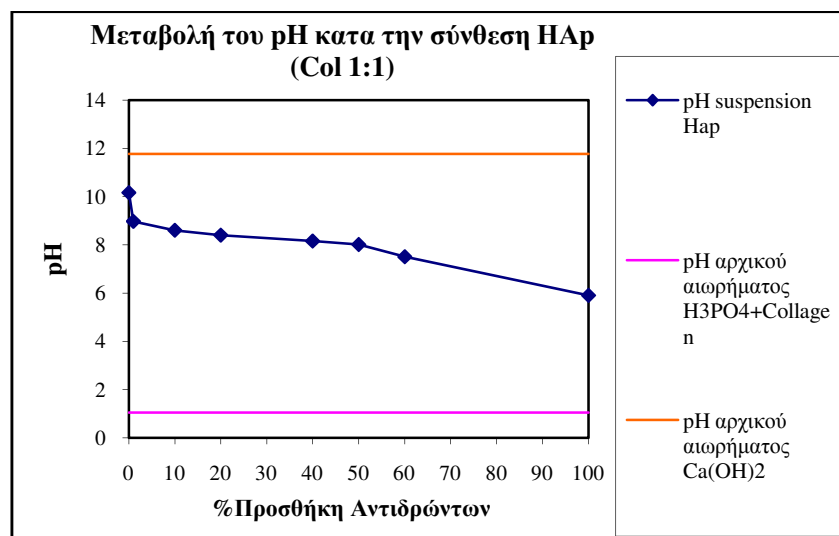
Εικόνα 35. Συγκριτικό ραβδόγραμμα τιμών ιξώδους τελικών αιωρημάτων ΗΑρ

Από την αντιπαράθεση των τιμών ιξώδους ίδιων αιωρημάτων που σημειώθηκαν σε μετρήσεις διαφορετικής ταχύτητας παρατηρήθηκε ότι μικρότερες ταχύτητες κατά την μέτρηση, δηλαδή επιβολή μικρότερης διατμητικής τάσης, έδιναν μεγαλύτερες τιμές ιξώδους για όλα τα αιωρήματα ένδειξη θιξοτροπικής συμπεριφοράς.

2.2.2 Μελέτη μεταβολής pH

Οι μετρήσεις pH μπορούν να αποτελέσουν πολύ σημαντική πηγή πληροφοριών για την μελέτη του μηχανισμού μίας αντίδρασης ειδικά όταν το pH δεν περιορίζεται μέσω της προσθήκης ρυθμιστικού αλλά αφήνεται να μεταβληθεί ελεύθερα κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Βιβλιογραφικά έχει προταθεί πως η μετατροπή άμορφης φάσης προς κρυσταλλική προχωράει μέσα από επιφανειακή κατάλυση πάνω στο άμορφο φωσφορικό ασβέστιο ή και ως αυτοκαταλυτική διαδικασία που ακολουθεί την αναδιάλυση της πρόδρομης φάσης μέσα στο διάλυμα. Η τελευταία περίπτωση αναμένεται να έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση του pH [46].

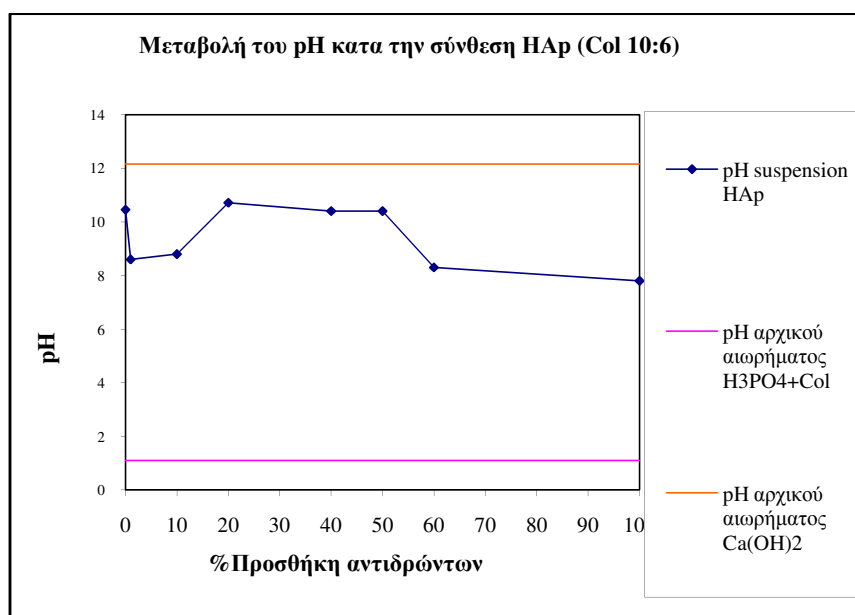
Μεταβολή του pH κατά τον σχηματισμό Υδροξυαπατίτη παρουσία κολλαγόνου με λόγο Ca/P αντιδρώντων 1/1.



Εικόνα 36-Διάγραμμα μεταβολής pH κατά την αντίδραση σχηματισμού βιοαλάτων φωσφορικού ασβεστίου παρουσία κολλαγόνου.

Γενικά από την παρατήρηση της μεταβολής του pH κατά την διάρκεια της αντίδρασης παραγωγής βιομορίων υδροξυαπατίτη παρουσία κολλαγόνου με αναλογία ασβεστίου/φώσφορο στα αρχικά αντιδραστήρια 1:1 (περίσσεια φωσφορικών για τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη) φαίνεται ότι στην περιοχή μεταξύ 40% και 50% της συνολικής προσθήκης αντιδραστηρίων παρατηρείται τοπικό μέγιστο στις τιμές του pH το οποίο όμως είναι πολύ μικρό (και ίσως αμελητέο). Μέχρι το τέλος της αντίδρασης το pH φτάνει σε επίπεδο ελαφρά όξινο όπως και αναμένεται λόγω περίσσειας οξέος.

Μεταβολή του pH κατά τον σχηματισμό Υδροξυαπατίτη παρουσία κολλαγόνου με λόγο Ca/P αντιδρώντων 10/6.

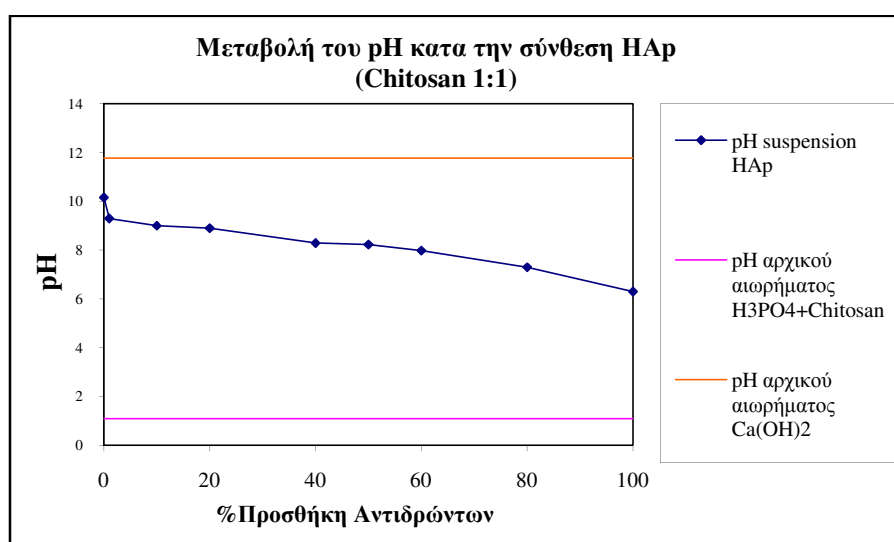


Εικόνα 37-Διάγραμμα μεταβολής pH κατά την αντίδραση σχηματισμού βιοαλάτων φωσφορικού ασβεστίου παρουσία κολλαγόνου

Η μεταβολή του pH κατά την διάρκεια της αντίδρασης παραγωγής βιομορίων υδροξυαπατίτη παρουσία κολλαγόνου με αναλογία ασβεστίου/φώσφορο στα αρχικά αντιδραστήρια 10:6 διαφοροποιείται σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση καθώς εμφανίζεται ένα σαφές «σκαλοπάτι» αύξησης του pH σε πιο βασικές τιμές κατά την διάρκεια της αντίδρασης και μείωσή του μέχρι σχεδόν ουδέτερες τιμές μετά την προσθήκη του 60% των αντιδρώντων. Το «σκαλοπάτι» ενδεχομένως αποτελεί απόδειξη της παραγωγής βιοκεραμικού προϊόντος το οποίο αναδιαλύεται προς σχηματισμό νέας φάσης περισσότερο κρυσταλλικής από την προηγούμενη[46].

Μεταβολή του pH κατά τον σχηματισμό Υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης με λόγο Ca/P αντιδρώντων 1/1.

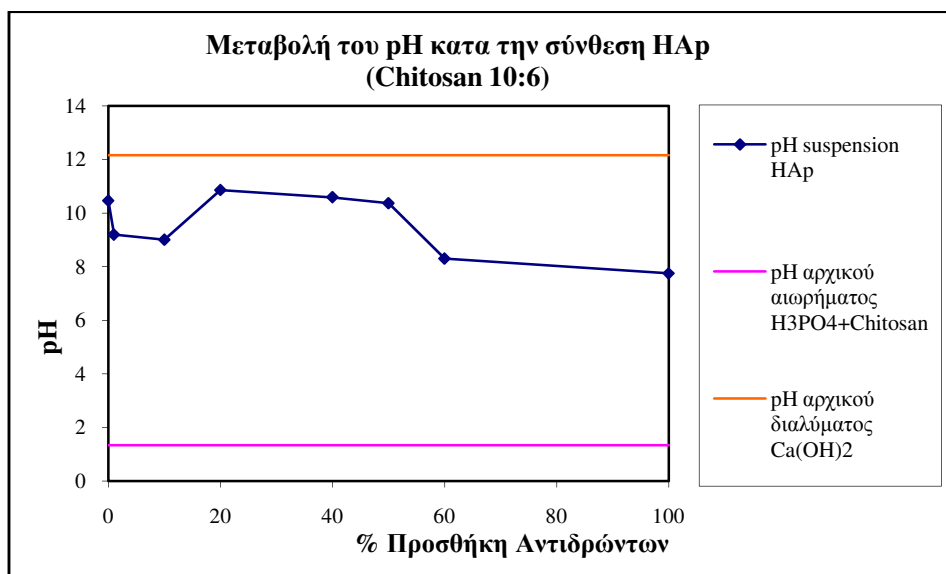
Αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρήθηκαν και κατά την μελέτη του pH στα αιωρήματα κατά τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης. Και πάλι φαίνεται η συνολική μεταβολή του pH να είναι πτωτική μέχρι την τελική τιμή pH. Η μικρή σταθεροποίηση στην μισή περίπου ποσότητα προσθήκης των αντιδρώντων μπορεί να συνδέεται με την κρυστάλλωση και αναδιάλυση αμόρφων συστατικών προς σχηματισμό καλύτερα κρυσταλλωμένων προϊόντων στην περιοχή pH γύρω από το 8.



Εικόνα 38. Διάγραμμα μεταβολής pH κατά την αντίδραση σχηματισμού βιοαλάτων φωσφορικού ασβεστίου παρουσία χιτοζάνης

Κατά τη διάρκεια της μελέτης της μεταβολής του pH κατά την αντίδραση παραγωγής υδροξυαπατίτη παρουσία βιομορίων παρατηρείται και πάλι «σκαλοπάτι» αύξησης του pH μεταξύ 20% και 60% και περαιτέρω μείωση σε ελαφρά βασικό pH ίσο με 8. Ενδέχεται λοιπόν να λαμβάνει χώρα διάλυση αρχικά σχηματιζόμενης άμορφης φάσης για παραγωγή καλύτερα κρυσταλλωμένου προϊόντος.

Μεταβολή του pH κατά τον σχηματισμό Υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης με λόγο Ca/P αντιδρώντων 10/6.



Εικόνα 39. Διάγραμμα μεταβολής pH κατά την αντίδραση σχηματισμού βιοαλάτων φωσφορικού ασβεστίου παρουσία χιτοζάνης

Γενικά παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή του pH παρουσιάζει μικρή αύξηση κατά την διάρκεια της αντίδρασης προτού καταλήξει σε σχεδόν ουδέτερο pH μετά την πλήρη εξουδετέρωση των αντιδρώντων όταν αυτά βρίσκονται σε αναλογία ιόντων Ca/P ίση με 10/6. Όπως και στο διάγραμμα που φαίνεται στην εικόνα το «σκαλοπάτι» ενδεχομένως αποτελεί απόδειξη της παραγωγής βιοκεραμικού προϊόντος το οποίο αναδιαλύεται προς σχηματισμό νέας φάσης περισσότερο κρυσταλλικής από την προηγούμενη [46].

Πίνακας 14. Συγκεντρωτικός πίνακας τιμών pH συναρτήσει του ποσοστού προσθήκης αντιδρώντων

% Προσθήκη αντιδρώντων	Col 1:1	Col 10:6	Chitosan 1:1	Chitosan 10:6
	pH			
0	10,16	10,46	10,16	10,46
1	8,97	8,6	9,3	9,2
10	8,6	8,8	9	9,01
20	8,4	10,72	8,9	10,86
40	8,15	10,41	8,29	10,59
50	8,01	10,41	8,23	10,37
60	7,5	8,3	7,98	8,3
80			7,3	
100	5,9	7,8	6,3	7,75

2.2.3 Μετρήσεις ζ-δυναμικού

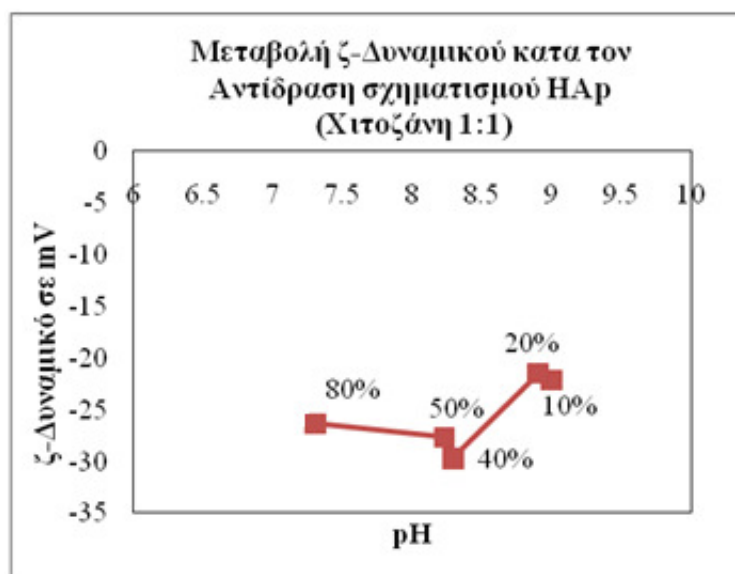
Μέσα από την μελέτη του ζ-δυναμικού, το οποίο αποτελεί μια φυσική ιδιότητα κάθε σωματιδίου σε αιώρηση μπορούν να ληφθούν πολύτιμα στοιχεία για την μελέτη και την βελτιστοποίηση των μελετώμενων υπό αιώρηση συστατικών ενός διαλύματος.

Το ζ δυναμικό του υδροξυαπατίτη είναι σε ουδέτερο pH μεταξύ -9 και -11 mV [75]. Το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων είναι πολύ σημαντικοί παράμετροι για τον προσδιορισμό του ζ δυναμικού, οι αυξομειώσεις στο μέγεθος των κόκκων στις νανοδιαστάσεις παίζει σημαντικό ρόλο στις αναμενόμενες τιμές δυναμικού. Λόγου χάρη, νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους παρουσιάζουν τιμές ζ δυναμικού πιο αρνητικές σε σχέση με μικρότερου μεγέθους [76][77]. Η συμπεριφορά αυτή που παρουσιάζουν αιωρήματα νανοσκοόνων, αποδίδεται σε τρεις διαφορετικούς παράγοντες: την αύξηση στην συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη λόγω διάστασης επιφανειακών θέσεων πάνω στα σωματίδια, την μείωση του ζ-δυναμικού λόγω αύξησης των υδροδυναμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σωματιδίων και των διαταραχών του ηλεκτρικού πεδίου γύρω από κάθε σωματίδιο γεγονός που μειώνει την δυναμική του κινητικότητα. Ακόμα ένας παράγοντας που επηρεάζει την μείωση της απόλυτης τιμής του δυναμικού είναι η μείωση ηλεκτροφορητικής κινητικότητας λόγω αύξησης στις ελκτικές διασωματιδιακές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνει κατά την μείωση των αποστάσεων μεταξύ των νανοσωματιδίων καθώς αυξάνεται το κλάσμα του όγκου.

Το ζ-δυναμικό εξαρτάται από δύο παράγοντες, το pH και την αγωγιμότητα του αιωρήματος. Κατά την εξέλιξη της αντίδρασης εξουδετέρωσης με περίσσεια φωσφορικού οξέος που λαμβάνει χώρα κατά τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης παρατηρείται μεταβολή στις τιμές του pH, η οποία επηρεάζει το ζ δυναμικό των σωματιδίων. Καθώς το σύστημα που μελετάται είναι σύνθετο και συντίθεται από ένα σύνολο αλληλεπιδρώντων οργανικών και ανόργανων σωματιδίων κολλοειδών διαστάσεων (χιτοζάνη, φωσφορικά άλατα του ασβεστίου) η συγκεκριμένη ιδιότητα αποτελεί ένα καλό κριτήριο μελέτης του εύρους της αλληλεπίδρασης μεταξύ των σωματιδίων του κολλοειδούς αιωρήματος.

Πίνακας 15. Τιμές ζ-δυναμικού συναρτήσει του ποσοστού προσθήκης αντιδρώντων μέχρι το τελικό αιώρημα υδροξυαπατίτη παρουσία χιτοζάνης.

Molarity %Μτελ	pH	ζ- δυναμικό mV
10%	9	-22.125
20%	8.9	-21.46
40%	8.29	-29.72
50%	8.23	-27.64
80%	7.3	-26.3



Εικόνα 40-Διάγραμμα μεταβολής του ζ-δυναμικού συναρτήσει του ποσοστού προσθήκης αντιδρώντων.

Από το διάγραμμα που προκύπτει φαίνεται ότι το αιώρημα παίρνει τις μεγαλύτερες κατ' απόλυτη τιμή, τιμές ζ-δυναμικού και άρα βρίσκεται στην πιο σταθερή του θέση μετά από αντίδραση του 40% των αντιδρώντων (-29,7 mV)

Εκτός από τις μετρήσεις τιμών ζ-δυναμικού κατά την διάρκεια της αντίδρασης σχηματισμού υδροξυαπατίτη παρουσία βιομορίων (στην ανωτέρω περίπτωση χιτοζάνης με περίσσεια φωσφορικών ιόντων) έγιναν και μετρήσεις ζ-δυναμικού στα τελικά παραγόμενα αιωρήματα υδροξυαπατίτη για τις διαφορετικές αναλογίες με σκοπό να εξακριβωθεί ποιο από τα αιωρήματα παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα στην τελική του κατάσταση. Η μεγαλύτερη σταθερότητα αιωρήματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ομοιογενή παραγωγή τελικού προϊόντος.

Από τον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 16) παρατίθενται οι μετρήσεις ζ-δυναμικού που ελήφθησαν από κάθε αιώρημα καθώς και το pH που μετρήθηκε σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 16-Μετρήσεις ζ-δυναμικού στα τελικά αιωρήματα υδροξυαπατίτη-βιομορίων

Μετρήσεις ζ-Δυναμικού στα αιωρήματα υδροξυαπατίτη			
Δείγμα ΗΑρ	ζ-Δυναμικό σε mV	Απόκλιση	pH
Chit			
10:6	-21.3	± 1,2	7.75
1:1	-15.8	± 2,2	6.3
Col			
10:6	-20	± 1,9	7.8
1:1	-22.1	± 0,2	5.9

Βάσει των μετρήσεων παρατηρείται ότι το σταθερότερο αιώρημα, δηλαδή το αιώρημα εκείνο στο οποίο η τιμή του ζ-δυναμικού απέχει από το μηδέν την μέγιστη

κατ' απόλυτη τιμή, είναι το αιώρημα υδροξυαπατίτη που παρήχθη σε περιβάλλον παρουσία κολλαγόνου και περίσσειας φωσφορικών ιόντων.

Μεταξύ των δύο τελικών αιωρημάτων χιτοζάνης το αιώρημα που παρήχθη με λόγο ιόντων ασβεστίου προς φώσφορο 10/6 φαίνεται να είναι σταθερότερο από το αιώρημα που παρήχθη υπό συνθήκες περίσσειας ιόντων φωσφορικού. Αντίθετα το αιώρημα υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου που παρήχθη υπό περίσσεια ιόντων φωσφορικών δεν φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη απόκλιση τιμών ζ-δυναμικό στην μια και στην άλλη περίπτωση.

2.3 Μελέτη τελικού προϊόντος υπό μορφής σκόνης

Χαρακτηρισμός δειγμάτων μέσω FT-IR, XRD, Raman

2.3.1 Ταυτοποίηση φάσεων – Περιθλασιμετρία ακτίνων X

Για την ταυτοποίηση και μελέτη των παραγόμενων φάσεων και των σχηματιζόμενων δομών φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου οι παραγόμενες σκόνες μελετήθηκαν με την μέθοδο περιθλασιμετρίας ακτίνων X. Η βασική κορυφή του υδροξυαπατίτη εντοπίζεται στις 31.77° (000-09-0432 Hydroxyapatite,syn). Καθώς προχωράει η κρυστάλλωση και αυξάνει το μέγεθος των κόκκων του υδροξυαπατίτη, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πιο ευδιάκριτης κορυφής στο φάσμα που παράγεται από την περιθλαση.

Για να παρατηρηθεί η εξέλιξη της κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος με περιθλασιμετρία ακτίνων X σε περιορισμένο εύρος γωνιών 27° - 34° μέσα στο οποίο εγκλωβίζεται η βασική κορυφή του υδροξυαπατίτη. Από όλα τα δείγματα που παρήχθησαν εξετάστηκαν σκόνες από τρία διαδοχικά στάδια της παραγωγής του τελικού προϊόντος,

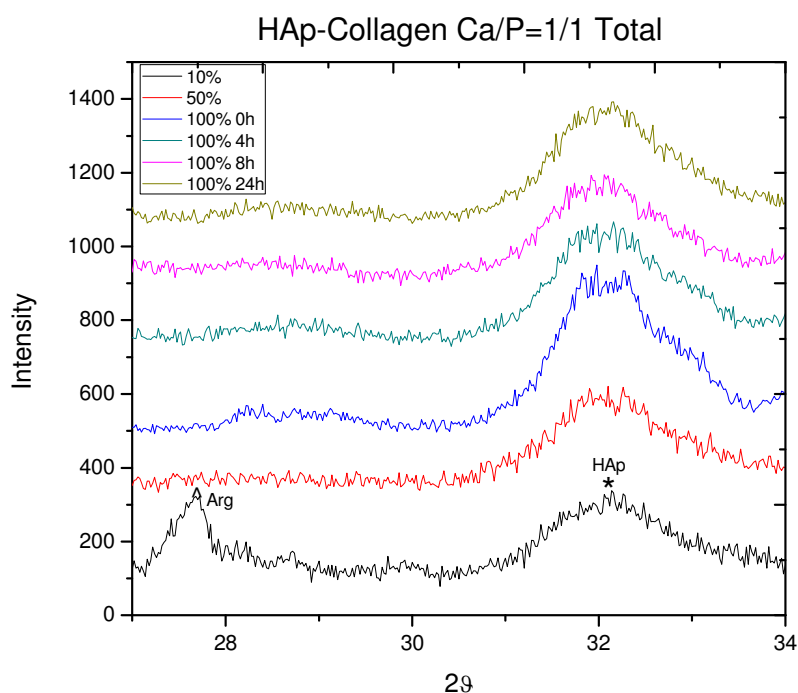
- το στάδιο όπου μόνο το 10% της τελικής απαιτούμενης ποσότητας έχει αντιδράσει παρουσία αντίστοιχα μικρότερης ποσότητας κολλαγόνου και περίσσειας αργινίνης,
- το στάδιο όπου το σύνολο της ποσότητας του ασβεστίου έχει αντιδράσει πλήρως παράγοντας φωσφορικά άλατα του ασβεστίου παρουσία κολλαγόνου πριν την γήρανση του αιωρήματος και τελικά
- στο τελικό προϊόν μετά από την γήρανση.

Στα φάσματα των δειγμάτων που λήφθηκαν ύστερα από διάφορους χρόνους γήρανσης καθώς και από το δείγμα ενδιάμεσης μοριακής συγκέντρωσης αντιδρώντων η μόνη ορατή κορυφή σε αυτό το εύρος γωνιών είναι αυτή του υδροξυαπατίτη στις $31,7^\circ$. Παρατηρήθηκε μια μικρή μεταβολή στο σχήμα της κορυφής του υδροξυαπατίτη γεγονός που αποτελεί ένδειξη κάποιας μεταβολής που συμβαίνει στον υδροξυαπατίτη κατά την διάρκεια της γήρανσης και χρήζει περαιτέρω έρευνας. Άλλες σημαντικές διαφορές δεν εντοπίστηκαν μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικών χρόνων γήρανσης.

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1:1

- Μελέτη εξέλιξης παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση και γήρανση

Στο δείγμα σκόνης που παρήχθη με το 10% της συνολικής απαιτούμενης ποσότητας αντιδρώντων, ταυτοποιήθηκε μια κορυφή του υδροξυαπατίτη (000-09-0432 Hydroxyapatite, syn) στις $31,7^\circ$ και μια κορυφή της αργινίνης στις $27,6^\circ$ (000-30-1527 L-Arginine).

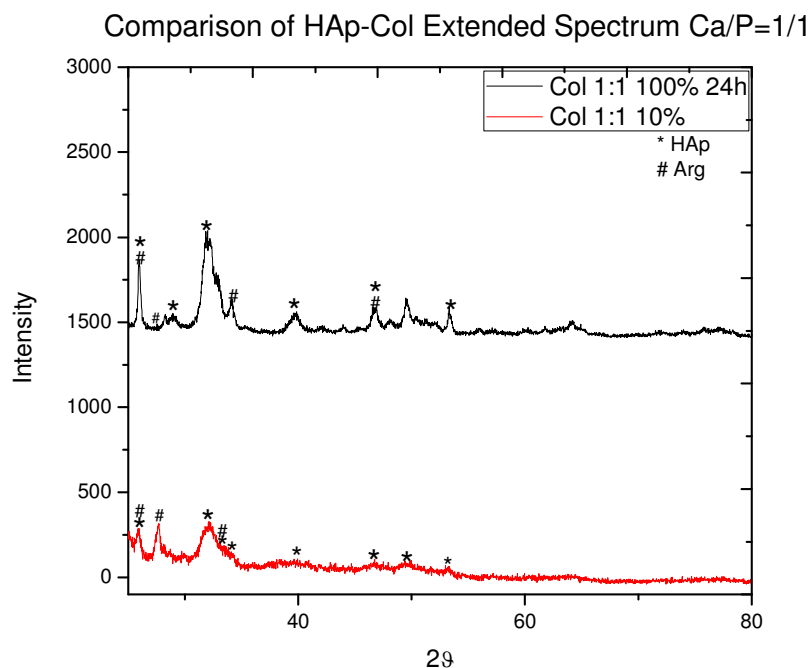


Εικόνα 41. Φάσμα περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν υπό συνθήκες περίσσειας, παρουσία κολλαγόνου

Επειδή από το περιορισμένο φάσμα αυτό δεν είναι δυνατόν να γίνει ταυτοποίηση με βεβαιότητα, τα δύο δείγματα 10% και 100% μελετήθηκαν και σε μεγαλύτερο εύρος γωνιών από 25° μέχρι 80° .

Από την παρατήρηση του φάσματος περίθλασης 25° - 80° μοιρών που προέκυψε από την σκόνη που παρασκευάστηκε βάσει του 10% της τελικής μοριακής συγκέντρωσης ταυτοποιήθηκε η φάση του υδροξυαπατίτη ενώ ανιχνεύτηκαν και κορυφές της αργινίνης.

Από την παρατήρηση του εκτεταμένου φάσματος περίθλασης της σκόνης του τελικού προϊόντος ταυτοποιήθηκε μόνο η φάση του υδροξυαπατίτη. Το γεγονός ότι όλες σχεδόν οι κορυφές που παρουσιάζονται συμπίπτουν με κορυφές που ταυτοποιούν τον υδροξυαπατίτη επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση ότι το τελικό προϊόν αποτελείται σχεδόν εξολοκλήρου από υδροξυαπατίτη. Ωστόσο, το γεγονός ότι οι κορυφές είναι πολύ ευρείες είναι ενδεικτικό ότι το προϊόν μας είναι νανοκρυσταλλικό.

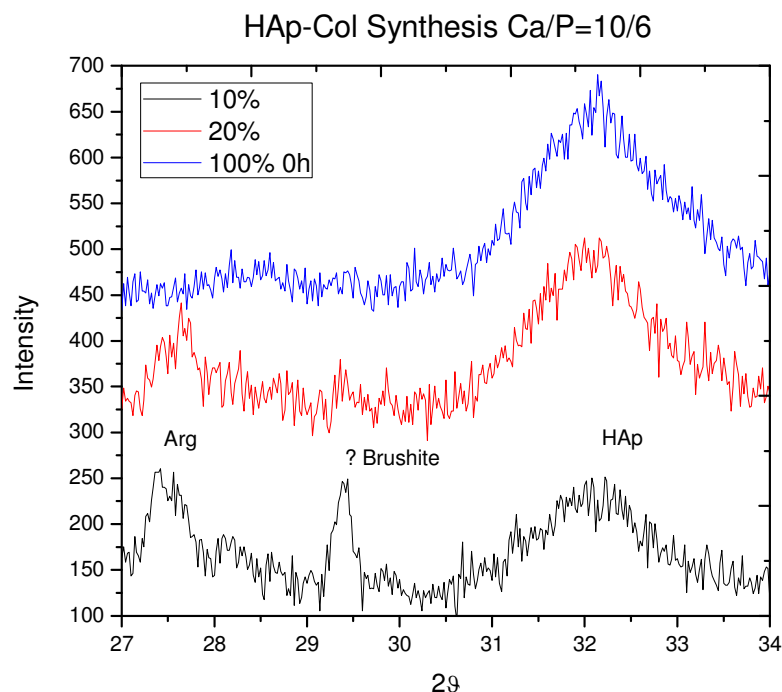


Εικόνα 42. Φάσμα περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν υπό συνθήκες περίσσειας, παρουσία κολλαγόνου.

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10:6

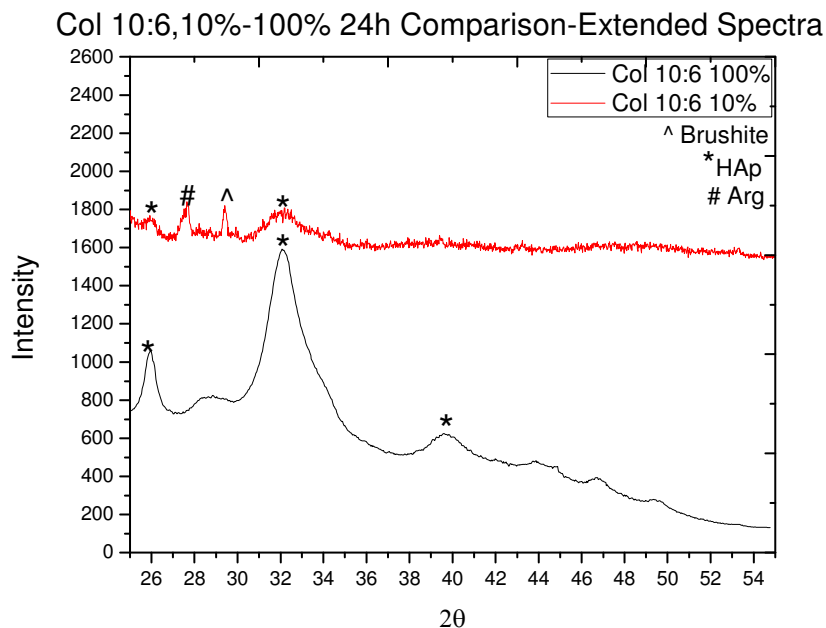
- Μελέτη εξέλιξης παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση

Από την πειραματική σειρά των δειγμάτων υδροξυαπατίτη που παρασκευάστηκαν με λόγο αντιδρώντων Ca/P ίσο με 10:6 η σκόνη που προέκυψε από την αντίδραση του 10% των αντιδραστηρίων, έδωσε δύο κορυφές εκτός από την κορυφή του υδροξυαπατίτη στις 31,7°. Από αυτές, η μια στις 27,5° αποδίδεται στο φάσμα της αργινίνης (000-30-1527) και μια στις 29,4° αποδόθηκε στον μπρουσίτη (000-72-0713). Οι δύο κορυφές ανιχνεύονται και στο δείγμα μοριακής συγκέντρωσης 20% της συνολικής, με μικρότερη όμως ένταση, μέχρι προσθήκης και αντίδρασης του συνόλου των αντιδρώντων όπου ταυτοποιήθηκε μόνο υδροξυαπατίτης.



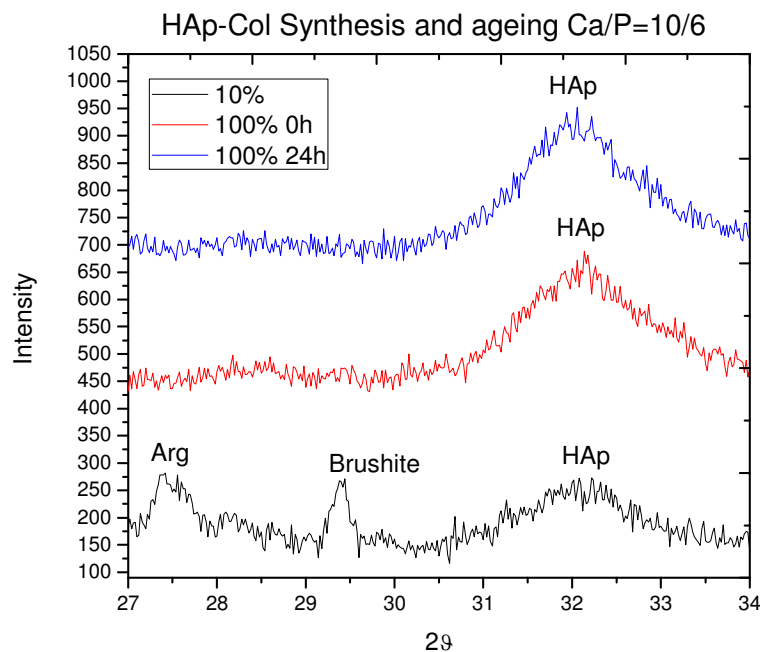
Εικόνα 43. Φάσμα περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν χωρίς περίσσεια φωσφορικού οξέος παρουσία κολλαγόνου

Για να ληφθεί μια πιο ευρεία εικόνα της νέας κορυφής και να εξεταστεί η ύπαρξη άλλων νέων κορυφών που θα μας βοηθήσουν στην ταυτοποίηση της νέας φάσης έγινε περιθλασιμετρία ακτίνων X σε μεγαλύτερο εύρος γωνιών από 25° μέχρι 55° και στην συνέχεια έγινε σύγκριση μεταξύ των κορυφών της σκόνης του τελικού προϊόντος και του αρχικού σταδίου της αντίδρασης. Η σύγκριση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η νέα φάση έχει μειωθεί σημαντικά σε ένταση αναλογικά με τις κορυφές του υδροξυαπατίτη της τελικής σκόνης ενώ και η βασική κορυφή της αργινίνης δεν φαίνεται στο τελικό προϊόν. Η σκόνη του τελικού προϊόντος αποτελείται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από υδροξυαπατίτη καθώς ταυτοποιούνται κορυφές στις τρεις βασικές θέσεις κορυφών του υδροξυαπατίτη (στις 31.7° , 32.2° και $25,8^{\circ}$). Οι κορυφές αυτές παρουσιάζουν και τις μεγαλύτερες εντάσεις σε όλο το παραγόμενο φάσμα. Το γεγονός ότι οι κορυφές είναι πολύ ευρείες (και κυρίως στην περιοχή της κύριας κορυφής του υδροξυαπατίτη 31.7 , 32.2) είναι ενδεικτικό της νανοκρυσταλλικότητας του προϊόντος. Ενδεχομένως η φαρδιά κορυφή μεταξύ 28 και 30° να οφείλεται κατά μέρος στην ύπαρξη μικρής ποσότητας μπρουσίτη.



Εικόνα 44. Σύγκριση φασμάτων περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν χωρίς περίσσεια φωσφορικού οξέος παρουσία κολλαγόνου στο αρχικό και τελικό στάδιο αντίδρασης.

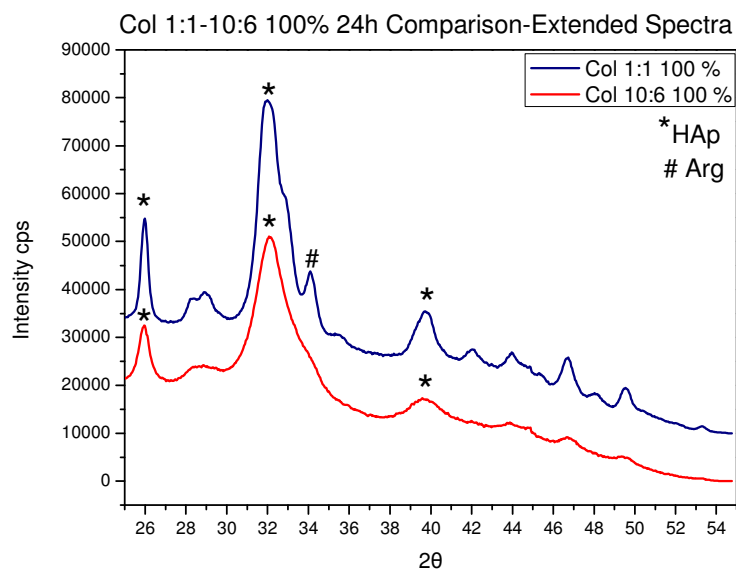
Από τα δείγματα σκονών των δύο ακραίων χρόνων γήρανσης (0 και 24 ώρες) η περιθλασιμετρία ακτίνων X δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στην κορυφή του υδροξυαπατίτη ούτε ως προς την ένταση, ούτε ως προς το πλάτος. Ταυτοποιήθηκε η βασική κορυφή του υδροξυαπατίτη στις $31,7^\circ$ και δεν παρατηρήθηκαν κορυφές οργανικών μορίων όπως της αργινίνης, ή πρόδρομων φάσεων όπως ο μπρουσίτης μεταξύ 27° και 34° .



Εικόνα 45. Φάσμα περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν χωρίς περίσσεια φωσφορικού οξέος παρουσία κολλαγόνου

- Σύγκριση με φάσματα Col 1:1

Από την σύγκριση των κορυφών που προκύπτουν από τα δύο τελικά προϊόντα των δύο πειραματικών σειρών του κολλαγόνου μπορεί να σημειωθεί ότι το παραγόμενο φάσμα του 10/6 παρουσιάζει ευρύτερες κορυφές και πιο μικρές εντάσεις σε σχέση με το αντίστοιχο φάσμα του 1:1. Αποδεικνύεται έτσι ότι το παραγόμενο προϊόν στην πρώτη περίπτωση είναι πιο νανοκρυσταλλικό από την σκόνη της δεύτερης περίπτωσης η οποία φαίνεται καλύτερα κρυσταλλωμένη.

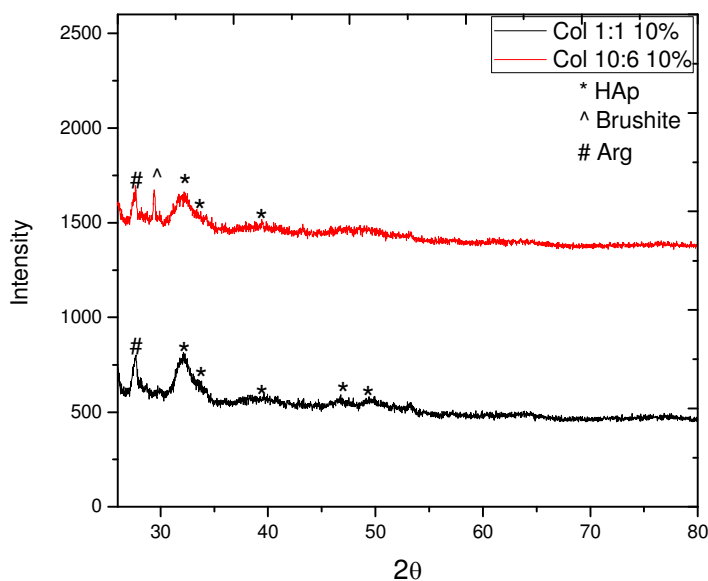


Εικόνα 46. Σύγκριση φασμάτων περίθλασης ακτίνων Χ των δειγμάτων που παρήχθησαν με και χωρίς περίσσεια φωσφορικού οξέος παρουσία κολλαγόνου

Από την σύγκριση των φασμάτων των αρχικών σταδίων της αντίδρασης, παρατηρείται ότι με εξαίρεση την νέα κορυφή που σχηματίστηκε στις 29,4°, το φάσμα του 10/6 βρίσκεται σε συμφωνία με το φάσμα 10% της σκόνης βιοκεραμικού που παρασκευάστηκε με λόγο Ca/P στα αντιδρώντα 1:1.

Μοναδική επιπρόσθετη παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι ότι φαίνεται πως μεταξύ των δύο δειγμάτων το δείγμα υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου που παρήχθη υπό συνθήκες στοιχειομετρικής αναλογίας 1:1 στο τελικό διάλυμα παραγωγής, φαίνεται να έχει οδηγήσει στην παραγωγή καλύτερα κρυσταλλωμένου προϊόντος καθώς οι κορυφές φαίνονται πιο υψηλές και οξείες. Η παρατήρηση αυτή είναι κοινή όπως φαίνεται από τα αρχικά μέχρι τα τελικά στάδια της αντίδρασης.

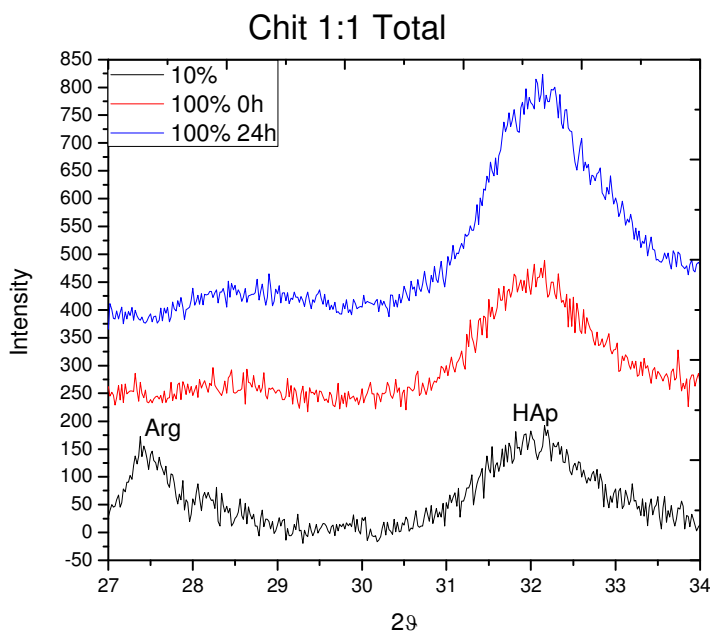
Col 1:1 -10:6 10% Comparison-Extended Spectra



Εικόνα 47. Σύγκριση φασμάτων περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων αρχικών σταδίων της αντίδρασης που παρήχθησαν με και χωρίς περίσσεια φωσφορικού οξέος παρουσία κολλαγόνου

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνη παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1:1

Από τα φάσματα περίθλασης που ελήφθησαν μεταξύ 27° και 34° φαίνεται και πάλι η σταδιακή αύξηση της κορυφής του υδροξυαπατίτη που αποτελεί απόδειξη της εξέλιξης της κρυστάλλωσης.

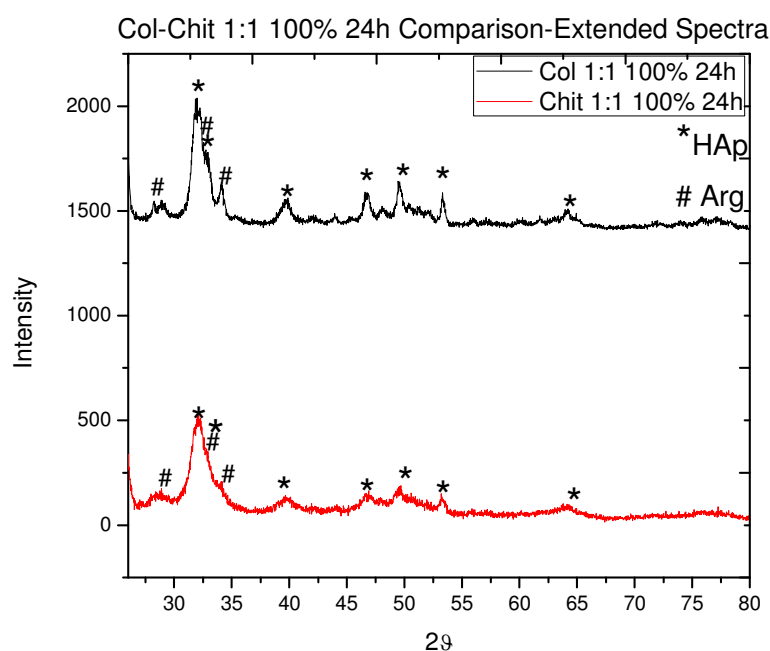


Εικόνα 48. Φάσμα περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος παρουσία χιτοζάνης

Η κορυφή που παρουσιάζεται στις 27,5° μόνο στο δείγμα σκόνης που προέκυψε από το 10% αποδόθηκε στην αργινίνη, ενώ στις 31,7° ανιχνεύθηκε η βασική κορυφή του υδροξυαπατίτη με χαμηλή όμως ένταση. Στα δείγματα τελικών αναλογιών αντιδρώντων που λήφθηκαν πριν και μετά την γήρανση ταυτοποιήθηκε μόνο η κορυφή του υδροξυαπατίτη στις 31,7° της οποίας η κορυφή φάνηκε να αυξήθηκε σε ένταση με την ολοκλήρωση της γήρανσης.

- Σύγκριση με φάσματα Col 1:1

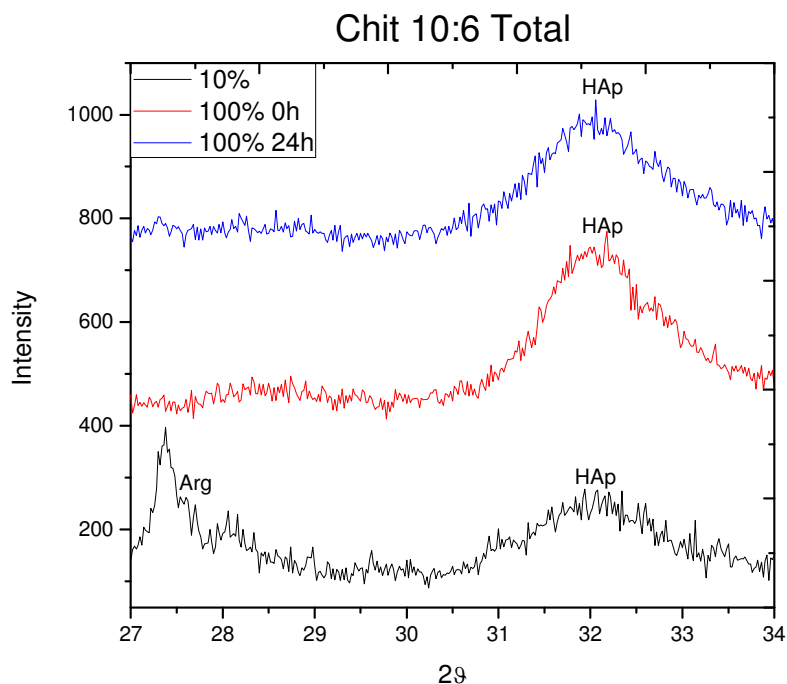
Το φάσμα X της σκόνης υδροξυαπατίτη που προέκυψε από το τελικό στάδιο, συγκρίθηκε με το φάσμα του τελικού προϊόντος που προέκυψε από το σύστημα HA-Col παρασκευασμένο με ίδιο λόγο Ca/P=1/1. Παράγονται τα ίδια προϊόντα όπως καταδεικνύεται από την εμφάνιση κορυφών στις ίδιες ακριβώς θέσεις, το τελικό προϊόν του υδροξυαπατίτη που κρυσταλλώθηκε παρουσία κολλαγόνου όμως παρουσιάζει πιο ευδιάκριτες και πιο οξείες κορυφές σε σχέση με το προϊόν που κρυσταλλώθηκε παρουσία χιτοζάνης. Το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις στο TEM που έδειξαν πιο μικρούς κόκκους και πιο ανομοιογενή δομή στην περίπτωση των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν παρουσία χιτοζάνης. Στο ακόλουθο διάγραμμα, φαίνονται οι κορυφές υδροξυαπατίτη (000-09-0432 Hydroxyapatite, syn), και αργινίνης στις 27,6° (000-04-0180 L-Arginine) που ταυτοποιήθηκαν.



Εικόνα 49. Σύγκριση φασμάτων περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος παρουσία χιτοζάνης και κολλαγόνου

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνη παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10:6

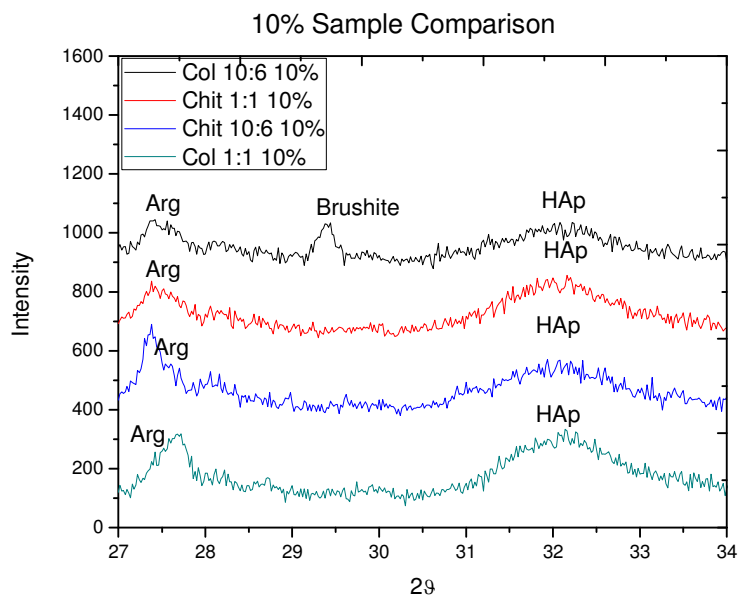
Μετά από εξέταση των παραγόμενων σκόνων από το 10%, 100% πριν και μετά την γήρανση με περιθλασιμετρία ακτίνων X, παρατηρήθηκε και πάλι μια κορυφή από την αργινίνη στις 27,5° και μία του υδροξυαπατίτη στις 31,7° στην σκόνη του 10% και μονάχα η κορυφή του υδροξυαπατίτη στις 31,7° στα δύο επόμενα δείγματα .



Εικόνα 50. Φάσμα περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων που παρήχθησαν χωρίς περίσσεια φωσφορικού οξέος παρουσία χιτοζάνης

Σύγκριση φασμάτων 10%

Σε μια γενική σύγκριση των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν με το 10% της τελικής ποσότητας παρατηρείται ύπαρξη του υδροξυαπατίτη σε όλα τα δείγματα και όλες τις μοριακές αναλογίες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη ήδη από τα αρχικά στάδια της αντίδρασης για όλες τις περιπτώσεις.



Εικόνα 51. Σύγκριση φασμάτων περίθλασης ακτίνων X των δειγμάτων αρχικών σταδίων της αντίδρασης.

Συγκεντρωτικά, σε όλα τα δείγματα κόνεων του 10% επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη κορυφής υδροξυαπατίτη στις 31,7°, ενώ ανιχνεύεται και κορυφή αργινίνης στις 27,5° λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης της σε σχέση με τα αντιδρώντα στο περιβάλλον της σύνθεσης στο τέλος της αντίδρασης. Μπροσίστης ανιχνεύτηκε μόνο στο δείγμα 10% του κολλαγόνου 10/6 γεγονός που ίσως μεταφράζεται ως καθυστέρηση της αντίδρασης απουσία περίσσειας οξέος και διατήρηση της ανιχνεύσιμης πρόδρομης φάσης του μπρουσίτη.

2.3.2 Ταυτοποίηση φάσεων- φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Φουριέ χρησιμοποιείται για να επιβεβαιώσει την χημική δομή των τελικά παραγόμενων κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Το φάσμα απορρόφησης που λαμβάνεται με τα όργανα FT-IR μετά τον μετασχηματισμό Fourier, είναι ένα διάγραμμα με τεταγμένη την διαπερατότητα του δείγματος και τετμημένη τον κυματαριθμό σε cm^{-1} .

Οι βασικές παράμετροι μιας ζώνης απορρόφησης στο IR είναι η θέση της ζώνης, το πλάτος της ημιζώνης, η ένταση της και η ολοκληρωμένη ένταση που υπολογίζεται μέσω της μέτρησης του εμβαδού της κορυφής. Στα υπέρυθρα φάσματα διακρίνονται δύο περιοχές φάσματος, η περιοχή με τις συχνότητες των χαρακτηριστικών ομάδων ($4000-1400 \text{ cm}^{-1}$) από την οποία επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών ομάδων των μορίων, και η περιοχή αποτύπωσης ($1400-400 \text{ cm}^{-1}$) από την οποία επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση ολόκληρων των μορίων.

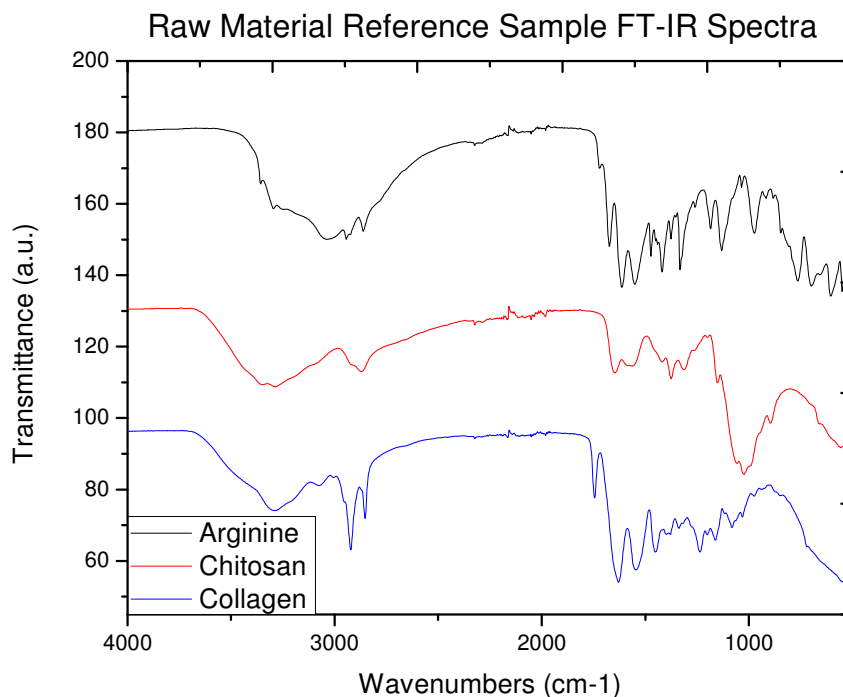
Στην πρώτη περιοχή συχνοτήτων, οι κύριες ζώνες απορρόφησης που προκύπτουν από την δόνηση ομάδων με δύο μόνο άτομα και με συχνότητα χαρακτηριστική των μαζών τους και της σταθεράς δύναμης που τα συνδέει. Στην περιοχή αποτύπωσης οι ζώνες απορρόφησης σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου [71].

Αναλύσεις φασματοσκοπίας υπερύθρου έγιναν στις τελικές σκόνες που προέκυψαν μετά την ξήρανση για τα δείγματα που προέκυψαν μετά από προσθήκη του 10 % και 50% των συνολικών ποσοτήτων προς αντίδραση, καθώς και σε σκόνες βιοκεραμικού υδροξυαπατίτη στην τελική του μορφή πριν και μετά την γήρανση για κάθε ένα από τους συνδυασμούς κολλαγόνου-υδροξυαπατίτη και χιτοζάνη-υδροξυαπατίτη. Μέσα από τις διαφοροποιήσεις μεταξύ των φασμάτων των διαφορετικών σταδίων της αντίδρασης επιδιώκεται η λήψη συμπερασμάτων σχετικά με τον μηχανισμό που ακολουθεί η αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη παρουσία βιομορίων.

Δείγματα αναφοράς Κολλαγόνου, Χιτοζάνης και Αργινίνης

Για να γίνει δυνατή η διάκριση των κορυφών απορρόφησης του FT-IR που οφείλονται στα βιομόρια γίνεται αντιπαράθεση του φάσματος που προκύπτει από τα δείγματα σκόνης της ελάχιστης και μέγιστης προσθήκης αντιδρώντων, με τα φάσματα υπερύθρου που προέκυψαν κατά την μελέτη των πρώτων υλών των βιομορίων που χρησιμοποιήθηκαν. Από τα φάσματα αναφοράς απομονώθηκαν οι κορυφές που αντιστοιχούν στο κολλαγόνο, την χιτοζάνη και την αργινίνη ώστε να γίνει διάκριση των κορυφών που οφείλονται στα φωσφορικά άλατα.

Επειδή τα οργανικά μόρια στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται ως υλικά αποτύπωσης με σκοπό τον κατά το δυνατόν έλεγχο της κρυστάλλωση του υδροξυαπατίτη, είναι σημαντικό να ταυτοποιηθούν οι κορυφές τους που αντιστοιχούν σε αυτά και να διακριθούν από αυτές που αντιστοιχούν στα φωσφορικά άλατα. Για να γίνει η διάκριση αυτή, λήφθηκαν φάσματα μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR) των σκονών των βιομορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτες ύλες κατά την τέλεση των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 52. Φάσματα απορρόφησης δειγμάτων αναφοράς

Αναφορικά οι κορυφές των οργανικών που ανιχνεύτηκαν από τα φάσματα υπερύθρου της πρώτης ύλης του κολλαγόνου, ήταν οι: 527, 720, 851, 876, 923, 938, 975, 1029, 1081, 1116, 1160, 1200, 1237, 1279, 1316, 1335, 1378, 1397, 1450, 1544, 1628, 1742, 1964, 1979, 2288, 2323, 2853, 2871, 2920, 2955, 3004, 3077, 3289 cm^{-1} . Από το φάσμα δείγματος αναφοράς της αργινίνης εντοπίστηκαν κορυφές στα: 546, 603, 655, 695, 764, 808, 845, 880, 915, 972, 1034, 1076, 1130, 1185, 1259, 1329, 1350, 1375, 1418, 1440, 1450, 1474, 1548, 1612, 1677, 1721, 1934, 1968, 1978, 2018, 2048, 2132, 2157, 2325, 2861, 2944, 3033, 3251, 3300, 3360 cm^{-1} . Τέλος, από το φάσμα που προέκυψε από το δείγμα αναφοράς της χιτοζάνης οι κορυφές που διακρίθηκαν ήταν στα 556, 661, 702, 893, 945, 990, 1024, 1059, 1151, 1198, 1262, 1314, 1373, 1418, 1559, 1591, 1648, 1983, 2052, 2156, 2290, 2325, 2661, 2869, 2918, 3285 και 3359 cm^{-1} .

Οι κορυφές που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα αναφοράς δεν είναι απαραίτητο να ανιχνευτούν όλες στα φάσματα των μελετώμενων δειγμάτων. Τόσο η προκατεργασία των βιομορίων της χιτοζάνης και του κολλαγόνου με το οξύ (όπως λ.χ 1634 cm^{-1} κορυφή η οποία μπορεί οφείλεται στην δημιουργία ζελατίνης από υδρόλυση του κολλαγόνου [78], όσο και η διάλυση της αργινίνης επηρεάζουν τους δεσμούς εντός των μορίων ενώ σε μερικές περιπτώσεις οι κορυφές που προκύπτουν από την δόνηση δεσμών διαφορετικών μορίων μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται με αποτέλεσμα στο

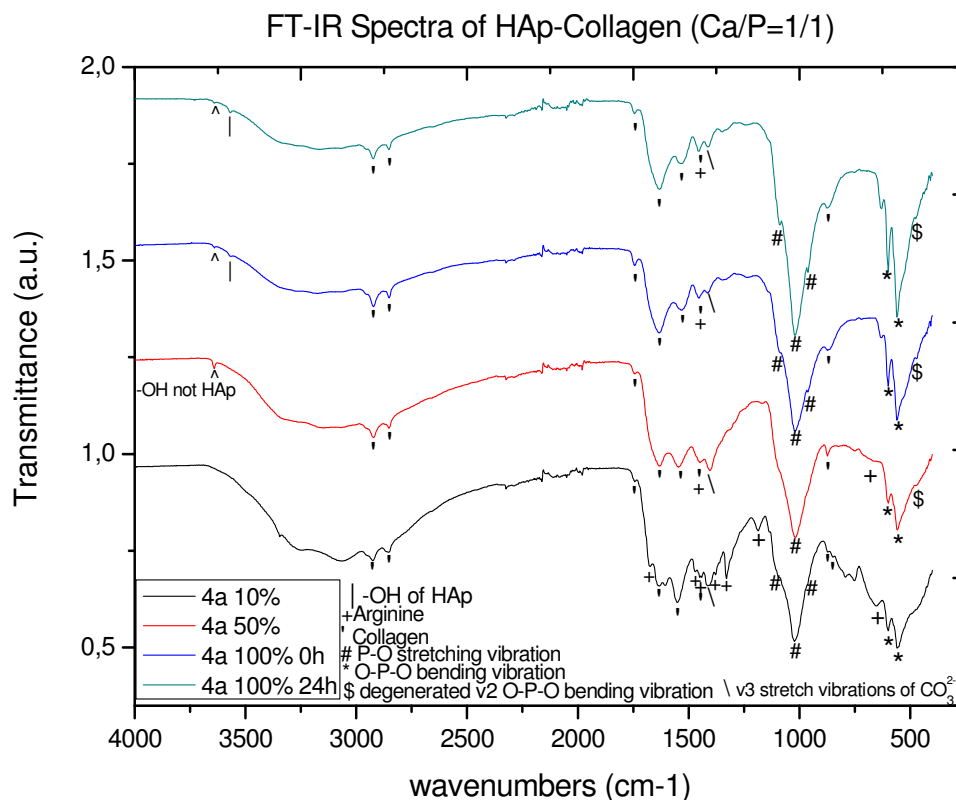
τελικό προϊόν να μην γίνονται όλες οι κορυφές ορατές (λ.χ. η κορυφή της εκτατικής δόνησης του O-P-O στα 1022 μπορεί να επηρεάζεται από την κορυφή της χιτοζάνης στα 1024). Τέλος η ύπαρξη κοινών δεσμών μεταξύ των βιομορίων μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την ανίχνευση κορυφής που δεν είναι ξεκάθαρο σε ποιο μόριο οφείλεται (λ.χ. ο δεσμός C=O που δίνει δόνηση στα 1450)

Η μεγαλύτερη ευκρίνεια των κορυφών των βιομορίων ανάμεσα στα δύο προϊόντα που προκύπτουν από διαφορετικές φάσεις της αντίδρασης μπορεί να αιτιολογηθεί καθώς η σχετική ποσότητα των βιομορίων στην πρώιμη φάση της αντίδρασης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ποσότητα των αλάτων που έχουν παραχθεί και έτσι οι κορυφές απορρόφησης των οργανικών της σκόνης είναι πιο ευδιάκριτες.

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1/1

Τα φάσματα υπερύθρου που ελήφθησαν από τα δείγματα σκόνης υδροξυαπατίτη που παρήχθησαν παρουσία κολλαγόνου και υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικών ιόντων (λόγος Ca/P=1:1) τοποθετήθηκαν σε σύγκριση για κάθε ενδιάμεση κατάσταση ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση των προϊόντων που προκύπτουν κατά την εξέλιξη της αντίδρασης και να παρατηρηθούν οι μεταβολές πριν και μετά την γήρανση.

Γενικά, οι κορυφές των οργανικών (αργινίνης και κολλαγόνου) είναι αυξημένες στις σκόνες που προκύπτουν από τα αρχικά στάδια της αντίδρασης λόγω της μεγαλύτερης σχετικής ποσότητας των οργανικών μορίων ως προς τα φωσφορικά άλατα στο τελικό ξηραμένο προϊόν. Ακόμα εκτός από τα οργανικά μόρια ανιχνεύονται και κορυφές απορρόφησης που οφείλονται σε συμμετρικές και μη συμμετρικές εκτατικές δονήσεις του δεσμού P-O της φωσφορικής ρίζας στα 958 cm^{-1} [79], 1022 cm^{-1} και 1088 cm^{-1} [21] και δονήσεις κάμψεως του O-P-O στα 560 cm^{-1} και 597 cm^{-1} . Ο συνδυασμός των κορυφών αυτών είναι ενδεικτικός της ύπαρξης υδροξυαπατίτη. Οι κορυφές αυτές είναι παρούσες σε όλα τα φάσματα των δειγμάτων της πειραματικής σειράς Col 1:1. Εξαιρέση αποτελεί το δείγμα που προέκυψε μετά από αντίδραση του 50% των αντιδραστηρίων. Από το φάσμα αυτού απουσιάζουν οι κορυφές στα 958 και 1088 cm^{-1} . Ακόμα για τα δείγματα που συντέθηκαν με προσθήκη αντιδραστηρίων 50% και πάνω παρατηρήθηκε και μια μικρή κορυφή μεταξύ 469 cm^{-1} και 471 cm^{-1} η οποία αποδόθηκε σε ν2 O-P-O δόνηση κάμψεως [79]. Στα δείγματα του τελικού σταδίου προ και μετά γήρανσης ανιχνεύτηκε ακόμα και μια κορυφή στα 3572 cm^{-1} λόγω εκτατικής δόνησης του -OH του υδροξυαπατίτη ενώ στην περιοχή των $1408-1412\text{ cm}^{-1}$ οι κορυφές αποδόθηκαν σε ν3 εκτατική δόνηση του CO_3^{-2} ένδειξη σχηματισμού ανθρακικών ενώσεων κατά την αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη.



Εικόνα 53. Φάσματα FTIR δειγμάτων που παρήχθησαν παρουσία καολλαγόνου και υπό συνθήκες περίσσειας

Αναλυτικά οι κορυφές απορρόφησης που αποδόθηκαν σε δονήσεις των βιομορίων του δείγματος 10% προσθήκης αντιδραστηρίων, είναι για την αργινίνη οι κορυφές στα 655 cm^{-1} , 879 cm^{-1} , 1184 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} , 1471 cm^{-1} , 1551 cm^{-1} και 1674 cm^{-1} , για το κολλαγόνο στα 847 cm^{-1} , 879 cm^{-1} , 1377 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} , 1474 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} και 2926 cm^{-1} , για τις ενώσεις των φωσφορικών αλάτων στα 560 cm^{-1} και 597 cm^{-1} από την δόνηση κάμψης του O-P-O και 958 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} , 1088 cm^{-1} από την συμμετρική εκτατική δόνηση του P-O. Στην περιοχή των 1410 cm^{-1} η κορυφή αποδόθηκε σε ν_3 εκτατική δόνηση του CO_3^{2-} , ένδειξη ότι σχηματίζονται ανθρακικά προϊόντα κατά το αρχικό στάδιο της αντίδρασης.

Στο φάσμα της σκόνης που προέκυψε μετά από αντίδραση του 50% των αντιδρώντων οι κορυφές που αντιστοιχούν είναι για την αργινίνη η κορυφή στα 660 cm^{-1} , για το κολλαγόνο είναι στα 873 , 1165 , 1741 , 1631 , 2852 , 2923 cm^{-1} ενώ ταυτοποιούνται ακόμα η κορυφή στα 1022 cm^{-1} που οφείλεται στην συμμετρική εκτατική δόνηση του P-O και αυτή των 599 cm^{-1} λόγω δόνησης κάμψης του P-O και εμφανίζεται και μια νέα κορυφή στα 469 η οποία αποδόθηκε σε ν_2 O-P-O δόνηση κάμψης. Ακόμα παρουσιάστηκε και μια κορυφή στα 3641 οφειλόμενη σε -OH τα οποία όμως δεν μπορούν να είναι υδροξύλια της ένωσης του υδροξυαπατίτη [79] Στα 1403 cm^{-1} η κορυφή αποδόθηκε σε ν_3 εκτατική δόνηση του CO_3^{2-} , ένδειξη ύπαρξης ανθρακικών αλάτων.

Από το φάσμα του δείγματος που παρασκευάστηκε από το τελικό αιώρημα πριν την γήρανση, οι κορυφές που αποδόθηκαν στην αργινίνη είναι στα 873, 1453 και 1551 cm^{-1} , για το κολλαγόνο 873, 1347, 1453, 1551, 1634, 1741, 2852 και 2926 cm^{-1} . Οι ενώσεις των φωσφορικών αλάτων έδωσαν κορυφές στα 562 cm^{-1} και 599 cm^{-1} από την δόνηση κάμψης του O-P-O και 963, 1022 και 1088 cm^{-1} από την συμμετρική εκτατική δόνηση του P-O. Ακόμα εμφανίζεται και μια νέα κορυφή στα 469 η οποία οφείλεται σε ν_2 O-P-O δόνηση κάμψης, [79] ενώ ανιχνεύεται και μία κορυφή στα 3570 λόγω εκτατική δόνησης των OH- του υδροξυαπατίτη. Στα 1408 cm^{-1} η κορυφή αποδόθηκε σε ν_3 εκτατική δόνηση του CO_3^{-2} , ένδειξη ύπαρξης ανθρακικών αλάτων. Γενικά οι κορυφές που οφείλονται σε δονήσεις των φωσφορικών αλάτων είναι πλέον ευκρινέστερες και αυξημένες ως προς το ύψος τους ενώ η ύπαρξη υδροξυαπατίτη επιβεβαιώνεται και από την ύπαρξη των υδροξυλίων της ένωσης.

Από το φάσμα της σκόνης που προέκυψε από το τελικό αιώρημα μετά από 24 ώρες γήρανσης διακρίθηκαν κορυφές τις αργινίνης στα 873, 1328, 1453 και 1532 cm^{-1} , του κολλαγόνου 873, 1347, 1453, 1532, 1633, 1743, 2849 και 2923 cm^{-1} . Ακόμα ανιχνεύτηκαν οι κορυφές στα 560 και 599 cm^{-1} που οφείλονται σε καμπτική δόνηση του δεσμού O-P-O και 961, 1022 και 1088 οι οποίες οφείλονται σε εκτατική δόνηση του δεσμού P-O. Ακόμα ταυτοποιήθηκαν μία κορυφή στα 3571 cm^{-1} οφειλόμενη στην εκτατική δόνηση των OH- ομάδων του υδροξυαπατίτη [80] και στα 3641 μία κορυφή από δόνηση-OH που δεν περιλαμβάνεται στον υδροξυαπατίτη. Στα 1411 cm^{-1} η κορυφή αποδόθηκε σε ν_3 εκτατική δόνηση του CO_3^{-2} , ένδειξη ύπαρξης ανθρακικών αλάτων στο τελικό προϊόν της αντίδρασης.

Γενικά, η επιβεβαίωση ύπαρξης τόσο των δονήσεων της φωσφορικής ρίζας όσο και των δονήσεων του υδροξυλίου του υδροξυαπατίτη στα δυο δείγματα προ και μετά γήρανσης είναι ένδειξη του καλύτερα κρυσταλλωμένου προϊόντος που προκύπτει στην περίπτωση αυτή σε σχέση με τις άλλες πειραματικές σειρές, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και μέσω TEM. Ακόμα το προϊόν μετά την γήρανση έδωσε κορυφές απορρόφησης πιο μεγάλης έντασης ένδειξη της βελτίωσης της κρυστάλλωσης του προϊόντος μετά την γήρανση. Τέλος η παρουσία δονήσεων από ανθρακική ρίζα ανιχνεύεται από την αρχή της αντίδρασης (από 10% προσθήκης).

Το σύνολο των κορυφών που ανιχνεύτηκαν μέσω των φασμάτων για την πειραματική σειρά Col 1:1 δίνεται συγκεντρωτικά στον πίνακα 15 που ακολουθεί.

Πίνακας 17. Συγκενρωτικός πίνακας ανιχνεζόμενων κορυφών FT-IR για την πειραματική σειρά Ca/P 1:1 παρουσία κολλαγόνου

Κορυφές FTIR πειραματικής σειράς 1:1 Col					
COL-1:1 10%	COL-1:1 50%	COL-1:1 -100% 0h	COL-1:1 -100% 24h	Είδος Δόνησης	cm ⁻¹ βάσει βιβλίου
		405	405		
		426	426		
	469	469	471	v2 O-P-O bending [79]	462-474
560	556	562	560	bending modes of O-P-O of HAp [21]	560
597	598	599	599	bending modes of O-P-O of HAp [21]	599
		628	628		
655	660				Arg Ref Sample-655
751	750	750	750		
793					
847					Col Ref Sample 851
879	873	873	873		Col Ref Sample 876 Arg Ref Sample 880
958		963	961	P-O symmetric stretching vibration [79]	962
1022	1022	1022	1022	P-O stretching vibrations [21]	1022
1088		1088	1088	P-O stretching vibrations [21]	1088
		1145	1147		
	1165				Col Ref Sample 1160
1184					Arg Ref Sample 1185
1328			1328		Arg Ref Sample 1329
		1347	1347		Col Ref Sample 1335
1377					Col Ref Sample 1378 Arg Ref Sample 1375
1410	1403	1408	1411	CO ₃ ⁻² v3 stretch vibration [79]	1412
1448	1453	1453	1453,5	C=O stretching vibration	1460 Arg Ref Sample 1450 Col Ref Sample 1450
1471					Arg Ref Sample 1474
1551	1549	1551	1532		Col Ref Sample 1544 Arg Ref Sample 1548
1605					
1634	1631	1634	1633		Col Ref Sample 1629
1674					Arg Ref Sample 1677
1740	1741	1741	1743		Col Ref Sample 1742
2852	2852	2852	2849		Col Ref Sample 2853
2926	2923	2926	2923		Col Ref Sample 2920
3346					
		3570	3571	-OH stretching vibrations of HAp [80]	3572
	3641	3641	3641	-OH vibration [79]	

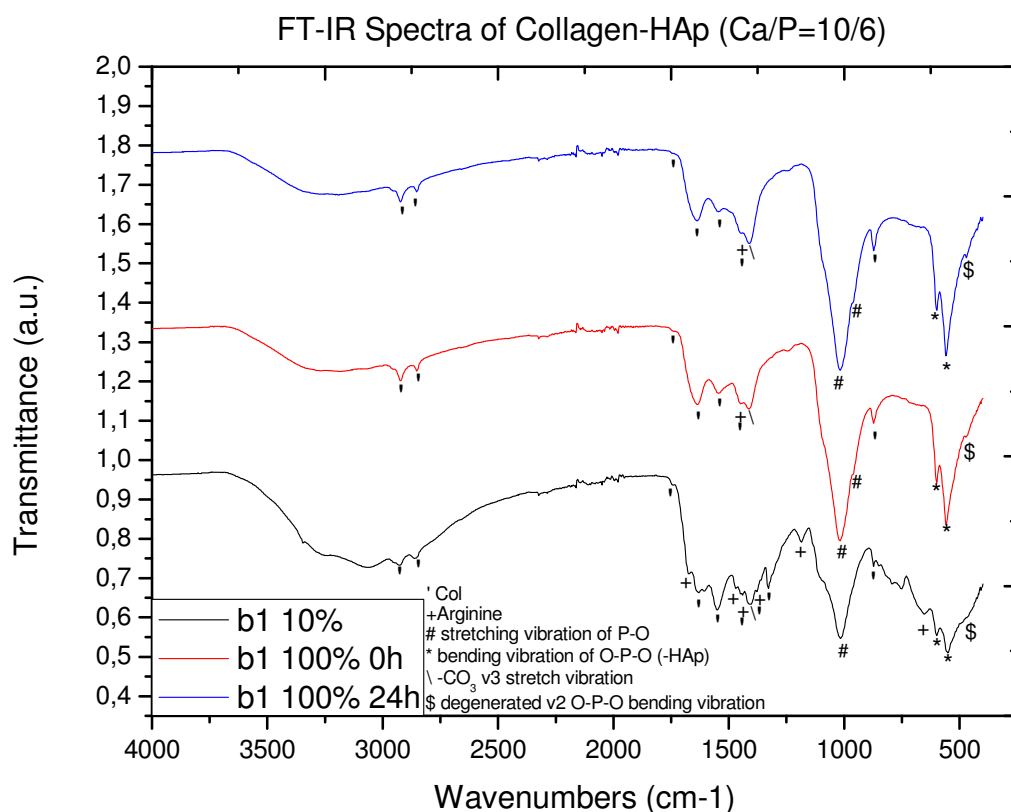
Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10/6

Τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων σκόνης που παρήχθησαν παρουσία κολλαγόνου και υπό συνθήκες στοιχειομετρικής αναλογίας ιόντων ασβεστίου/φωσφορικών ιόντων ίση με αυτή του υδροξυαπατίτη (λόγος Ca/P =10:6) παρατέθηκαν σε σύγκριση ώστε να παρατηρηθούν οι μεταβολές των προϊόντων που προκύπτουν κατά την εξέλιξη της αντίδρασης πριν και μετά την γήρανση.

Γενικά παρατηρούνται αυξημένες οι κορυφές των οργανικών (αργινίνης και κολλαγόνου) στο φάσμα της σκόνης του αρχικού σταδίου της αντίδρασης στο οποίο έχει αντιδράσει μόνο το 10% της ποσότητας των αντιδρώντων. Ο λόγος που παρατηρείται αυτό είναι η ύπαρξη μεγαλύτερης ποσότητας οργανικών μορίων ως προς τα φωσφορικά άλατα στο τελικό ξηραμένο προϊόν. Στο δείγμα του αρχικού σταδίου της αντίδρασης εκτός από τα οργανικά μόρια ανιχνεύονται και κορυφές απορρόφησης που οφείλονται σε συμμετρικές εκτατικές δονήσεις του δεσμού P-O της φωσφορικής ρίζας στα 1020 cm^{-1} [21] και δονήσεις κάμψεως του O-P-O στα 554 και 599 cm^{-1} . Οι δονήσεις αυτές αποτελούν ένδειξη της ύπαρξης υδροξυαπατίτη. Ακόμα η εμφανιζόμενη στα 1411 cm^{-1} κορυφή πιθανολογείται ότι οφείλεται σε ν3 εκτατική δόνηση του CO_3^{-2} που συνεπάγεται παρουσία ανθρακικών ενώσεων στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης. Οι κορυφές που ανιχνεύτηκαν και αποδίδονται στην αργινίνη είναι οι $652, 1184, 1448, 1474, 1548, 1674\text{ cm}^{-1}$ και στο κολλαγόνο είναι $851, 878, 1331, 1373, 1448, 1548, 1633, 1743, 2852$ και 2923 cm^{-1} .

Από το φάσμα του δείγματος που προέκυψε μετά από αντίδραση συνολικών ποσοτήτων των αντιδρώντων πριν την γήρανση ανιχνεύτηκαν δονήσεις κάμψεως του O-P-O στα 559 και 600 cm^{-1} και μια ν2 καμπτική δόνηση του δεσμού αυτού στα 471 cm^{-1} , εκτατικές δονήσεις του δεσμού P-O της φωσφορικής ρίζας στα 961 και τα 1022 . Από τα οργανικά συστατικά η αργινίνη έδωσε κορυφές στα $871, 1453, 1546\text{ cm}^{-1}$ και το κολλαγόνο στα $871, 1453, 1546, 1644, 1743, 2849$ και 2923 cm^{-1} ενώ ανιχνεύτηκε και μια κορυφή στα 1415 cm^{-1} της ν3 εκτατικής δόνησης του CO_3^{-2} που συνεπάγεται παρουσία ανθρακικών ενώσεων.

Στο φάσμα του τελικού δείγματος βιοάλατος μετά την γήρανση, σημειώθηκε μια κορυφή στα 471 cm^{-1} η οποία ενδεχομένως οφείλεται σε ν2 O-P-O δόνηση κάμψεως. [79] ενώ επιβεβαιώνεται η ύπαρξη δονήσεων ενδεικτικών του υδροξυαπατίτη (δονήσεις κάμψεως του O-P-O στα 559 και 598 cm^{-1}). Ακόμα ανιχνεύτηκε στα 956 και τα 1020 cm^{-1} κορυφή λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού P-O και στα 1411 cm^{-1} η ν3 εκτατική δόνηση του CO_3^{-2} που συνεπάγεται παρουσία ανθρακικών ενώσεων. Από τα βιομόρια, η αργινίνη έδωσε ανιχνεύσιμες κορυφές στα 1447 και 1549 cm^{-1} και το κολλαγόνο έδωσε κορυφές στα $871, 1447, 1549, 1637, 1742, 2846$ και 2919 cm^{-1} .



Εικόνα 54. Φάσματα FTIR δειγμάτων που παρήγαξαν παρουσία κολλαγόνου και απουσία περισσειας

Συνολικά παρατηρήθηκε ότι οι καμπτικές δονήσεις του O-P-O που αποτελούν ένδειξη της ύπαρξης υδροξυαπατίτη παρατηρούνται από το αρχικό στάδιο της αντίδρασης. Η διαφοροποίηση μεταξύ του αρχικού και των τελικών δειγμάτων είναι η αύξηση του ύψους των κορυφών 559 και 1022 cm⁻¹ των φωσφορικών που οφείλεται στην σταδιακή μεταβολή της κρυστάλλωσης μέχρι το τελικό προϊόν και η μείωση των ανιχνεύσιμων κορυφών οργανικών μορίων από την αργινίνη και το κολλαγόνο. Γενικά δεν παρατηρήθηκε κάποια ουσιαστική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων του παραγόμενου προϊόντος πριν και μετά την γήρανση ενώ εντοπίστηκαν ανθρακικές ενώσεις καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης.

Το σύνολο των κορυφών που ανιχνεύτηκαν μέσω των φασμάτων για την πειραματική σειρά Ca/P 10:6 παρουσία κολλαγόνου δίνεται συγκεντρωτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικός πίνακας ανιχνευόμενων κορυφών FT-IR για την πειραματική σειρά Ca/P 10:6 παρουσία κολλαγόνου

Κορυφές FTIR πειραματικής σειράς 10:6 Col				
COL-10:6 - 10%	COL-10:6 - 100% 0h	COL-10:6 -100% 24h	Είδος Δόνησης	cm ⁻¹ βάσει βιβλ/φίας
463	471	471	v2 O-P-O bending vibration [80]	462-474
554	559	559	O-P-O bending vibration of HAp [21]	560
599	600	598	O-P-O bending vibration of HAp [21]	599
652				Arg Ref Sample 655
751				
793				
851				Col Ref Sample 851
878	871	871		Col Ref Sample 876 Arg Ref Sample 880
	961	956	P-O symmetric stretching vibration [81]	962
1020	1022	1020	P-O stretching vibration [21]	1022
1184				Arg Ref Sample 1185
	1246	1246		
1331				Col Ref Sample 1335
1373				Col Ref Sample 1378 Arg Ref Sample 1375
1411	1415	1411	CO ₃ ²⁻ v3 stretch vibration [79]	1412
1448	1453	1447	C=O stretching vibration	1460 Arg Ref Sample 1450 Col Ref Sample 1450
1474				Arg Ref Sample 1474
1548	1546	1549		Col Ref Sample 1544 Arg Ref Sample 1548
1604				
1633	1644	1637		Col Ref Sample 1628
1674				Arg Ref Sample 1677
1743	1743	1742		Col Ref Sample 1742
2852	2849	2846		Col Ref Sample 2853
2923	2923	2919		Col Ref Sample 2920
3347				

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνης παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1/1

Τα φάσματα υπερίθρου που ελήφθησαν από τα δείγματα σκόνης βιοαλάτων που παρήχθησαν παρουσία χιτοζάνης και υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικών ιόντων (λόγος Ca/P =1:1) τοποθετήθηκαν σε σύγκριση για κάθε ενδιάμεση κατάσταση ώστε

να είναι δυνατή η παρατήρηση των προϊόντων που προκύπτουν κατά την εξέλιξη της αντίδρασης και οι μεταβολές που μπορεί να παρατηρηθούν πριν και μετά την γήρανση.

Για το δείγμα που παρήχθη από την αντίδραση του 10% των αντιδρώντων, το φάσμα υπερύθρου που προέκυψε έδωσε κορυφές στα 657, 1185, 1328, 1376, 1471, 1548, 1678 cm^{-1} οι οποίες αποδόθηκαν στην αργινίνη και στα 1153, 2862 και 3358 cm^{-1} οι οποίες αποδόθηκαν στην χιτοζάνη. Ακόμα ανιχνεύτηκαν κορυφές στα 562 και 599 cm^{-1} που αποδόθηκαν σε καμπτική δόνηση του δεσμού O-P-O και στα 1022 cm^{-1} μια κορυφή οφειλόμενη σε εκτατική δόνηση του δεσμού P-O. Στα 469 cm^{-1} ανιχνεύθηκε και μια κορυφή που αποδίδεται σε ν2 δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O.

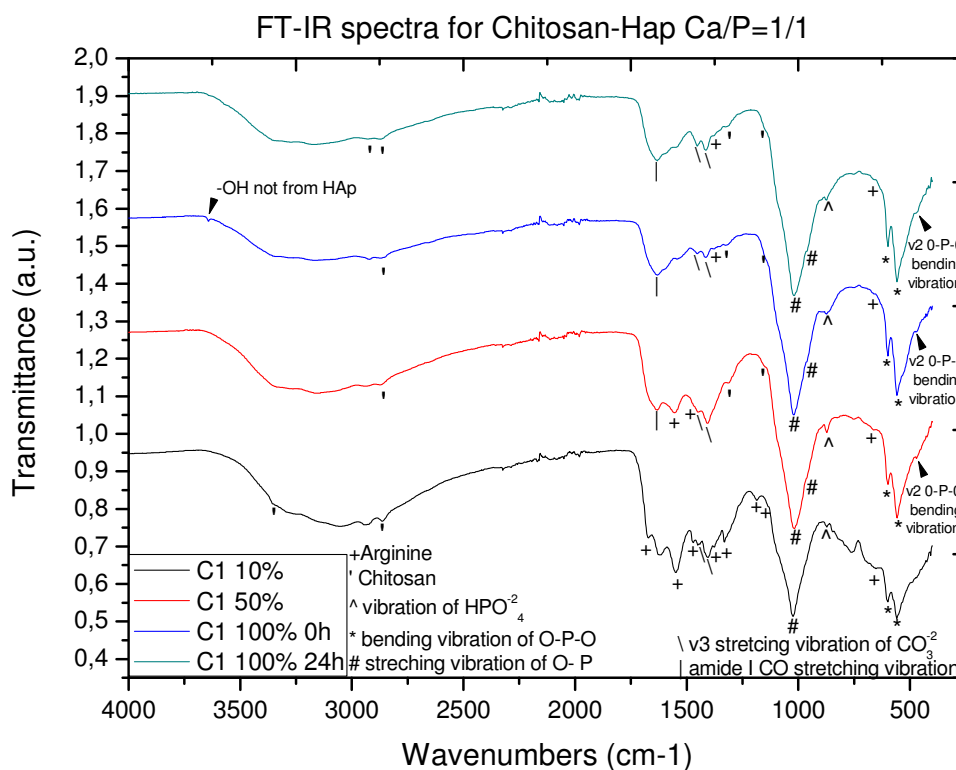
Στο δείγμα αυτό εκτός από τις κορυφές αυτές ανιχνεύτηκε και μια ακόμη κορυφή στα 873 cm^{-1} η οποία αποδίδεται σε ν2 δόνηση του HPO_4^{2-} . Ένδειξη ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτελούν οι κορυφές που εμφανίζονται μεταξύ 1400 και 1500 cm^{-1} και πιο συγκεκριμένα στα 1402 και τα 1445 cm^{-1} καθώς βάση της βιβλιογραφίας στην περιοχή αυτή παρουσιάζονται δονήσεις ν2 και ν3 του CO_3^{2-} (Πχ κορυφή στα 1411 που αντιστοιχίστηκε σε εκτατική δόνηση ν3 του CO_3^{2-}) [79].

Για το δείγμα που παρήχθη με το 50% των αντιδρώντων, το φάσμα που προέκυψε έδωσε κορυφές στα 661, 1470 και 1549 cm^{-1} που αποδόθηκαν στην αργινίνη και στα 1152, 1317, 2862 στη χιτοζάνη. Επίσης ανιχνεύτηκαν κορυφές στα 562 και 599 cm^{-1} που αποδόθηκαν σε καμπτική δόνηση του δεσμού O-P-O και στα 965 cm^{-1} και τα 1022 cm^{-1} δύο κορυφές οφειλόμενες στην εκτατική δόνηση του δεσμού P-O. Ακόμα δύο από τις κορυφές που παραπέμπουν στην ύπαρξη ανθρακικών ενώσεων φάνηκαν να διατηρήθηκαν με την εξέλιξη της αντίδρασης. Αυτές είναι, η κορυφή στα 1411 cm^{-1} που αποδόθηκε σε εκτατική δόνηση ν3 του CO_3^{2-} και η κορυφή στα 1445 cm^{-1} η οποία αποδόθηκε σε ν2 δόνηση του CO_3^{2-} . Ειδικά η τελευταία αυτή κορυφή είναι ευκρινέστερη και στενότερη για το δείγμα που προέκυψε από αντίδραση του 50% των αντιδρώντων. Ανιχνεύτηκε και μια ακόμη κορυφή στα 873 cm^{-1} η οποία αποδίδεται σε ν2 δόνηση του HPO_4^{2-} . Τέλος ανιχνεύθηκε και η κορυφή των 466 cm^{-1} που αποδίδεται σε ν2 δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O.

Για το δείγμα που παρήχθη με το 100% των αντιδρώντων, το φάσμα που προέκυψε έδωσε κορυφές στα 663, 1376, 1548 cm^{-1} που αποδόθηκαν στην αργινίνη και στα 1153, 1317 και 2855 cm^{-1} στη χιτοζάνη. Ακόμα ανιχνεύτηκαν κορυφές στα 557 και 599 cm^{-1} που αποδόθηκαν σε καμπτική δόνηση του δεσμού O-P-O και στα 1022 cm^{-1} μια κορυφή λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού P-O και μια κορυφή των 467 που αποδίδεται σε ν2 δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O. Ενδείξεις ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτέλεσαν η κορυφή στα 1411 και 1443 cm^{-1} που αντιστοιχούν σε δόνηση του CO_3^{2-} και η κορυφή στα 875 cm^{-1} η οποία αποδίδεται σε ν2 δόνηση του HPO_4^{2-} .

Από το φάσμα υπερύθρου που προέκυψε από το δείγμα του βιοάλατος μετά την γήρανση, απομονώθηκαν οι κορυφές 663, 1376 και 1548 cm^{-1} για την αργινίνη και 1153, 1317, 2873 cm^{-1} για την χιτοζάνη. Ταυτοποιήθηκαν ακόμα οι κορυφές 560, 597 cm^{-1} λόγω καμπτικής δόνησης του δεσμού O-P-O και οι 961 και 1022 cm^{-1} λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού P-O και μια κορυφή των 471 που αποδίδεται σε ν2 δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O. Ενδείξεις ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτέλεσαν και σε αυτήν την περίπτωση η κορυφή στα 1410 και 1445 cm^{-1} που

αντιστοιχούν σε δονήσεις του CO_3^{2-} . Ανιχνεύτηκε και μια ακόμη κορυφή στα 875 cm^{-1} η οποία αποδίδεται σε ν_2 δόνηση του HPO_4^{2-} .



Εικόνα 55. Φάσματα FTIR δειγμάτων που παρήχθησαν με περίσσεια φωσφορικού οξέος παρουσία χιτοζάνης

Γενικά από την παρατήρηση των φασμάτων αυτής της πειραματικής σειράς, διακρίνονται αυξημένες ενδείξεις ύπαρξης ανθρακικών αλάτων σε σχέση με τα δείγματα του κολλαγόνου οι οποίες περιορίζονται με την εξέλιξη της αντίδρασης 3 κορυφές στο 10%, 2 στο 50% κ.ο.κ. διατηρούνται όμως μέχρι και μετά την γήρανση. Μια επιπλέον κορυφή μπορεί να οφείλεται σε δονήσεις της ρίζας HPO_4^{2-} εμφανίζεται στα 875 cm^{-1} . Η ρίζα αυτή είναι χαρακτηριστική κατά τον σχηματισμό μη στοιχειομετρικού υδροξυαπατίτη [81].

Το σύνολο των κορυφών που ανιχνεύτηκαν μέσω των φασμάτων για την πειραματική σειρά Ca/P 1:1 παρουσία χιτοζάνης δίνεται συγκεντρωτικά στον πίνακα 21 που ακολουθεί.

Πίνακας 19. Συγκεντρωτικός πίνακας ανιχνευόμενων κορυφών FT-IR για την πειραματική σειρά Ca/P 1:1 παρουσία χιτοζάνης

Κορυφές FTIR πειραματικής σειράς Ca/P 1:1 παρουσία χιτοζάνης					
Chitosan 1:1 10%	Chitosan 1:1 -50%	Chitosan 1:1-100%0h	Chitosan-1:1-100%24h	Είδος Δόνησης	cm ⁻¹ βάσει βιβλ/φίας
469	466.3	467	471	v2 O-P-O bending vibration [79]	462-474
562	562.5	557	560	bending modes of O-P-O of HAp [21]	560
599,3	599	599	597	bending modes of O-P-O bond [21]	599
668-657	661	663	663		Arg Ref Sample 655
687					
758	756	750	750		
873	873	875	875	v2 HPO ₄ ⁻² vibration [79]	875
	965	965	961	P-O symmetric stretching vibration [79]	962
1022	1022	1022	1022	stretching modes of P-O [21]	1022
1153	1152	1153	1153		Chit Ref Sample 1151
1185					Arg Ref Sample 1185
	1317	1317	1317		Chit Ref Sample 1314
1328					Arg Ref Sample 1329
1376		1376	1376		Arg Ref Sample 1375
1402-1407	1407-1411	1411	1410	CO ₃ ⁻² v3 stretch vibration [82]	1412
1445.5	1445	1443	1445	v2&v3 vibrations of CO ₃ ⁻² [83]	1400-1500
1471	1470				Arg Ref Sample 1474
1549-1556	1549	1548	1548		Arg Ref Sample 1548
1618					
	1634	1629	1633		
1678					Arg Ref Sample 1677
2862	2862	2855	2873		Chit Ref Sample 2869
2929	2929	2929	2926		
3248					
3358					Chit Ref Sample 3359
		3644		-OH vibration (not HAP) [79]	3642

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνης παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10/6

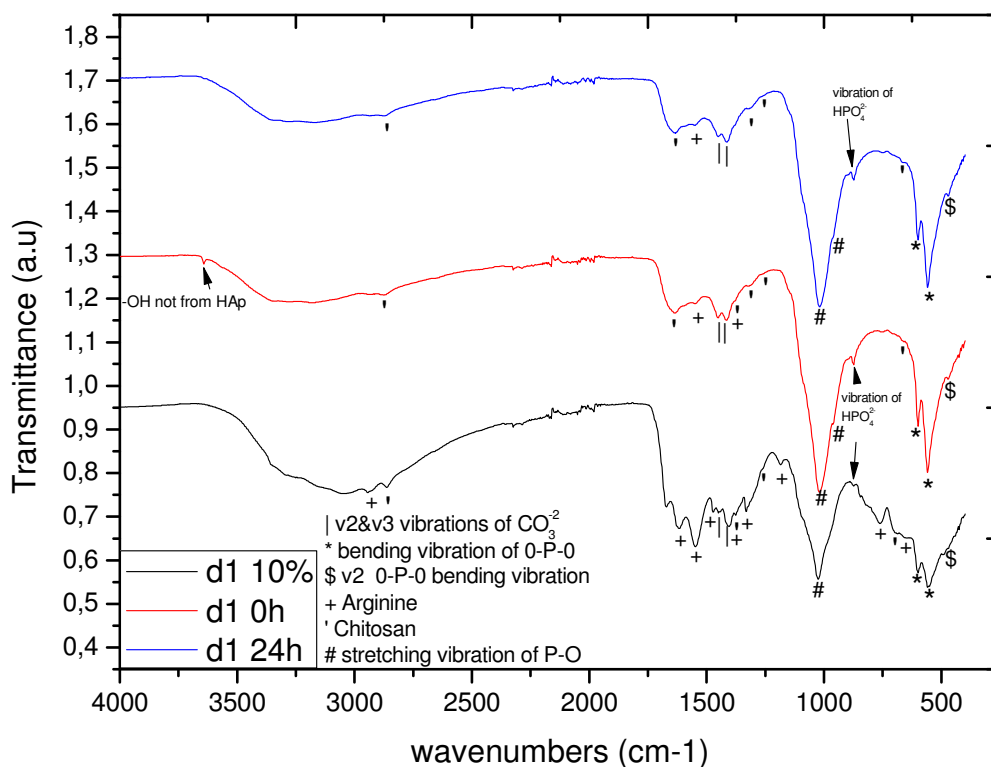
Τα φάσματα υπέρυθρου που ελήφθησαν από τα δείγματα σκόνης βιοαλάτων που παρήχθησαν παρουσία χιτοζάνης (λόγος Ca/P =10/6) τοποθετηθήκαν σε σύγκριση ώστε να παρατηρηθούν οι μεταβολές των προϊόντων που προκύπτουν κατά την εξέλιξη της αντίδρασης πριν και μετά την γήρανση.

Για το δείγμα που παρήχθη με το 10% των αντιδρώντων, το φάσμα υπερύθρου που προέκυψε έδωσε κορυφές στα 651, 761, 1186, 1331, 1373, 1474, 1548, 1616 και 2938 cm^{-1} οι οποίες αποδόθηκαν στην αργινίνη και στα 660, 703, 1256, 1373 και 2863 cm^{-1} οι οποίες αποδόθηκαν στην χιτοζάνη. Ακόμα ανιχνεύτηκαν κορυφές στα 557 cm^{-1} και 595 cm^{-1} που αποδόθηκαν σε καμπτική δόνηση του δεσμού O-P-O, στα 1024 μια κορυφή οφειλόμενη σε εκτατική δόνηση του δεσμού P-O και μια στα 467 cm^{-1} που αποδίδεται σε ν2 δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O. Μια ένδειξη ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτελούν οι κορυφές που εμφανίζονται μεταξύ 1400 cm^{-1} και 1500 cm^{-1} και πιο συγκεκριμένα στα 1410 και τα 1447 cm^{-1} καθώς βάση της βιβλιογραφίας στην περιοχή αυτή παρουσιάζονται δονήσεις ν2 και ν3 του CO_3^{2-} [79]. Ανιχνεύτηκε ακόμα μια κορυφή που μπορεί να οφείλεται σε δονήσεις της ρίζας HPO_4^{2-} στα 875 cm^{-1} .

Για το δείγμα που παρήχθη με το 100% των αντιδρώντων, το φάσμα που προέκυψε έδωσε κορυφές στα 1375, 1548 cm^{-1} που αποδόθηκαν στην αργινίνη και στα 665, 708, 1258, 1315, 1375, 1634 και στα 2873 cm^{-1} στη χιτοζάνη. Ακόμα ανιχνεύτηκαν κορυφές στα 557 και 595 που αποδόθηκαν σε καμπτική δόνηση του δεσμού O-P-O και στα 961 και 1024 cm^{-1} δύο κορυφές λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού P-O και μια κορυφή των 466 cm^{-1} που αποδίδεται σε ν2 δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O. Ταυτοποιήθηκε ακόμα μια κορυφή στα 3644 cm^{-1} σαν δόνηση -OH μη δεσμευμένου σε υδροξυαπατίτη και μια κορυφή στα 875 cm^{-1} λόγω δονήσεων της ρίζας HPO_4^{2-} . [79][81] Ενδείξεις ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτέλεσαν η κορυφή στα 1413 και 1454 cm^{-1} που αντιστοιχούν σε δόνηση του CO_3^{2-} .

Από το φάσμα υπερύθρου που προέκυψε από το δείγμα του βιοάλατος μετά την γήρανση, απομονώθηκαν οι κορυφές 1550 cm^{-1} για την αργινίνη και 665, 709, 1024 1258, 1315, 1635 και 2867 cm^{-1} για την χιτοζάνη. Ταυτοποιήθηκαν ακόμα οι κορυφές στα 557 και 595 cm^{-1} λόγω καμπτικής δόνησης του δεσμού O-P-O και οι 961 και 1024 cm^{-1} λόγω εκτατικής δόνησης του δεσμού P-O και μια κορυφή των 471 cm^{-1} που αποδίδεται σε ν2 δόνηση κάμψης του δεσμού O-P-O. Μια επιπλέον κορυφή μπορεί να οφείλεται σε δονήσεις της ρίζας HPO_4^{2-} εμφανίζεται στα 875 cm^{-1} . Η ρίζα αυτή είναι χαρακτηριστική κατά τον σχηματισμό μη στοιχειομετρικού υδροξυαπατίτη [81] Ενδείξεις ύπαρξης ανθρακικών ενώσεων αποτέλεσαν οι κορυφές στα 1410 και 1453 cm^{-1} που αποδόθηκαν σε δονήσεις του CO_3^{2-} .

FT-IR Spectra of Chitosan-HAp Ca/P= 10/6



Εικόνα 56. Φάσματα FTIR δειγμάτων που παρήχθησαν παρουσία χιτοζάνης και απουσία περισσειας

Από αυτήν την πειραματική σειρά φάνηκε πως η αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη περιλαμβάνει σχηματισμό ανθρακικών ενώσεων οι οποίες διατηρούνται καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης έως το τελικό προϊόν. Ταυτόχρονα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη δεσμού O-P-O του υδροξυαπατίτη από το αρχικό μέχρι το τελικό στάδιο της αντίδρασης. Ακόμα στα 875 cm⁻¹ ανιχνεύθηκε κορυφή που αποδόθηκε σε δονήσεις της ρίζας HPO₄²⁻. Η ρίζα αυτή είναι χαρακτηριστική κατά τον σχηματισμό μη στοιχειομετρικού υδροξυαπατίτη [81].

Το σύνολο των κορυφών που ανιχνεύτηκαν μέσω των φασμάτων για την πειραματική σειρά Ca/P 10/6 παρουσία χιτοζάνης δίνεται συγκεντρωτικά στον πίνακα 20 που ακολουθεί.

Πίνακας 20. Συγκεντρωτικός πίνακας ανιχνευόμενων κορυφών FT-IR για την πειραματική σειρά Ca/P 10:6 παρουσία χιτοζάνης

Κορυφές FTIR πειραματικής σειράς Ca/P 10:6 παρουσία χιτοζάνης				
CHIT-10:6-10%	CHIT-10:6-100% 0h	CHIT-10:6-100% 24h	Είδος Δόνησης	cm ⁻¹ βάσει βιβλιοφίας
467	468	471	v2 O-P-O bending vibration [79]	462-474
488				
557	557	557	O-P-O bending vibration of HAp[21]	560
595.9	595	595	O-P-O bending modes of HAp[21]	599
651				Arg Ref Sample 655
660	665	665		Chit Ref Sample 661
703	708	709		Chit Ref Sample 702
761				Arg Ref Sample 764
818				
844				
875	875	875	HPO ₄ ⁻² vibration [81]	875
	961	961	P-O stretching vibration[21]	962
1024	1024	1024	P-O stretching vibration [21]	1022 <i>Chitosan Ref Sample 1024</i>
1186				Arg Ref Sample 1185
1256	1258	1258		Chit Ref Sample 1262
	1315	1315		Chit Ref Sample 1314
1331				Arg Ref Sample 1329
1373	1375			Chit Ref Sample 1373 <i>Arg Ref Sample 1374</i>
1410	1413	1410	v2&v3 vibrations of CO ₃ ⁻² [82]	1400-1500
1447	1454	1453	v2&v3 vibrations of CO ₃ ⁻² [82]	1400-1500
1474				Arg Ref Sample 1474
1548	1548	1550		Arg Ref Sample 1548
1616				Arg Ref Sample 1612
	1634	1635		Chit Ref Sample 1648
1669				
2863	2873	2867		Chit Ref Sample 2869
2938				Arg Ref Sample 2944
	3644		-OH vibration (not HAp) [79]	3642

Γενικά ο σχηματισμός ανθρακικών ενώσεων κατά την αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη, φαίνεται να ευνοείται με την τέλεση της αντίδρασης παρουσία χιτοζάνης παρά παρουσία κολλαγόνου υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος. Επιπλέον, απουσία περίσσειας φωσφορικού οξέος, υπάρχουν ενδείξεις σχηματισμού

μη στοιχειομετρικού απατίτη στα τελικά προϊόντα της αντίδρασης παρουσία χιτοζάνης.

2.3.3 Ταυτοποίηση φάσεων-Φασματοσκοπία RAMAN

Η φασματοσκοπία Raman καλύπτει όλη την υπέρυθρη φασματική περιοχή από 3600-10 cm^{-1} και παρέχει πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες και την ταυτοποίηση του μορίου. Η μέθοδος παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες από την φασματοσκοπία υπέρυθρου καθώς μέσω της δέσμης λέιζερ, μόρια που απορροφούν ελάχιστα στο φάσμα του υπέρυθρου, είναι δυνατόν να πολωθούν και να δώσουν έντονες απορροφήσεις στο φάσμα Raman. Η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται για τον λόγο αυτό σε βιολογικά συστήματα καθώς καθιστά δυνατή την παρακολούθηση επί τόπου μεταβολών δομής σε μόρια λ.χ. πρωτεϊνών.[71]

Τεχνικές φασματοσκοπίας micro-Raman έχουν χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσουν με χωρική ανάλυση περίπου 5 μm και για να ανιχνεύσουν τις φάσεις που παρουσιάζονται κατά την μελέτη οστών και βιοκεραμικών [71].

Στην εργασία αυτή, η τεχνική φασματοσκοπίας Raman χρησιμοποιήθηκε για να γίνει επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του FT-IR και του XRD, για τον σχηματισμό της φάσης του υδροξυαπατίτη και την παρατήρηση της εξέλιξης της αντίδρασης.

Ένα τυπικό φάσμα Raman μονοφασικού υδροξυαπατίτη παρασκευασμένου από mineralized gel δίνει τέσσερα διακριτά είδη δονήσεων, όπως αυτά φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 21. Συγκεντρωτικός πίνακας κορυφών Raman σε δείγμα μονοφασικού υδροξυαπατίτη

Τυπικές παρουσιαζόμενες κορυφές Raman σε δείγμα μονοφασικού υδροξυαπατίτη [81]	
Κορυφές (wn)	Δόνηση
432	v2 bending vibrations of PO_4^{3-}
442	
579	v4 fundamental vibration mode that arise from the triply degenerated bending vibrations
592	
608	
962	(characteristic of HAp) symmetric stretch peak of PO_4^{3-}
1025	v3 fundamental vibration modes that arise from the asymmetric stretching vibrations of P-O bonds
1047	
1087	

Βιβλιογραφικά, ο υδροξυαπατίτης στο Raman παρουσιάζει μέγιστη χαρακτηριστική κορυφή στα 962-963 cm^{-1} λόγω της συμμετρικής δόνησης των PO_4^{3-} μορίων.[84]

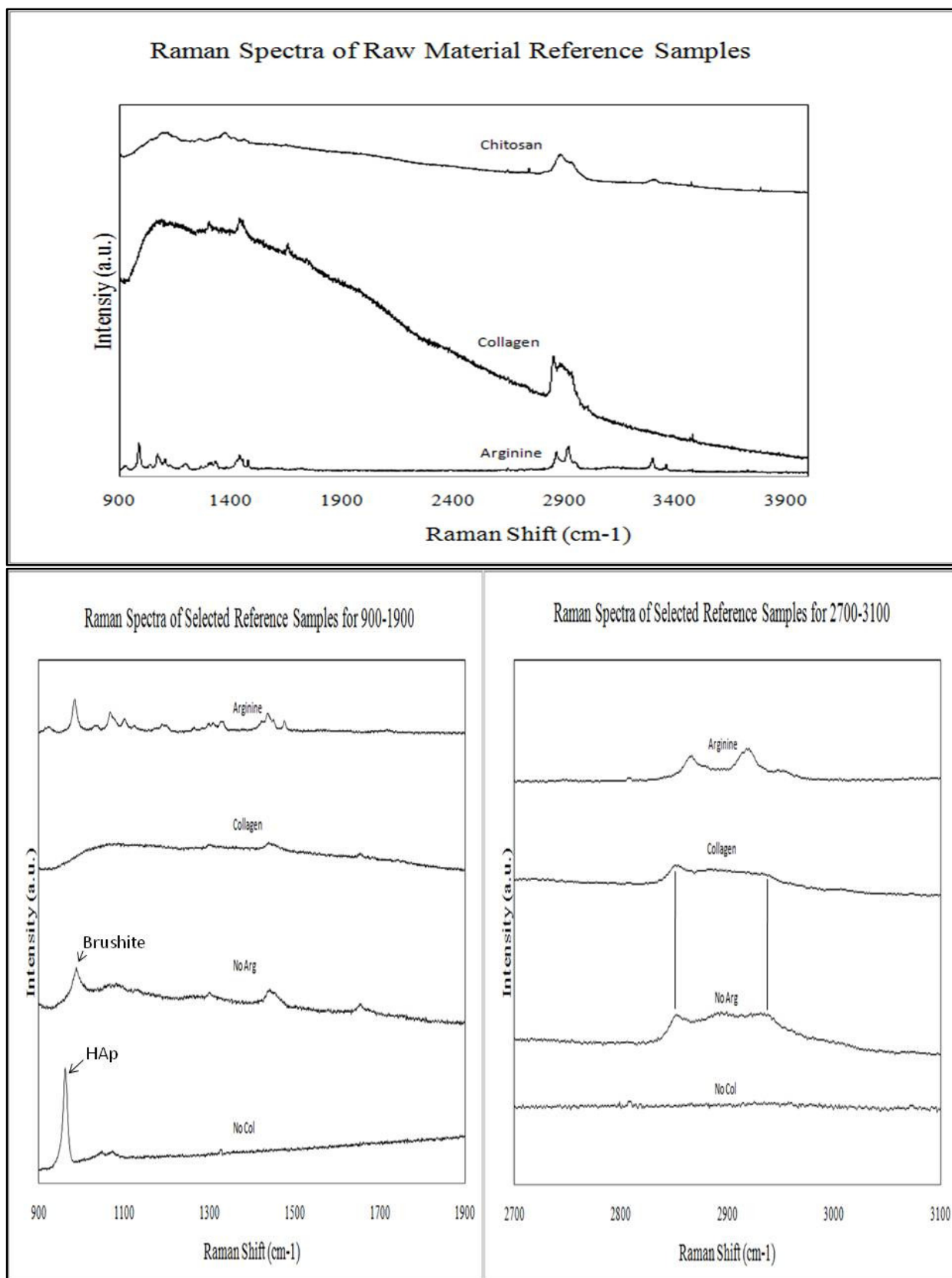
Στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας, για να είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των συστατικών του συστήματος έγιναν μετρήσεις Raman σε δείγματα αναφοράς από τις χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες.

Βιβλιογραφικά, οι βασικές κορυφές Raman του κολλαγόνου για δείγματα ιών μελετημένα στους 20°C παρουσιάζονται στα 1655, 1443, 1299, 1123, 1060, 1002, 917, 814 cm^{-1} . Οι κορυφές αυτές αποδόθηκαν σε ποικίλες δονήσεις των δεσμών CH_3 , CH_2 , CCC , C-N που εμφανίζει το μόριο του κολλαγόνου. Παρατηρήθηκε ότι κάποιες από τις κορυφές προσεγγίζουν τις βασικές κορυφές που μετρήθηκαν στα δείγματα αναφοράς στα πλαίσια της παρούσας έρευνας (1655, 1440, 1299 cm^{-1}). Γενικά, τόσο λόγω διαφοροποιήσεων μεταξύ των διαφορετικών ειδών κολλαγόνου όσο και λόγω του υψηλού θορύβου, το κολλαγόνο αποτελεί ένα από τα δυσκολότερα συστήματα προς μελέτη μέσω φασματοσκοπίας Raman.[85] Όσον αφορά την χιτοζάνη το παραγόμενο φάσμα παρουσιάζει κοινές κορυφές με τις αναμενόμενες, βάσει βιβλιογραφίας στα 2885 cm^{-1} (εκτατική δόνηση ομάδων CH CH_2), 1376 cm^{-1} (δόνηση του «backbone» της χιτοζάνης), 1116 cm^{-1} (δόνηση του “backbone” πολυσακχαριτών)[86]. Για την αργινίνη, οι αποκλισεις που παρατηρήθηκαν στις θέσεις των κορυφών των μετρήσεων που λήφθηκαν σε σχέση με την βιβλιογραφία, αποδόθηκαν στο διαφορετικό μήκος κύματος και ισχύος του χρησιμοποιούμενου laser, καθώς και σε μικρές διαφορές στην χημική σύσταση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η πρώτη ύλη αργινίνης ώστε να ληφθεί το φάσμα αναφοράς.

Φάσματα Raman Αναφοράς

Για να γίνει δυνατή η διάκριση της προέλευσης των κορυφών και η εξέλιξή τους κατά την αντίδραση έγινε έλεγχος με φασματοσκοπία Raman σε δύο ειδών δείγματα αναφοράς. Αρχικά καταγράφηκαν τα φάσματα των αρχικών σκόνεων αργινίνης, χιτοζάνης και κολλαγόνου πριν την διάλυση και στην συνέχεια εξετάστηκαν δύο δείγματα βιοαλάτων, που παρήχθησαν υπό συνθήκες έλλειψης του ενός εκ των δύο βιομορίων εναλλακτικά, ώστε να γίνει αντιληπτό πως το κάθε βιομόριο επηρεάζει την μορφολογία του φάσματος του υλικού.

Τα δείγματα αναφοράς έγιναν για την πειραματική σειρά Ca/P 1:1 παρουσία κολλαγόνου και τα φάσματα που προέκυψαν δίνονται στα διαγράμματα της εικόνας 57.



Εικόνα 57. Φάσματα Raman αναφοράς των χρησιμοποιούμενων βιομορίων και δειγμάτων αναφοράς για το σύστημα Ca/P 1:1 παρουσία κολλαγόνου

Από την παρατήρηση των φασμάτων είναι δυνατή η αναγνώριση των κορυφών που οφείλονται στα οργανικά πρόσθετα του συστήματος. Η προεργασία των οργανικών μορίων χιτοζάνης και κολλαγόνου με φωσφορικό οξύ και η διάλυση της αργινίνης σε υδατικό διάλυμα πριν την χρήση επηρεάζουν την δομή των βιομορίων κατά την αντίδραση. Στα δείγματα αναφοράς βιοαλάτων, στα οποία απουσιάζουν εναλλακτικά οι οργανικές ενώσεις, παρατηρήθηκαν οι παραμένουσες κορυφές οργανικών και τα παραγόμενα προϊόντα του φωσφορικού. Τα φάσματα που προέκυψαν φαίνονται στην εικόνα 57. Οι κορυφές των δειγμάτων αναφοράς σημειώνονται στον πίνακα 22.

Πίνακας 22. Συγκεντρωτικός πίνακας κορυφών Raman δειγμάτων αναφοράς
Κορυφές Raman (cm-1) - Δείγματα αναφοράς¹

Chit	Col	Arg	No Col	No Arg
		470		
		551		
		577		
		613		
		850		
896				
			961	
		984		
				986
			994	
1044			1047	
				1060
				1065
		1067		
			1069	
1091				
		1101		
1117 (1116 ^[86])				1111-1116
		1123		
1151				
		1189		
1260				
		1264		
		1298		
	1299 (1299 ^[85])			
				1300
		1309		
		1326		
1375 (1378 ^[86])				
1418				
				1437
	1438			
	1440 (1443 ^[85])			
		1451		
1461				
		1476		
	1654 (1655 ^[85])			
				1651
	2848			
				2850
		2836		
	2876			
2885 (2885 ^[86])				
		2887		
				2899
				2910
		2919		
2937	2935			
		2953		
	2999			
	3069			
3307				
3369				

¹ Οι βασικές κορυφές των φασμάτων συμβολίζονται με έντονα γράμματα και σε παρένθεση δίνονται οι βιβλιογραφικές αναφορές, που συμπίπτουν με τις κορυφές που ανιχνεύθηκαν.

Αναφορικά με τις σχηματιζόμενες φάσεις του φωσφορικού ασβεστίου, η απουσία αργινίνης, έδωσε τελική σκόνη βιοάλατος-κολλαγόνου που παρουσίαζε μια κορυφή στα 986 cm^{-1} του φάσματος η οποία αποδόθηκε σε εκτατική δόνηση του δεσμού P-O που θεωρείται ένδειξη ύπαρξης Μονετίτη (monetite – $\text{Ca}(\text{HPO}_4)$) ή (brushite – $\text{Ca}(\text{HPO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Μπρουσίτη. Στο δείγμα αναφοράς από το οποίο απουσίαζε το κολλαγόνο (μόνο αργινίνη), παρουσιάζεται μια κορυφή στα 962 η οποία αποδίδεται σε συμμετρική έκταση ν_1 του PO_4 του υδροξυαπατίτη [21]. Τα στοιχεία αυτά ίσως αποτελούν ένδειξη ότι η ύπαρξη αργινίνης προωθεί τον σχηματισμό υδροξυαπατίτη κατά προτίμηση στο σύστημα.

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1:1

Τα δείγματα ενδιάμεσων συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου μελετήθηκαν, ως προς το προϊόν της σκόνης που προέκυψε, με φασματοσκοπία Raman. Τα φάσματα που προέκυψαν μελετήθηκαν συγκριτικά μεταξύ τους, με σκοπό την ανίχνευση πιθανών πρόδρομων φάσεων κατά τα αρχικά στάδια της αντίδρασης και την παρατήρηση της εξέλιξης του σχηματισμού του υδροξυαπατίτη.

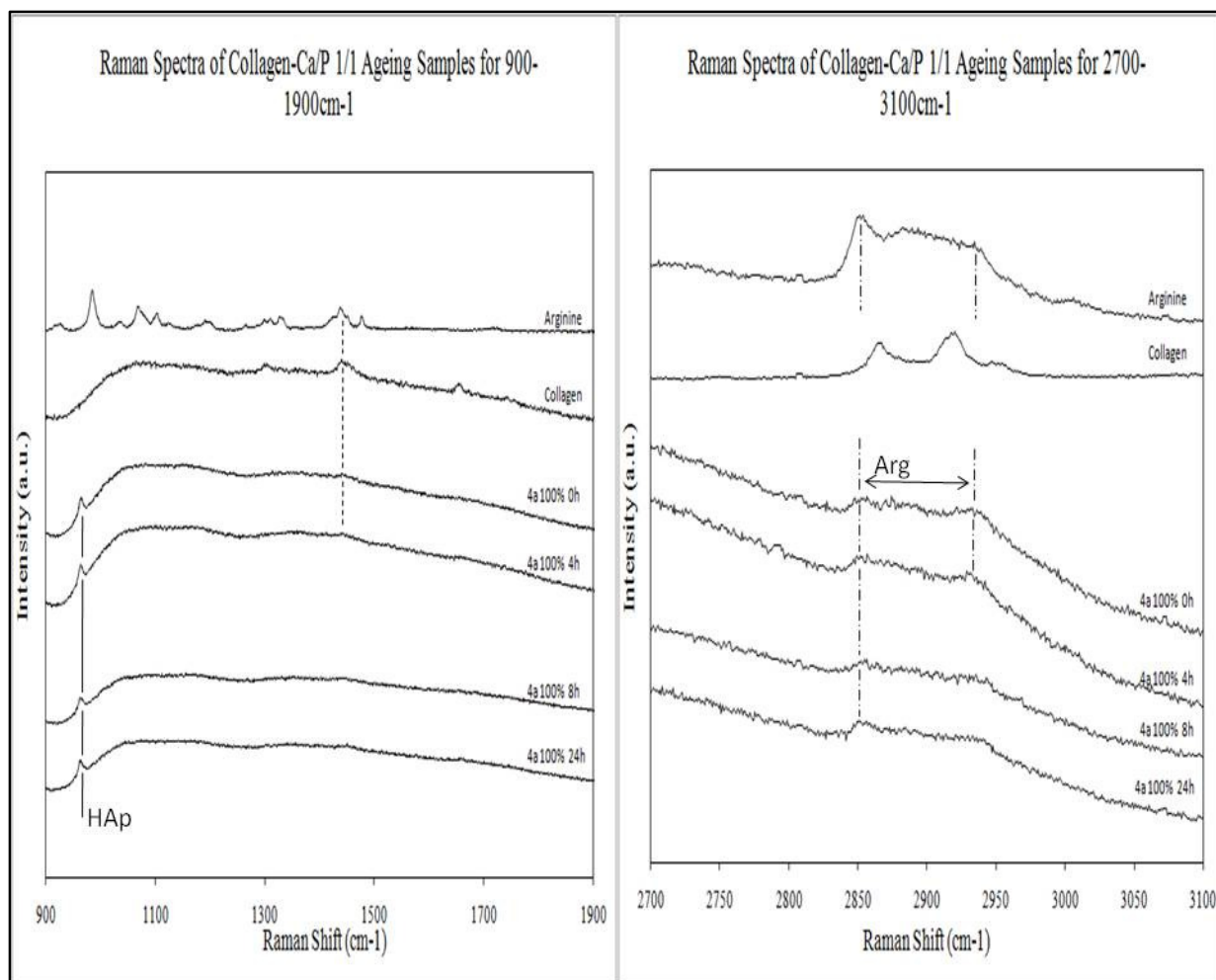
Δοκιμές που έγιναν σε κολλοειδές αιώρημα με 1% μελετήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας Raman τα σχηματισμένα φωσφορικά άλατα. Από το αιώρημα δεν έγινε δυνατή η ταυτοποίηση πρόδρομων φάσεων ή υδροξυαπατίτη, ενώ ανιχνεύτηκαν λίγες κορυφές οργανικών (2858 και 2928 cm^{-1}). Κορυφές οργανικών εμφανίζονται σε όλα τα φάσματα της πειραματικής σειράς.

Τα υπόλοιπα δείγματα των φωσφορικών αλάτων που προέκυψαν μελετήθηκαν υπό μορφή σκόνης. Στο 10% της μοριακής συγκέντρωσης παρατηρούνται κορυφές στα 980 και 962 cm^{-1} . Βάσει της βιβλιογραφίας, η ύπαρξη κορυφών στην περιοχή $980\text{--}985\text{ cm}^{-1}$ είναι ένδειξη ύπαρξης έκτασης του δεσμού P-O στο φάσμα, του οποίου η ύπαρξη συνδέεται με την ύπαρξη μπρουσίτη, παρόλα αυτά παρατηρήθηκε η ύπαρξη κορυφής που αντιστοιχεί στο φάσμα της αργινίνης στα 983 cm^{-1} . Δεδομένης της μεγαλύτερης σχετικής ποσότητας αργινίνης στο περιβάλλον διάλυμα, όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση κατά τα πρώτα στάδια της, η ύπαρξη της κορυφής αποδίδεται σε δόνηση οφειλόμενη στην αργινίνη, βάσει του φάσματος του δείγματος αναφοράς της. [21][87].

Η κορυφή 962 cm^{-1} αποτελεί την βασική κορυφή που αποδεικνύει την ύπαρξη υδροξυαπατίτη και αποδίδεται σε συμμετρική έκταση ν_1 της φωσφορικής ρίζας. Επαναλήψεις των μετρήσεων έδωσαν όμοια αποτελέσματα με ενδείξεις ύπαρξης υδροξυαπατίτη στα 962 cm^{-1} και την οφειλόμενη στην αργινίνη δόνηση σε εύρος τιμών $982\text{--}985\text{ cm}^{-1}$.

Στα δείγματα βιοκεραμικής σκόνης φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου-κολλαγόνου που προέκυψαν από την μοριακή συγκέντρωση 20% επί τις τελικής παρατηρήθηκαν δύο μικρά σκαλοπάτια-μικρές κορυφές στις 962 cm^{-1} και $980\text{--}985\text{ cm}^{-1}$, δίνοντας και πάλι ενδείξεις ύπαρξης υδροξυαπατίτη και αργινίνης.

Στα δείγματα βιοκεραμικής σκόνης φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου-κολλαγόνου που προέκυψαν από την μοριακή συγκέντρωση 40% η κυρία κορυφή της αργινίνης δεν είναι πια ορατή και διακρίνεται μόνο ξεκάθαρα η κορυφή του υδροξυαπατίτη στα



Εικόνα 59. Φάσματα Raman των δειγμάτων βιοαλάτων-κολλαγόνου διαφορετικών χρόνων γήρανσης για το σύστημα Ca/P 1:1

Πίνακας 23. Συγκεντρωτικός πίνακας κορυφών Raman δειγμάτων της πειραματικής σειράς Ca/P 1:1

Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων δονήσεων φωσφορικών αλάτων πειραματικής σειράς Ca/P 1:1		
Δείγμα σκόνης	Ανιχνευόμενη κορυφή	Ταυτοποίηση
10%	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	984 cm ⁻¹	Κορυφή αποδιδόμενη στο φάσμα της Αργινίνης
20%	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	984 cm ⁻¹	Κορυφή αποδιδόμενη στο φάσμα της Αργινίνης
40%	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
50%	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
60%	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (0h)	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	984 cm ⁻¹	Κορυφή αποδιδόμενη στο φάσμα της Αργινίνης
100% (4h)	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (8h)	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (24h)	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄

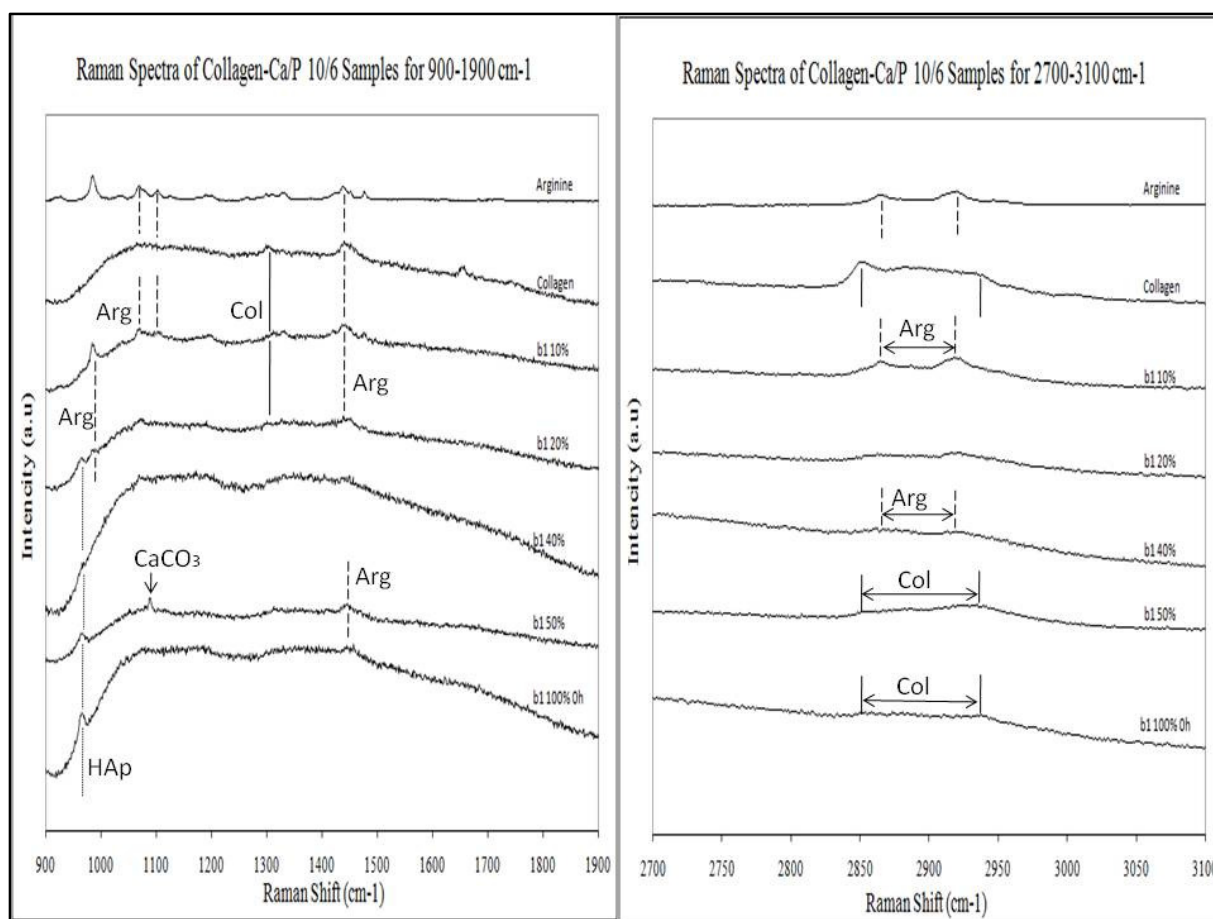
Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10:6

Όπως και στην περίπτωση των δειγμάτων που προέκυψαν με στοιχειομετρική αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο 1:1 έγινε αντιπαράθεση των φασμάτων που παρήχθησαν για να αντιπροσωπεύσουν διαφορετικά στάδια της αντίδρασης παραγωγής υδροξυαπατίτη ώστε να δοθεί μια εικόνα της εξέλιξης της αντίδρασης.

Από το κolloειδές αιώρημα 1% δεν μπόρεσαν να ληφθούν φάσματα που να δίνουν εικόνα της αντίδρασης. Στο δείγμα σκόνης που παρασκευάστηκε από το 10% ανιχνεύτηκε μόνο η κορυφή της αργινίνης στα 985 cm⁻¹, στο δείγματα του 20% συνυπάρχουν η κορυφή της αργινίνης στα 985 και αυτή του υδροξυαπατίτη στα 963 και στο δείγμα των 40% ανιχνεύτηκε μόνο η κορυφή του υδροξυαπατίτη στα 963 cm⁻¹.

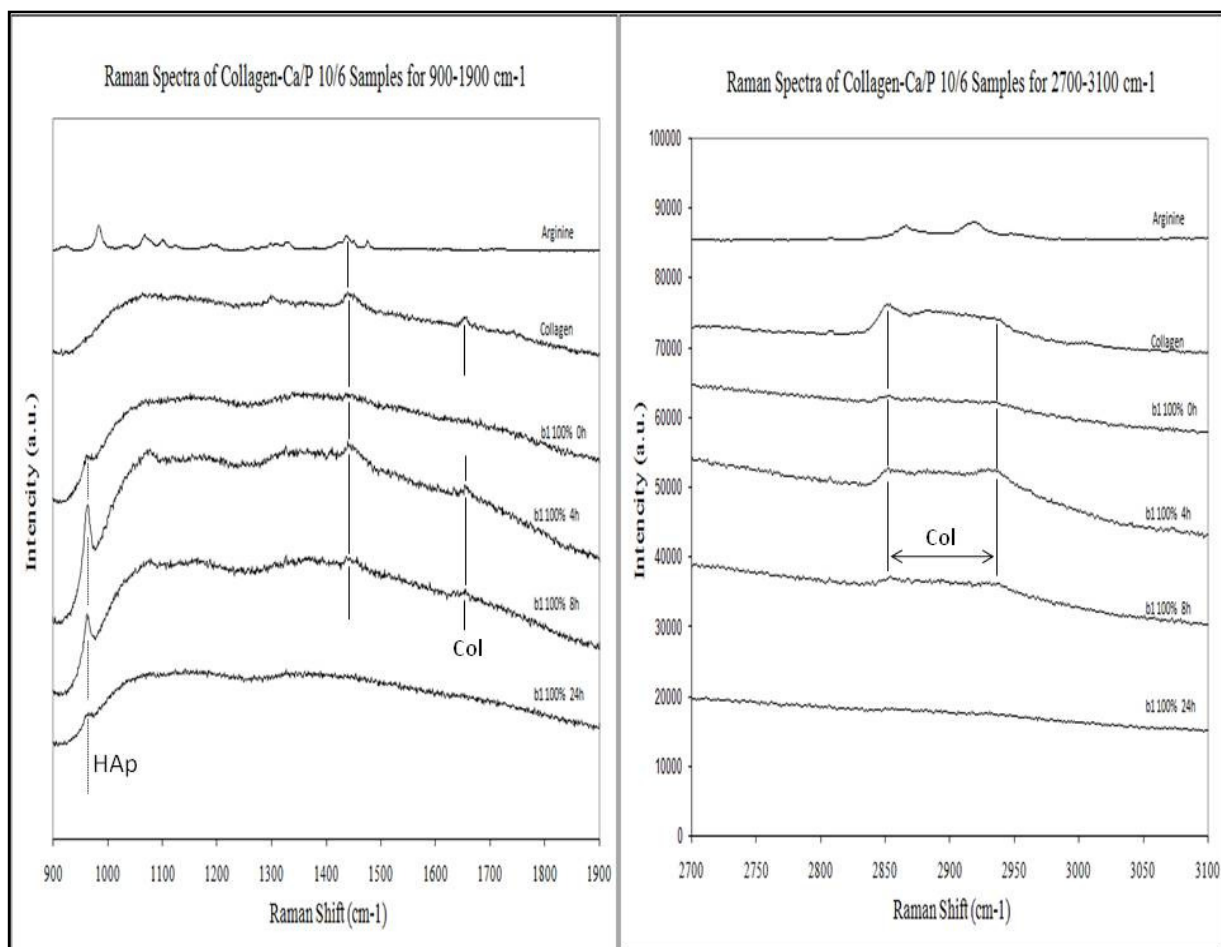
Στο φάσμα του δείγματος 50% ανιχνεύθηκε μία κορυφή στα 963 που επιβεβαιώνει την ύπαρξη υδροξυαπατίτη και μια κορυφή στα 1085 αποδόθηκε στην βασική δόνηση του CaCO₃. [86] Στο τελικό δείγμα προ γήρανσης ανιχνεύτηκε και πάλι κορυφή υδροξυαπατίτη στα 961 cm⁻¹.

Τα φάσματα που προέκυψαν από το σύνολο των δειγμάτων πριν την γήρανση, απεικονίζονται συγκεντρωτικά στο ακόλουθο διάγραμμα.



Εικόνα 60. Φάσματα Raman των ενδιάμεσων δειγμάτων βιοαλάτων-κολλαγόνου για το σύστημα Ca/P 10:6

Από τα δείγματα σκόνης που ελήφθησαν από ενδιάμεσα στάδια γήρανσης-μετά από 0, 4, 8 και 24 ώρες γήρανσης-ανιχνεύτηκε η βασική κορυφή που αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης του υδροξυαπατίτη στα 961, 962 cm^{-1} . Επιβεβαιώνεται έτσι η ύπαρξη υδροξυαπατίτη και δεν υπάρχει ένδειξη μετασχηματισμού φάσης κατά το στάδιο της γήρανσης.



Εικόνα 61. Φάσματα Raman των δειγμάτων βιοαλάτων-κολλαγόνου διαφορετικών χρόνων γήρανσης για το σύστημα Ca/P 10:6

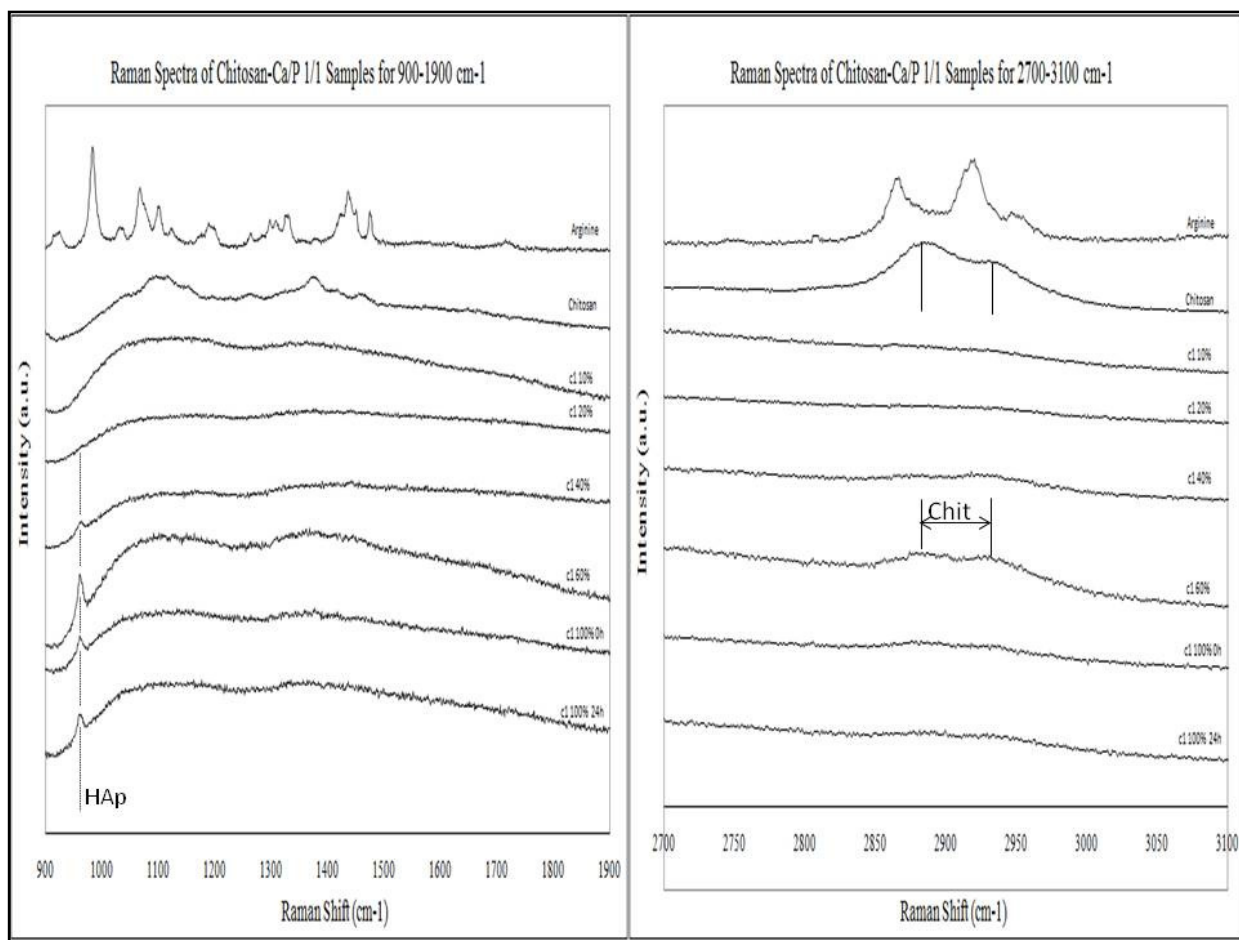
Πίνακας 24 Συγκεντρωτικός πίνακας κορυφών Raman δειγμάτων της πειραματικής σειράς Ca/P 10:6 παρουσία κολλαγόνου

Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων δονήσεων φωσφορικών αλάτων πειραματικής σειράς Ca/P 10:6		
Δείγμα σκόνης	Ανιχνευόμενη κορυφή	Ταυτοποίηση
10%	985 cm ⁻¹	Κορυφή αποδιδόμενη στο φάσμα της Αργινίνης
20%	963 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	985 cm ⁻¹	Κορυφή αποδιδόμενη στο φάσμα της Αργινίνης
40%	963cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
50%	963 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	1085	ν1 εσωτερική δόνηση του CO ₃
100% (0h)	961 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (4h)	962 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (8h)	962 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (24h)	961 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνης παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1:1

Στο φάσμα του δείγματος σκόνης που παρασκευάστηκε με το 10% των αντιδρώντων εμφανίζεται μια ασυνέχεια καμπυλότητας στα 980 cm⁻¹ που ενδεχομένως οφείλονται σε δόνηση οφειλόμενη στην αργινίνη. Στα δείγματα 20, 40, 60% και 100% πριν την γήρανση ανιχνεύτηκε μόνο η κορυφή υδροξυαπατίτη στα 962, 962, 961 και 961 cm⁻¹ αντίστοιχα.

Από τα δείγματα των σκονών που παρήχθησαν πριν και μετά την γήρανση φάνηκε ότι δεν υπήρχε διαφοροποίηση ως προς την φάση του φωσφορικού ασβεστίου. Η κορυφή που παρουσιάζεται αντιστοιχεί στην συμμετρική έκταση ν1 του PO₄ στα 962 cm⁻¹ που ταυτοποιεί τον υδροξυαπατίτη.



Εικόνα 62. Φάσματα Raman των δειγμάτων βιοαλάτων-χιτοζάνης για το σύστημα Ca/P 1:1

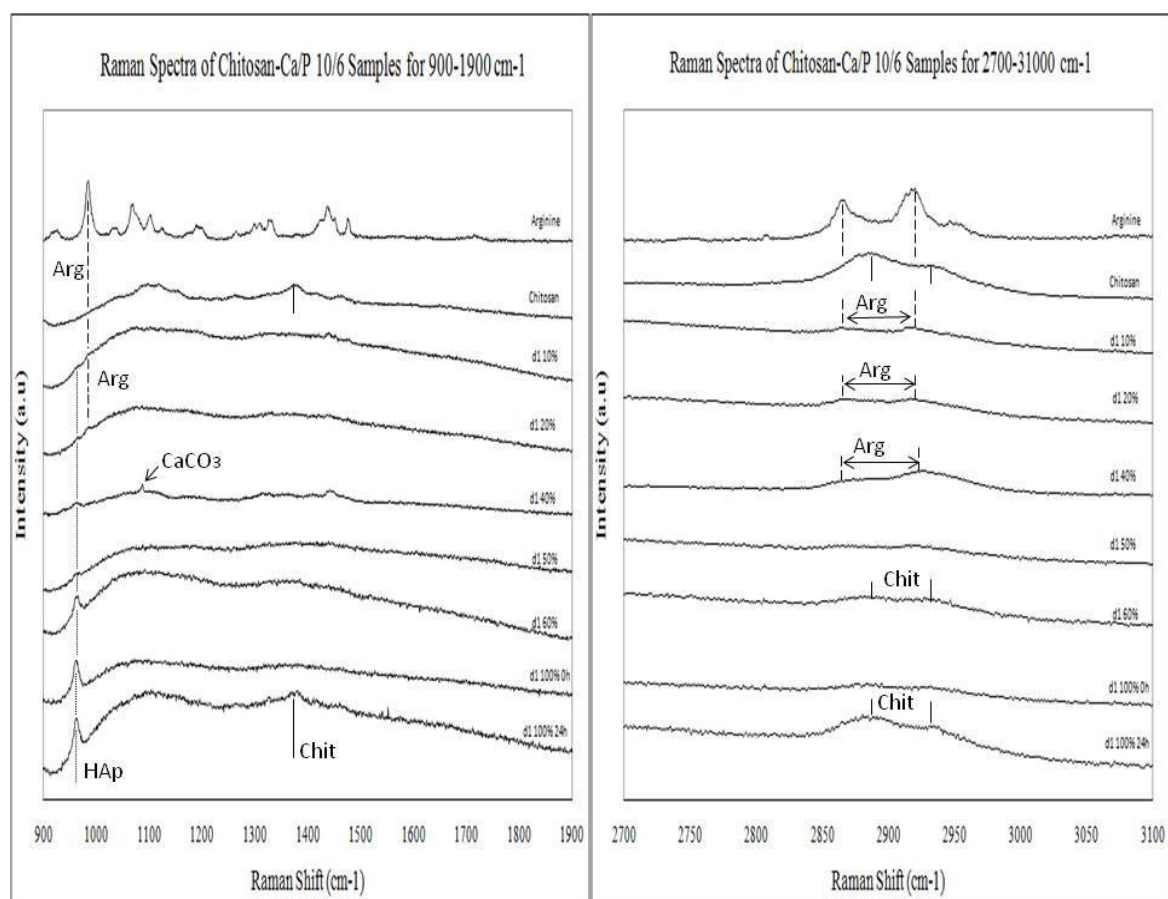
Πίνακας 25. Συγκεντρωτικός πίνακας κορυφών Raman δειγμάτων της πειραματικής σειράς Ca/P 1:1 παρουσία χιτοζάνης

Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων δονήσεων φωσφορικών αλάτων πειραματικής σειράς Ca/P 1:1		
Δείγμα σκόνης	Ανιχνευόμενη κορυφή	Ταυτοποίηση
20%	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
40%	962cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
60%	961 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (0h)	961 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (24h)	962 cm ⁻¹	v1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνης παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10:6

Από το κολλοειδές αιώρημα 1% δεν μπόρεσαν να ληφθούν φάσματα που να δίνουν εικόνα της αντίδρασης.

Το δείγμα σκόνης που παρασκευάστηκε από το 10% των αντιδρώντων έδωσε φάσμα με κορυφή στα 984 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στην αργινίνη, καθώς και στα 962 cm^{-1} λόγω συμμετρικής έκτασης ν1 του PO_4 του υδροξυαπατίτη. Στο 20% οι κορυφές που ανιχνεύτηκαν ήταν του υδροξυαπατίτη στα 962 και μια κορυφή στα 984 η οποία αποδίδεται σε δόνηση της αργινίνης. Στα δείγματα που προέκυψαν από το 40% ανιχνεύτηκαν μία κορυφή στα 962 που αποδόθηκε σε δόνηση δεσμού στον υδροξυαπατίτη και στα 1085 που οφείλεται σε ν1 εσωτερική δόνηση της ανθρακικής ρίζας. Από τα δείγματα του 50% και 60% προέκυψαν κορυφές του υδροξυαπατίτη στα 962 cm^{-1} . Από το δείγμα σκόνης τελικού αιωρήματος πριν από την γήρανση, φάνηκε ξεκάθαρα η βασική κορυφή συμμετρικής έκτασης ν1 του PO_4 στα 962 cm^{-1} που αποτελεί ένδειξη ύπαρξης υδροξυαπατίτη. Στο 100% μετά την γήρανση δεν φανερώθηκε κάποια μεταβολή φάσεων.



Εικόνα 63. Φάσματα Raman των δειγμάτων βιοαλάτων-χιτοζάνης για το σύστημα Ca/P 10:6

Πίνακας 26. Συγκεντρωτικός πίνακας κορυφών Raman δειγμάτων της πειραματικής σειράς Ca/P 10:6 παρουσία χιτοζάνης

Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποιημένων δονήσεων φωσφορικών αλάτων πειραματικής σειράς Ca/P 10:6		
Δείγμα σκόνης	Ανιχνευόμενη κορυφή	Ταυτοποίηση
10%	962 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	984 cm ⁻¹	Κορυφή αποδιδόμενη στο φάσμα της Αργινίνης
20%	962 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	984 cm ⁻¹	Κορυφή αποδιδόμενη στο φάσμα της Αργινίνης
40%	962cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
	1085 cm ⁻¹	ν1 εσωτερική δόνηση του CO ₃
50%	961 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
60%	961 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (0h)	962 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄
100% (24h)	962 cm ⁻¹	ν1 συμμετρική εκτατική δόνηση του PO ₄

Συμπερασματικά, από την σύγκριση των διαγραμμάτων των διαφορετικών δειγμάτων που αντιπροσωπεύουν το αρχικό στάδιο (10%) της αντίδρασης για όλες τις πειραματικές σειρές, μπορεί να παρατηρηθούν κορυφές που αποδίδονται στην αργινίνη. Τέλος, μετά την προσθήκη ποσοστού 40-50% των αντιδραστηρίων για τα δείγματα που παρασκευάστηκαν απουσία περίσσειας οξέος, ανιχνεύτηκαν κορυφές στα 1085 cm⁻¹, οι οποίες αποδόθηκαν σε δόνηση του CaCO₃.

2.3.4 Μελέτη μορφολογίας παραγόμενων Δομών-Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διερχόμενης Δέσμης

Όταν το οστό υφίσταται φθορά λόγω ασθένειας ή τραυματισμού, η αντικατάσταση του γίνεται με φυσικό οστό λόγω της έλλειψης βιοσυμβατότητας που παρουσιάζουν συνήθως τα συνθετικά οστά. Το φυσικό οστό όμως μπορεί να προκαλέσει προβλήματα μόλυνσεων στο άτομο. Για να αποφευχθούν τα προβλήματα μόλυνσεων που μπορεί να προκαλέσει ένα φυσικό εμφύτευμα, η προσπάθεια έχει στραφεί στην δημιουργία συνθετικών υλικών, τα οποία να έχουν την ίδια δομή και ιδιότητες με το βιολογικό οστό. Εκτός από την χημική σύσταση των παραγομένων σύνθετων βιοκεραμικών υδροξυαπατίτη με φυσικό πολυμερές (κολλαγόνο ή χιτοζάνη) πολύ μεγάλη σημασία για την συμπεριφορά του τελικού υλικού έχει και η δομή την οποία σχηματίζουν τα συστατικά μεταξύ τους.

Το οστό αποτελεί ένα νανοσύνθετο υλικό, είναι δηλαδή ένα πολυφασικό στερεό αποτελούμενο από δύο φάσεις εκ των οποίων η μια έχει διαστάσεις μικρότερες από 100 νανόμετρα. Η φάση του βιο-απατίτη αποτελείται από ράβδους διαστάσεων μέχρι 100 νανόμετρα όπως φαίνεται και από την εικόνα. Γενικά ο λόγος μήκους προς πλάτος στις ράβδους αυτές κυμαίνεται μεταξύ 3 και 5.

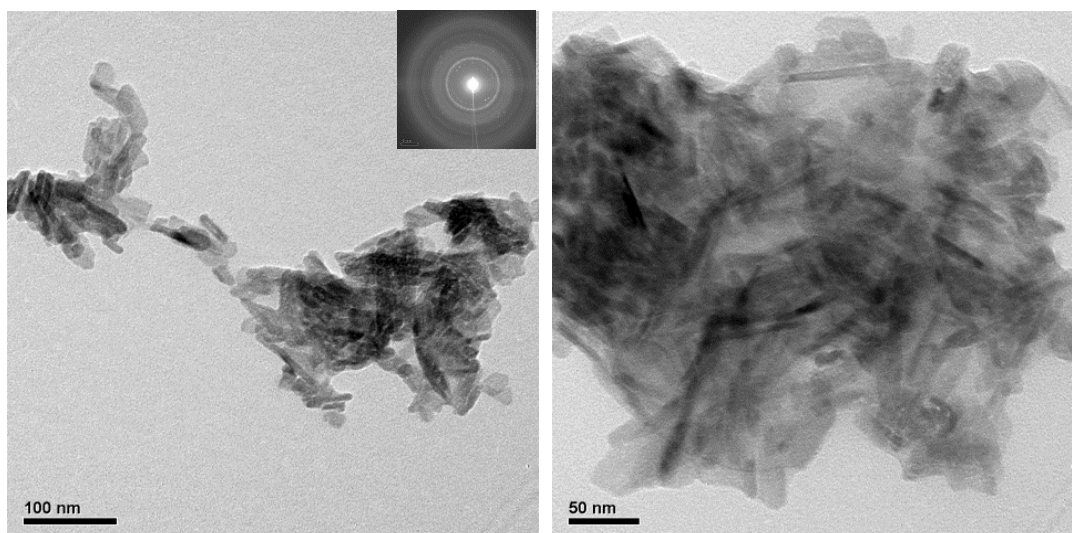
Λόγω της μεγάλης σημασίας που παρουσιάζει η μικροδομή για την τελική συμπεριφορά του βιοκεραμικού υλικού, δείγματα υδροξυαπατίτη που παρήχθησαν παρουσία περίσσειας κολλαγόνου και χιτοζάνης μελετήθηκαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διερχόμενης δέσμης, ώστε να γίνει αντιληπτή αφενός η μορφολογία του τελικού προϊόντος και αφετέρου κατά πόσο οι τεχνητά παραγόμενοι κόκκοι υδροξυαπατίτη προσεγγίζουν την επιθυμητή μορφολογία των φυσικών του οστού.

Από τις εικόνες που λήφθηκαν με την μέθοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διερχόμενης δέσμης από τις παραγόμενες σκόνες, τα προϊόντα μελετήθηκαν ως προς το μέγεθος, το σχήμα των κόκκων και την κρυσταλλικότητα τους. Για κάθε πειραματική σειρά έγινε έλεγχος στην τελική παραγόμενη σκόνη υδροξυαπατίτη καθώς και στην παραγόμενη από το 10% των αντιδρώντων, σκόνη.

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1:1

Μετά από επεξεργασία των εικόνων και παρατήρηση των διαγραμμάτων περίθλασης ηλεκτρονίων σε επιλεγμένες περιοχές (selected area electron diffraction SAED) του δείγματος της τελικής σκόνης υδροξυαπατίτη, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα.

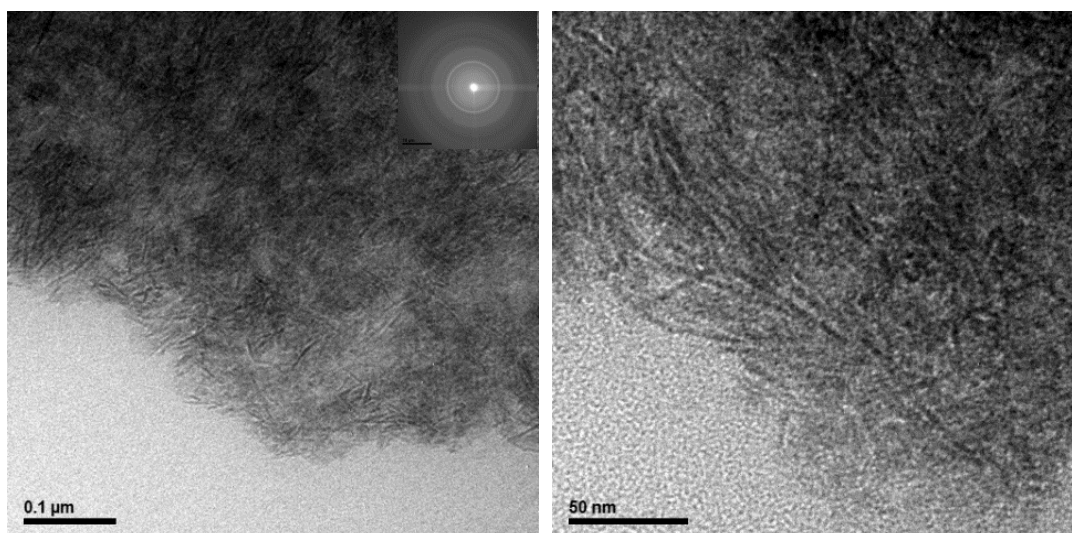
Το δείγμα είναι σχετικά ομοιογενές με εμφανή την παρουσία ραβδόμορφων νανοκρυστάλλων. Βάσει της κλίμακας υπολογίστηκε το μέσο πλάτος και μήκος ενδεικτικού αριθμού κόκκων και προέκυψε ότι το μέσο μήκος των κόκκων είναι 53 nm και το μέσο πλάτος 20 nm, παρήχθησαν δηλαδή νανοράβδοι βιοάλατος με λόγο μήκους προς πλάτος περίπου ίσο με 3. Τα διαγράμματα SAED δίνουν εικόνα ομόκεντρων δακτυλίων, με εμφανή την παρουσία του δακτυλίου από την περίθλαση στο επίπεδο (211) του υδροξυαπατίτη, σε συμφωνία με την περίθλαση ακτίνων X. Ωστόσο, είναι επίσης εμφανής η αυξημένη διαχυτότητα των δακτυλίων περίθλασης ενδεικτικό της παρουσίας και άμορφου υλικού.



Εικόνες 64: TEM παραγόμενων σκόνεων μετά από την αντίδραση του 100% των αντιδρώντων λόγου Ca/P=1:1 παρουσία κολλαγόνου

Το δείγμα σκόνης που προέκυψε από την αντίδραση του 10% των αντιδρώντων μελετήθηκε ώστε να ληφθεί μια εικόνα της εξέλιξης της μορφολογίας των κόκκων μεταξύ ενός αρχικού και του τελικού σταδίου της αντίδρασης. Η κοκκομετρία είναι αισθητά μικρότερη και τα όρια των κόκκων πιο δυσδιάκριτα.

Μετά από μέτρηση των διαστάσεων δείγματος κόκκων, το μέσο μήκος τους υπολογίστηκε στα 28,5 nm και το μέσο πλάτος τους στα περίπου 3 nm. Η πολύ εντονότερη παρουσία άμορφου υλικού είναι επίσης εμφανής στο διάγραμμα SAED το οποίο παρουσιάζει σε αυτή την περίπτωση έντονη διαχυτότητα των δακτυλίων.



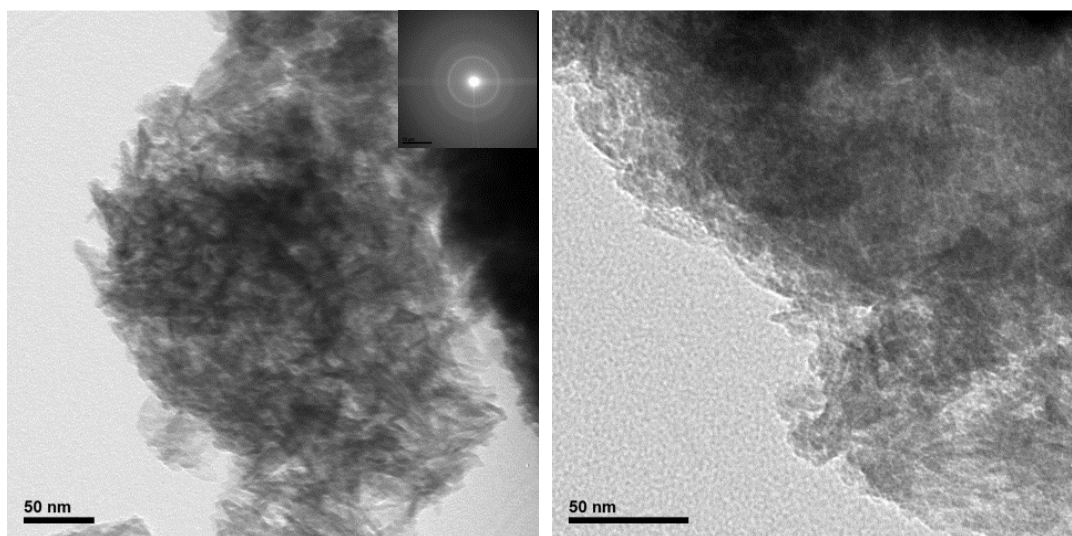
Εικόνες 65: TEM παραγόμενων σκόνεων μετά από την αντίδραση του 10% των αντιδρώντων λόγου Ca/P=1:1 παρουσία κολλαγόνου

Συμπερασματικά μετά την παρατήρηση των δύο δειγμάτων φαίνεται η εξέλιξη του σχηματισμού των ράβδων από λεπτές ράβδους σχεδόν βελόνες με σημαντικά μεγαλύτερη την μία διάσταση ως προς την άλλη, σε καλά σχηματισμένες ράβδους.

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Κολλαγόνου παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10:6

Μετά από επεξεργασία των εικόνων και παρατήρηση των διαγράμματα περίθλασης ηλεκτρονίων (SAED) του δείγματος της τελικής σκόνης υδροξυαπατίτη, προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα.

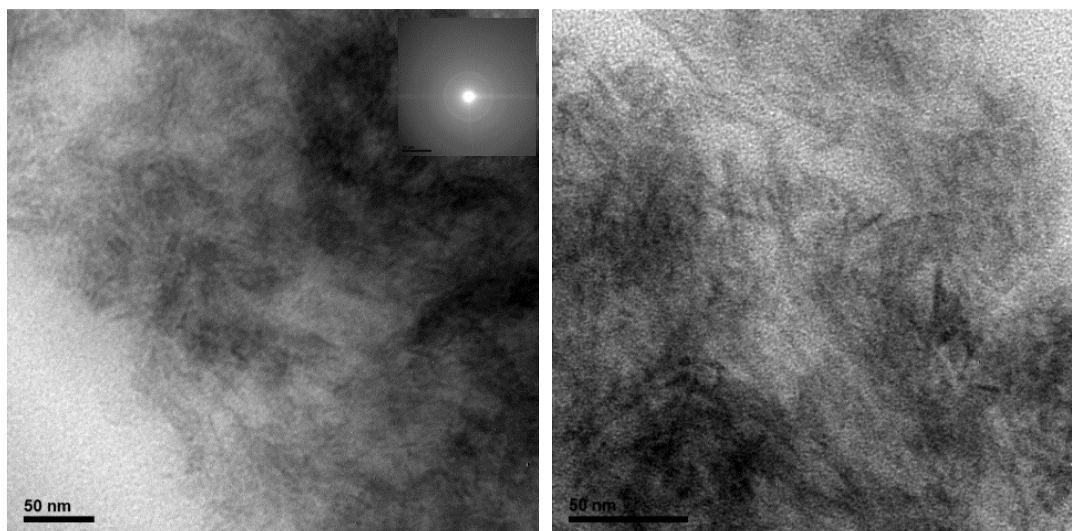
Βάσει της κλίμακας της εικόνας υπολογίστηκε το μέσο πλάτος και μήκος ενδεικτικού αριθμού κόκκων και προέκυψε ότι το μέσο μήκος των κόκκων είναι 17,8nm και το μέσο πλάτος 3nm, παρήχθησαν δηλαδή νανοράβδοι βιοάλατος με λόγο μήκους προς πλάτος περίπου ίσο με 5. Το διάγραμμα περίθλασης ηλεκτρονίων (SAED) δίνει εικόνα ομόκεντρων δακτυλίων ένας εκ των οποίων αντιστοιχεί σε περίθλαση στο επίπεδο (211) του υδροξυαπατίτη, ένδειξη της κρυστάλλωσης του υδροξυαπατίτη. Η διαχυτότητα των δακτυλίων επιβεβαιώνει την παρουσία άμορφου υλικού.



Εικόνες 66. TEM παραγόμενων σκόνεων μετά από την αντίδραση του 100% των αντιδρώντων λόγου Ca/P=10:6 παρουσία κολλαγόνου

Και από την εικόνα μεγαλύτερης μεγέθυνσης είναι φανερό ότι σε σχέση με την εικόνα των κόκκων οι παραγόμενοι ράβδοι είναι πιο στενόμακροι.

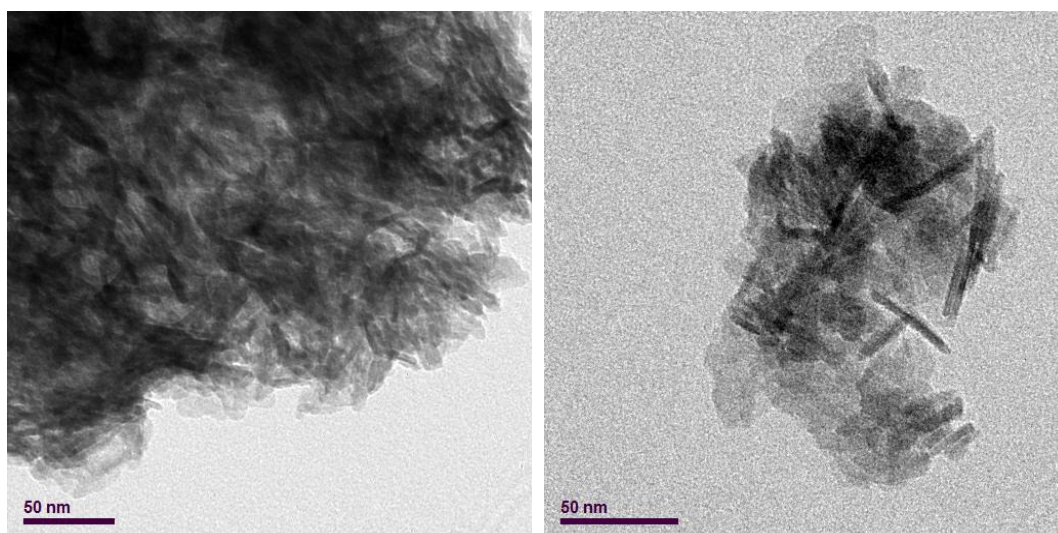
Το δείγμα σκόνης που προέκυψε από την αντίδραση του 10% των αντιδρώντων μελετήθηκε ώστε να ληφθεί μια εικόνα της εξέλιξης της μορφολογίας των κόκκων μεταξύ ενός αρχικού και του τελικού σταδίου της αντίδρασης. Η κοκκομετρία δεν φαίνεται να παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση ως προς τις διαστάσεις των κόκκων ~23 nm μήκος και 3 nm πλάτος, το άμορφο υλικό όμως φαίνεται να αποτελεί μεγαλύτερο μέρος του δείγματος, γεγονός που φαίνεται και από το διάγραμμα περίθλασης ηλεκτρονίων στο οποίο οι ομόκεντροι δακτύλιοι των επιπέδων είναι πιο δυσδιάκριτοι και η διαχυτότητα τους, η οποία παραπέμπει στην ύπαρξη άμορφης φάσης, είναι πολύ πιο έντονη. Εντοπίζεται και πάλι δακτύλιος από περίθλαση στο επίπεδο (211) του υδροξυαπατίτη.



Εικόνες 67.TEM παραγόμενων σκόνεων μετά από την αντίδραση του 10% των αντιδρώντων λόγου Ca/P=10:6 παρουσία κολλαγόνου

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνης παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 1:1

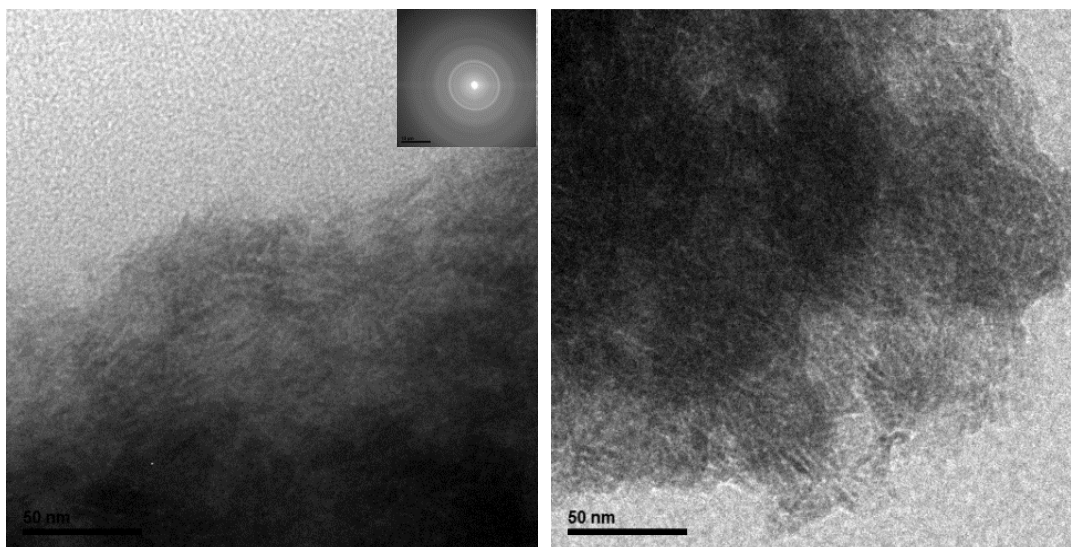
Από την πειραματική σειρά αυτή, εξετάστηκαν η τελική σκόνη βιοάλατος που προέκυψε από την πλήρη αντίδραση των αντιδραστηρίων, καθώς και η σκόνη που προέκυψε από την αντίδραση του 10% των αντιδρώντων. Βάσει της κλίμακας υπολογίστηκε το μέσο πλάτος και μήκος ενδεικτικού αριθμού κόκκων και προέκυψε το μέσο μήκος και μέσο πλάτος των κόκκων του παραγόμενου βιοκεραμικού ίσο με 35nm και 4nm αντίστοιχα.



Εικόνες 68.TEM παραγόμενων σκόνεων μετά από την αντίδραση του 100% των αντιδρώντων λόγου Ca/P=1:1 παρουσία χιτοζάνης

Σε σύγκριση με το αντίστοιχο δείγμα του κολλαγόνου, η μικροδομή φαίνεται να αποτελείται από μικρότερο ποσοστό ευδιάκριτων κρυστάλλων και μεγαλύτερο μέρος άμορφης μάζας. Ακόμα, φαίνεται ότι η μικροδομή του βιοκεραμικού που παρήχθη παρουσία κολλαγόνου, έδωσε πιο ομοιογενή μικροδομή με ευκρινέστερους κρυστάλλους, ενώ αντίθετα το βιοκεραμικό που παρήχθη παρουσία χιτοζάνης έχει πιο ανομοιογενή δομή με συνύπαρξη λεπτών βελονοειδών πλακιδίων και άμορφης μάζας (γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα φάσματα περιθλασιμετρίας ακτίνων X

των αντίστοιχων δειγμάτων). Από τις δύο δομές η δομή του βιοκεραμικού που παρήχθη παρουσία κολλαγόνου φάνηκε να προσεγγίζει περισσότερο την δομή των κόκκων βιοαπατίτη του οστού (απουσία μεγάλου ποσοστού άμορφης μάζας, νανοράβδοι (βλ αρχική εικόνα)).

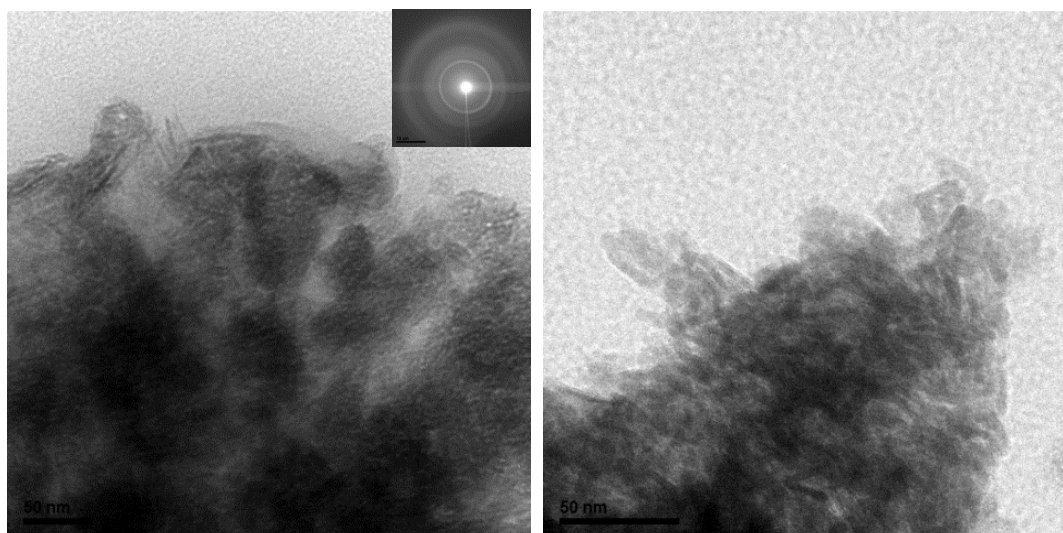


Εικόνες 69. TEM παραγόμενων σκόινων μετά από την αντίδραση του 10% των αντιδρώντων λόγου Ca/P=1:1 παρουσία χιτοζάνης

Από τη μελέτη της σκόνης που προέκυψε μετά από την αντίδραση του 10% των αντιδραστηρίων, υπολογίστηκε το μέσο μήκος και μέσο πλάτος των κόκκων του παραγόμενου βιοκεραμικού ίσο με 22,7nm και 3nm αντίστοιχα. Από το διάγραμμα περίθλασης ηλεκτρονίων λαμβάνεται εικόνα ομόκεντρων δακτυλίων με εμφανή την παρουσία του δακτυλίου από την περίθλαση στο επίπεδο (211) του υδροξυαπατίτη και χαρακτηριστική διαχυτότητα που παραπέμπει στην παρουσία άμορφου υλικού.

Δείγματα Υδροξυαπατίτη-Χιτοζάνης παρασκευασμένα με λόγο Ca/P 10:6

Οι εικόνες του TEM της σκόνης του τελικού προϊόντος της αντίδρασης παρουσία χιτοζάνης, έδωσαν τελικό προϊόν με λεπτές ράβδους εντός άμορφης μάζας, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από το διάγραμμα περίθλασης ηλεκτρονίων στο οποίο φαίνονται ομόκεντροι δακτύλιοι περίθλασης κρυσταλλικών επιπέδων με χαρακτηριστικό τον δακτύλιο από την περίθλαση στο επίπεδο (211) του υδροξυαπατίτη. Η διαχυτότητα των δακτυλίων παραπέμπει στην παρουσία άμορφου υλικού.



Εικόνες 70. TEM παραγόμενων σκόνηων μετά από την αντίδραση του 100% των αντιδρώντων λόγου Ca/P=10:6 παρουσία χιτοζάνης.

Οι μέσες διαστάσεις των κόκκων υπολογίστηκαν περίπου ίσες με 22nm το μήκος και 3,6 το πλάτος. Το μέγεθος τους προσεγγίζει τις τιμές που είχαν οι κόκκοι των αρχικών σταδίων των αντιδράσεων για τα άλλα δείγματα κολλαγόνου 1:1 10% και 10:6 10% και της χιτοζάνης 1:1 10%, ενώ και σε αυτή την περίπτωση σημειώνεται η ύπαρξη σημαντικής άμορφης φάσης.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων-Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, έγινε προσπάθεια μελέτης του μηχανισμού αντίδρασης που ακολουθείται κατά την εξουδετέρωση φωσφορικού οξέος με υδροξείδιο του ασβεστίου, παρουσία δύο διαφορετικών βιομορίων σε ρόλο πλαισίου-υλικού αποτύπωσης για την δόμηση βιοάλατος υδροξυαπατίτη, χρησιμοποιώντας ως βάση συνταγή σύνθεσης υδροξυαπατίτη που προσδιορίστηκε σε προηγούμενο ερευνητικό στάδιο.

Ο υδροξυαπατίτης συντέθηκε μέσω αντίδρασης υδροξειδίου του ασβεστίου και ορθοφωσφορικού οξέος σε περιβάλλον διαλύματος αμινοξέος αργινίνης. Μελετήθηκαν τέσσερις περιπτώσεις:

αντίδρασης υδροξειδίου του ασβεστίου με περίσσεια οξέος τόση, ώστε ο λόγος των ιόντων Ca/P μέσα στο αιώρημα αντίδρασης να είναι ίσος με (1/1) υπό την παρουσία βιομορίων κολλαγόνου προκατεργασμένου στο οξύ.

αντίδραση υδροξειδίου του ασβεστίου με περίσσεια φωσφορικού οξέος, ώστε ο λόγος Ca/P μέσα στο αιώρημα αντίδρασης να είναι ίσος (1/1) υπό την παρουσία βιομορίων χιτοζάνης που έχει υποστεί προκατεργασία στο οξύ.

αντίδραση υδροξειδίου του ασβεστίου κατάλληλη ποσότητα φωσφορικού οξέος , ώστε ο λόγος Ca/P μέσα στο αιώρημα αντίδρασης να είναι ίσος (10/6) υπό την παρουσία βιομορίων κολλαγόνου που έχει υποστεί προκατεργασία στο οξύ.

αντίδραση υδροξειδίου του ασβεστίου κατάλληλη ποσότητα φωσφορικού οξέος, ώστε ο λόγος Ca/P μέσα στο αιώρημα αντίδρασης να είναι ίσος (10/6) υπό την παρουσία βιομορίων χιτοζάνης που έχει υποστεί προκατεργασία στο οξύ

Η αντίδραση γίνεται σε κάθε περίπτωση σε βιοεμπνευσμένες συνθήκες ελαφρώς βασικού pH και θερμοκρασίας 40°. Δείγματα από τα πρόδρομα αιωρήματα βιομορίων – οξέος καθώς και δείγματα του παραγόμενου φωσφορικού άλατος του ασβεστίου σε μορφή αιωρήματος και σκόνης, εξετάστηκαν ως προς τις ιδιότητες τους και χαρακτηρίστηκαν με κατάλληλες μεθόδους, ώστε να εντοπιστούν πως σημαντικοί παράγοντες όπως η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων και το είδος των πολυμερών βιομορίων τους επηρεάζει τον μηχανισμό, που διέπει την αντίδραση σχηματισμού υδροξυαπατίτη στο παρόν σύστημα (ο μηχανισμός αυτός είναι κοινός σε κάθε εξεταζόμενη περίπτωση) .

1.Καθορισμός της βασικής αλληλουχίας σταδίων της αντίδρασης.

Η αρχική μέριμνα κατά την προσπάθεια καθορισμού της αντίδρασης είναι να υπάρξει επιβεβαίωση ότι η ίδια αντίδραση συμβαίνει και στα τρία εξεταζόμενα συστήματα. Μέσω των χρησιμοποιούμενων μεθόδων χαρακτηρισμού (XRD, FTIR, Raman) έγινε δυνατή η ταυτοποίηση υδροξυαπατίτη, ως το άλας φωσφορικού ασβεστίου που παράγεται από την πειραματική διαδικασία από κάθε σύστημα.

Βάση της πειραματικής διαδικασίας που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του μελετούμενου βιοάλατος υπάρχουν δύο διακριτά στάδια που ενδεχομένως να

επηρεάζουν την δομή του τελικού παραγόμενου υδροξυαπατίτη: το στάδιο της σύνθεσης (αντίδρασης) και το στάδιο της γήρανσης.

- Για το στάδιο της γήρανσης, μέσω των χαρακτηρισμών XRD, FT-IR και Raman που τελέστηκαν επιβεβαιώθηκε ότι ο υδροξυαπατίτης έχει σχηματιστεί ήδη από το στάδιο της σύνθεσης. Ακόμα δεν ανιχνεύτηκαν σημαντικές μεταβολές στα προϊόντα των ακραίων θέσεων, δηλαδή στα δείγματα που παρήχθησαν μετά από 24 ώρες γήρανση και εκείνα που δεν υπέστησαν καθόλου γήρανση, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα XRD και FT-IR. όσο και μέσα στην διάρκεια της γήρανσης όπως φάνηκε από τους ελέγχους Raman που έγιναν σε δείγματα σκονών που προέκυψαν από αιωρήματα των οποίων η γήρανση διακόπηκε στις 4 ή 8 ώρες μεταξύ των οποίων δεν έγινε διακριτή καμία διαφορά. Το καλύτερα κρυσταλλωμένο προϊόν φάνηκε να παρήχθη υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος παρουσία κολλαγόνου γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα του TEM. Όσον αφορά τον μηχανισμό ανάπτυξης των κόκκων, μέσω TEM επιβεβαιώθηκε η μεγέθυνση των παραγόμενων βελονοειδών κόκκων σε ράβδους μεταξύ των σχηματιζόμενων κόκκων του αρχικού σταδίου (10%) και της σκόνης του τελικού προϊόντος για τα δείγματα που παρήχθησαν υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος και παρουσία κολλαγόνου, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα δεν φάνηκε έντονη μεταβολή στο σχήμα των κόκκων του αρχικού και τελικού σταδίου. Δεν εξακριβώθηκε με μέθοδο μικροσκοπίας κατά πόσο η γήρανση επηρεάζει την μορφή του παραγόμενου υδροξυαπατίτη και τα αποτελέσματα περιθλασιμετρίας ακτίνων X δεν έδωσαν αντίστοιχες πληροφορίες.
- Το στάδιο της σύνθεσης είναι πιο περίπλοκο και παρουσιάζει μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ των περιπτώσεων.
 - Κατά κανόνα παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα που παρήχθησαν με σκοπό την μελέτη των αρχικών σταδίων της αντίδρασης (10%) ανιχνεύτηκε υδροξυαπατίτης (για όλα τα δείγματα μέσω XRD, FT-IR, Raman, SAED) με το καλύτερα κρυσταλλωμένο προϊόν να προκύπτει από τα δείγματα 10% Ca/P 1/1 παρουσία κολλαγόνου (XRD, TEM-SAED), χωρίς να απουσιάζει το άμορφο υλικό από κάθε περίπτωση.
 - Σαν δευτερεύουσες φάσεις ανιχνεύτηκαν ανθρακικό ασβέστιο ενώ υπάρχουν ενδείξεις ύπαρξης μπουσίτη και μη στοιχειομετρικού απατίτη που δεν επιβεβαιώθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, ο έλεγχος με ακτίνες X περίθλασης έδωσε ενδείξεις ύπαρξης της δευτερεύουσας φάσης του μπρουσίτη (κορυφή $29,4^\circ$) στο δείγμα του 10% του δείγματος χωρίς περίσσεια παρουσία κολλαγόνου (CoI-Ca/P 10/6) ένδειξη που δεν επαληθεύτηκε από τις άλλες μεθόδους χαρακτηρισμού. Ειδικά στα δείγματα βιοάλατος που παρήχθη παρουσία χιτοζάνης η φασματοσκοπία υπερύθρου έδωσε ένδειξη δόνησης του HPO_4^{2-} η οποία αποδόθηκε στην ύπαρξη μη στοιχειομετρικού υδροξυαπατίτη (Ca-dHAp) από την αρχή της αντίδρασης (10%) μέχρι μετά την γήρανση (100% 24 ώρες γήρανση).
 - Από την φασματοσκοπία υπερύθρου ανιχνεύτηκαν δονήσεις ανθρακικών ριζών, ένδειξη σχηματισμού ανθρακικών αλάτων, στα δείγματα όλων των πειραματικών σειρών από την αρχή της αντίδρασης και μέχρι τα δείγματα των τελικών σκονών (100%-24 ώρες γήρανση). Από την φασματοσκοπία Raman επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη χαρακτηριστικής δόνησης του ασβεστίτη

σε δείγματα που παρήχθησαν απουσία περίσσειας οξέος (d1 20%,40%, b1 50%,100% 0h)

Γενικά δεν έγινε δυνατή η ταυτοποίηση με βεβαιότητα κάποιας εκ των δευτερευουσών φάσεων μέσω διασταύρωσης αποτελεσμάτων από τις διαφορετικές μεθόδους χαρακτηρισμού. Μολαταύτα, ο σχηματισμός ανθρακικών ενώσεων και υδροξυαπατίτη από την αρχή της αντίδρασης (FT-IR,Raman και FT-IR, Raman, XRD αντίστοιχα) αποτελεί ένδειξη ότι ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών συνδυασμών (χιτοζάνη-κολλαγόνο, περίσσεια οξέος-χωρίς περίσσεια). Ακόμα, η ύπαρξη ενδείξεων δευτερευουσών φάσεων στα δείγματα και των δύο ειδών βιομορίων απουσία περίσσειας (FT-IR, Raman) είναι ένδειξη πως η περίσσεια οξέος δρα θετικά στον σχηματισμό υδροξυαπατίτη μειώνοντας την μεσολάβηση πρόδρομων φάσεων. Η υπόθεση αυτή ενδεχομένως στηρίζεται και από τις μετρήσεις του pH κατά την αντίδραση όπου η απουσία περίσσειας αποσταθεροποιεί το pH του διαλύματος κατά την διάρκεια της αντίδρασης (σκαλοπάτι μεταξύ 20% και 50% προσθήκης). Βιβλιογραφικά, υπάρχουν αναφορές ότι οι μεταβολές αυτές του pH μπορεί να οφείλονται σε δημιουργία χαμηλής κρυσταλλικότητας προϊόντων και επαναδιάλυση τους στο αιώρημα κατά την πρόοδο της αντίδρασης. Αντίθετα στο διάλυμα αντίδρασης των δειγμάτων σε συνθήκες περίσσειας, το pH φαίνεται να μεταβάλλεται ομαλά κατά την εξέλιξη της αντίδρασης μη ευνοώντας ίσως τον σχηματισμό δευτερευουσών φάσεων.

Η ύπαρξη πρόδρομων φάσεων, στα δείγματα που παρασκευάστηκαν απουσία περίσσειας, και σε πιο προχωρημένα στάδια της αντίδρασης σε μικρές μη ανιχνεύσιμες ποσότητες δεν μπορεί να αποκλειστεί. Δεν μπορεί να αποκλειστεί όμως ούτε και η περίπτωση ύπαρξης μη ανιχνεύσιμων ποσοτήτων πρόδρομων φάσεων για τα δείγματα που παρασκευάστηκαν υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού.

2. Επίδραση του είδους βιομορίων στις τελικές ιδιότητες του παραγόμενου υλικού

Ως προς την μορφολογία:

Βασικό στοιχείο για να γίνει δυνατή η σύγκριση των προϊόντων διαφορετικών πειραματικών σειρών τελικών σκονών, ως προς την επίδραση που έχει η παρουσία χιτοζάνης ή κολλαγόνου στις ιδιότητες του τελικού προϊόντος, είναι η παρατήρηση των διαφορών που προκύπτουν ως προς την μορφολογία των κόκκων. Πράγματι, μέσω TEM, επιβεβαιώθηκε ότι τόσο οι παραγόμενες δομές που συντέθηκαν παρουσία κολλαγόνου, όσο και αυτές που συντέθηκαν παρουσία χιτοζάνης έδιναν τελικά προϊόντα αποτελούμενα από ραβδόμορφους κόκκους ενώ επιβεβαιώθηκε και η παρουσία άμορφου υλικού στα τελικά προϊόντα (SAED). Μέσω TEM επιβεβαιώθηκε η μεγέθυνση των παραγόμενων βελονοειδών κόκκων σε ράβδους μεταξύ των σχηματιζόμενων κόκκων του αρχικού σταδίου (10%) και της σκόνης του τελικού προϊόντος, για τα δείγματα που παρήχθησαν υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος και παρουσία κολλαγόνου, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα δεν φάνηκε έντονη μεταβολή στο σχήμα των κόκκων του αρχικού και τελικού σταδίου. Η αντίδραση υπό το συνδυασμό συνθηκών περίσσειας οξέος και παρουσίας κολλαγόνου φαίνεται να κινήθηκε με μεγαλύτερη ταχύτητα, τόσο από τα αντίστοιχα δείγματα της χιτοζάνης, όσο και από τα αντίστοιχα δείγματα υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου που παρήχθησαν

απουσία περίσσειας, καθώς σημειώθηκε ικανή μεταβολή των διαστάσεων των κόκκων μεταξύ του αρχικού και τελικού σταδίου της αντίδρασης.

Ως προς την σταθερότητα των παραγόμενων αιωρημάτων:

Από τις μετρήσεις ζ-δυναμικού που έγιναν στα τελικά αιωρήματα αποδείχθηκε ότι η το σταθερότερο αιώρημα υπήρξε το αιώρημα υδροξυαπατίτη-κολλαγόνου που παρήχθη με περίσσεια φωσφορικού οξέος [ζ-δυναμικό ίσο με -22,1], ενώ η ύπαρξη περίσσειας και το είδος των βιομορίων δεν φάνηκε να επηρεάζει ξεκάθαρα την σταθερότητα των αιωρημάτων. Ακόμα τα δείγματα που παρήχθησαν παρουσία χιτοζάνης παρουσίασαν μεγαλύτερο τελικό ιξώδες ως προς τα αιωρήματα που παρήχθησαν παρουσία κολλαγόνου, ενώ και στις δύο περιπτώσεις η ύπαρξη περίσσειας οδηγούσε σε μείωση του ιξώδους του παραγόμενου αιωρήματος. Τα τελικά αιωρήματα επέδειξαν στο σύνολο τους θιξοτροπική συμπεριφορά.

Κατά την αντίδραση:

Από τα αποτελέσματα ανάλυσης με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR παρατηρήθηκε πώς η παρουσία χιτοζάνης ευνόησε τον σχηματισμό ανθρακικών ενώσεων σε σχέση με το κολλαγόνο, καθώς μεγαλύτερος αριθμός κορυφών οφειλόμενων σε δονήσεις της ανθρακικής ρίζας έγιναν αντιληπτές.

Η παρατήρηση των εικόνων TEM μεταξύ των δειγμάτων 10% και 100% οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η εξέλιξη της αντίδρασης έχει μεγαλύτερη ταχύτητα στην περίπτωση σύνθεσης υδροξυαπατίτη με περίσσεια φωσφορικού οξέος και παρουσία κολλαγόνου, καθώς το μέγεθος αυξάνεται αρκετά για να είναι ορατές οι διαφορές μεταξύ προσθήκης του 10% και του 100% των αντιδρώντων. Στα αντίστοιχα δείγματα που παρήχθησαν παρουσία χιτοζάνης οι κόκκοι αυξάνονται σε μέγεθος πιο αργά, με αποτέλεσμα οι διαφορές μεγέθους στις σκόνες μεταξύ των διαφορετικών σταδίων να μην γίνονται με ευκολία αντιληπτές. Μεταξύ των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν απουσία περίσσειας φωσφορικών η διαφορές των μεγεθών δεν ήταν αρκετά μεγάλες για να οδηγήσουν σε αντίστοιχο συμπέρασμα.

Γενικά παρατηρήθηκε ότι το δείγμα που παρασκευάστηκε υπό συνθήκες περίσσειας φωσφορικού οξέος, παρουσία κολλαγόνου ως το βιομόριο-υλικό αποτύπωσης, έδινε νανοκόκκους ικανοποιητικού μεγέθους, σταθερότερο τελικό αιώρημα και ευνοούσε λιγότερο τον σχηματισμό δευτερευουσών ανθρακικών ενώσεων κατά την εξέλιξη της αντίδρασης.

Βιβλιογραφία

- [1] Μπουροπούλου Ν. και Παύλου Ο. Σημειώσεις μαθήματος «Επιστήμης Υλικών IV – Βιογενή, Βιοσυμβατά Υλικά και Βιολικά» Πάτρα 2007
- [2] Μπρασινίκα Δέσποινα Διπλωματική Εργασία :«Ανάπτυξη σύνθετων επικαλύψεων ναο – υδροξυαπατίτη (ΗΑ) / βιοπολυμερών & μελέτη των ναομηχανικών ιδιοτήτων τους» Αθήνα 2008
- [3] David Avnir, Thibaud Coradin, Ovadia Lev and Jacques Livage «Recent bio-applications of sol-gel materials» *Journal Mater. Chem.*, 2006, 16, 1013–1030
- [4] K. de Groot «Bioceramics consisting of calcium phosphate salts» *Biomaterials*, 1980, 1, (1), 47-50
- [5] Καμμένου Μαρία-Ιζόλδη Διπλωματική εργασία «Σύνθεση και χαρακτηρισμός ναοσύνθετων βιολικών Υδροξυαπατίτη – Βιοπολυμερών» Αθήνα 2008
- [6] K.Hwang, Y.Lim, “Chemical and structural changes of HAp films by using a sol-gel method” *Surface and Coatings Technology*, 1999, 115,(2–3), 172–175
- [7] N. Meenakshi Sundaram, E.K. Giriya, M. Ashok, T.K. Anee, R. Vani, R.V. Suganthi, Y. Yokogawa, S. Narayana Kalkura “Crystallization of Hydroxyapatite nanocrystals under magnetic field”, *Materials Letters*, 2006, 60, (6), 761–765
- [8] Maria Vallet-Regi, Jose Maria Gonzalez-Calbet «Calcium phosphates as substitution of bone tissues» *Progress in Solid State Chemistry*, 2004, 32,(1–2)1-31
- [9] Rubin, Jusiuk, Taylor, Gan y, Apkarian “TEM analysis of nanostructure of normal and osteoporotic human tabecular bone” *Bone*. 2003 Sep; 33(3):270-82.
- [10] Amit Kumar Nayak “Hydroxyapatite Synthesis methodologies: An overview”, *International Journal of ChemTech Research*, 2010
- [11] Bouyer E, Gitzhofer F, Boulos MI. «Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2000, 11, (8), 523-531
- [12] M.P.Ferraz, F.J.Monteiro, C.M. Manuel “Hydroxyapatite nanoparticles: a review of Preparation Methodologies” *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics” Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 2004; 2: 74-80.
- [13] Li Yan, Ya ong Li, Zhao-Xiang Deng, Jin Zhuang, Xiaoming Sun «Surfactant – assisted Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods», *International Journal of Inorganic Materials*, 2001, 3, (7), 633–637d
- [14] Vladimir Privman “Mechanisms of diffusional nucleation of nanocrystals and their self assembly into uniform colloids”, Center for Advanced Materials Processing, Clarkson University, Potsdam, NY 13699 www.clarkson.edu/Privman
- [15] Koji Inoue, Kensuke Sassa, Yoshiyuki Yokogawa, Yoshio Sakka, Masazumi Okido and Shigeo Asai “Control of crystal orientation of hydroxyapatite by imposition of high magnetic field” *Materials Transactions*, 2003, 44, (6), 1133 - 1137
- [16] Jingbing Liu *et al* “Self-assembly of hydroxyapatite nanostructures by microwave irradiation” *Nanotechnology*, 2005, **16**, 82

- [17] Y.-Y. Hu, X. P. Liu, X. Ma, A. Rawal, T. Prozorov, M. Akinc, S. K. Mallapragada, and K. Schmidt-Rohr “Biomimetic self assembling Copolymer » *Chem. Mater.*,2011, 23 (9), 2481–2490
- [18] Hui Gang Zhang, Qingshan Zhu, and Yong Wang “Morfologically controlled synthesis of HAp with partial substitution of fluorine” *Chem. Mater.*, 2005, 17 (23), 5824–5830
- [19] M. Dutour Siric, Furedi Milhofer “The influence of surface active molecules on the crystallization of biominerals in solution” *Colloid interface Sci* 2006, 21;128-130:135-58
- [20] J.J.J.M. Donners, R.J.M. Nolte, N.A.J.M. Sommerdijk “Dendrimer based Hydroxyapatite composites with remarkable Material properties” , *Advanced Materials*, 2003, 15, (4), 313–316
- [21] Dimitris Tsiourvas, Athena Tsetsekou, Maria-Izoldi Kammenou, Nikos Boukos “Controlling the formation of Hydroxyapatite nanorods with dendrimers” *Journal of the American Ceramic Society*, 2011,94, (7), 2023–2029
- [22] Okamoto Y. Hidaka S. “Studies of Calcium phosphate precipitation: effects on metal ions used in dental materials” *J.Biomed Mater Res* 1994, 28 (12)1403-10
- [23] J.L.Brown “Calcium phosphate precipitation: effects of common and foreign ions on Hydroxyapatite crystal growth” *Soil Science society of America Journal* , 1981, 45, (3), 482-486
- [24] Baoquan Xie and George H. Nancollas “How to control size and morphology of apatite nanocrystals in bone” *Department of Chemistry, University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, NY 14260*, 2010, 107, (52), 22369-22370
- [25] Wikipedia arginine : <http://en.wikipedia.org/wiki/Arginine>
- [26] David Nelson, Michael Cox “Lehninger Principles of Biochemistry”, Freeman and Company, 2005
- [27] J.Koolman, K.H.Roehm, “Color atlas of Biochemistry” Thieme 2nd Edition, 2005
- [28] Αντώνη Τρακατέλη «Βιοχημεία» 2^η έκδοση, εκδοτικός οίκος: Αφών Κυριακίδη
- [29] Witte M.B.Barbul A., “Arginine Physiology and its implications for wound healing” *Wound Repair Regen* 2003, 11(6) 419-23
- [30] New World encyclopedia online <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Arginine>
- [31] Wikipedia proteins: <http://en.wikipedia.org/wiki/Protein>
- [32] Veis, Eggenberger, Cohen “The degradation of collagen. III. Characterization of Soluble Products of Mild Acid Degradation”, *Journal Am. Chem.*, 1955, 77, 2368
- [33] Okamoto Y, Heeley JD, Dogon IL, Shintani H. “Effects of phosphoric acid and tannic acid on dentine collagen” *J. Oral Rehabil.* 1991, 18(6):507-12.
- [34] Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. “Modulation of Surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery” *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005, 44 ,(2-3):65-73.

- [35] Corrado Muzzarelli, Riccardo A.A. Muzzarelli «Natural and artificial chitosan-inorganic composites» /Focused review/ Journal of inorganic biochemistry»_Journal of Inorganic Biochemistry , 2002, 92, (2), 89-94
- [36] Alberto Di Martino a,b, Michael Sittingerc, Makarand V. Risbuda «Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering» Biomaterials , 2005, 26, (30) , 5983–5990
- [37] Dominic Filion,† Marc Lavertu,† and Michael D. Buschmann* Ionization and Solubility of chitosan Solutions Related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems Biomacromolecules 2007, 8, 3224-3234
- [38] Zhishen Jia, Dong Feng Shen “ Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low molecular weight chitosane using phosphoric acid” J. Carbohydrate polymers, 2002,49 ,(4), 399-396
- [39]M.Hasegama, A.Isogai, F.Onabe, “Preparation of low molecular weight chitosan using phosphoric acid” Cellulose, 1993, 20, (4), 279-283
- [40]K.V.Harish Prashanth, N.Tharanathan, “Crosslinked Chitosan preparation and Characterization” J.Carbohydrate Research, 2006, 341, (1), 169-173
- [41] Morisson and Boyd, “Organic Chemistry” Ally and Bacon, inc 5th ed. 1987.
- [42] Brady J, Humiston G “General Cemistry – Principles and Structures” John Wiley & Sons,4th ed. 1986
- [43] C. Jeffrey Brinker, George W Scherer “Sol-gel science the physics and chemistry of sol gel processing” 1990
- [44] A. Osaka, Y. Miura, K.Takeuchi, M. Asaka and K. Takahashi “Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid” Journal of Materials Science: Materials in Medicine , 1991, 2, (1), 51-55
- [45] M.Dutour Sikiric, H.Furedi-Milhofer, “The influence of surface active molecules on the crystallization of biominerals in solution” , Advances in Colloid and Interface Science, 2006, 128 130 , 135-158
- [46] R. Despotović, N. Filipović-Vinceković and H. Füredi-Milhofer “Precipitation of calcium Phosphates from electrolytic solutions, the formation and transformation of precipitates” Calcified Tissue International , 1975,18, (1), 13-26
- [47]Wikipedia Dicalcium phosphate: http://en.wikipedia.org/wiki/Dicalcium_phosphate
- [48]_Moseke C, Gbureck U. “Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, Acta Biomater. , 2010 , 6(10):3815-23
- [49] G. M. Nancollas, M.Lore L.Perez. C. Richardson .S.J.Zawacki “Mineral Phases of Calcium Phosphate” Anat Rec. 1989 , 224(2):234-41
- [50] Fernandez, Ginebra, Driessens, Planell, Best “Calcium Phosphate Bone cements for clinical applications Part I Solution Chemistry” Journal of Materials Science: Materials in Medicine , 1999,10, (3), 169-176

- [51] Brecevic L., Furedi-Milhofer H., “Precipitation of Calcium Phosphates from electrolyte solution II The formation and transformation of the precipitates, *Calcif Tissue Res* 1972, 10 (1):82-90
- [52] P. Koutsoukos, Z. Amjad, M. B. Tomson, G. M. Nancollas “Crystallization of Calcium Phosphates. A constant composition study” *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102 (5), 1553–1557
- [53] Ljerka Brečević, Aiša Sendijarević, Helga Furedi-Milhofer “Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. VII. The influence of Di- and tricarboxylic Acids” *Colloids and Surfaces*, 1984, 11, (1–2), 55–68
- [54] P. Hartman “Crystal growth: an introduction” North-Holland Publishing Co., 1973
- [55] Διαργασίες διαχωρισμού μάθημα 5 www.chemeng.upatras
- [56] S. Koutsopoulos “Kinetic study on the crystal growth of hydroxyapatite” *American Chemical Society, Langmuir*, 2001, 17 (26), 8092–8097
- [57] Bruno Jirgensons, d. Van Nostrand, “Organic colloids” *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80 (18), 5008–5008
- [58] Sol-gel science the physics and chemistry of sol gel processing
<http://books.google.co.uk/books?hl=en&lr=&id=V2vRvsTaCwMC&oi=fnd&pg=PR11&dq=sol+gel+fundamentals&ots=WMCZhR7jBT&sig=2R1cmRWMFhE3XmWPS8C9IVYDrvY#v=onepage&q=sol%20gel%20fundamentals&f=false>
- [59] B. Xie, G. Nancollas., “How to control the size and morphology of apatite nanocrystals in bone” *Proc Natl Sci USA*, 2010, 107(52):22369-70
- [60] Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. «Matrix macromolecules in hard Tissue control the nucleation and hierarchical Assembly of Hydroxyapatite» , *J Biol Chem*. 2007 ,282(2):1193-204
- [61] B. J. Tarasevich, C. C. Chusuei, and D. L. Allara “Nucleation and growth of calcium phosphate from physiological solutions on to self assembled templates by a solution-formed nucleus mechanism” *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107 (38), 10367–10377
- [62] Masanori Kikuchi, Soichiro Itoh, Shizuko Ichinose, Kenichi Shinomiya, Junzo Tanaka “Self-organisation mechanism in a bone-like hydroxyapatite collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo” *Biomaterials*, 2001, 22, 1705-1711
- [63] Akari Takeuchi, Chikara Ohtsuki, Toshiki Miyazaki, Masanobu Kamitakahara, Shin-ichi Ogata, Masao Yamazaki, Yoshiaki Furutani, Hisao Kinoshita, and Masao Tanihara “Heterogenous nucleation of Hydroxyapatite on protein: structural effect of silk sericin” *J R Soc Interface*, 2005 , 2(4): 373–378.
- [64] Jens-Hilmar Bradt, Michael Mertig, Angelika Teresiak, and Wolfgang Pompe “Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation” *Chem. Mater.*, 1999, 11 (10), 2694–2701
- [65] Iijima MY, Moriwaki Y, Yamaguchi R, Kuboki Y. “Effect of Solution pH on the Calcium Phosphates Formation and Ionic Diffusion on and through the Collagenous Matrix” *Connect Tissue Res*. 1997; 36 (2):73-83.

[66] Hermann Ehrlich, Timothy Douglas, Dieter Scharnweber, Thomas Hanke, René Born, Susanne Bierbaum, Hartmut Worch Prof. Dr.-Ing. habil. “Hydroxyapatite Crystal Growth on Modified Collagen I-Templates in a Model Dual Membrane Diffusion System” Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie (ZAAC) , 2005, 631, (10) , 1825–1830

[67] Wanpeng Cao, Larry L. Hench, “Bioactive materials”, Ceramics International, 1996, 22, I (6), 493-507

[68] Liu, Huang, Shen, Cui “Kinetics of Hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11”, Biomaterials, 2001, 22, (4), 301-306

[69] G.H. Nancollas, B. Tomazic, “Growth of Calcium Phosphate on Hydroxyapatite crystals- Effect of supersaturation and Ionic medium” , J. Phys. Chem. 1974, 78(22), 2218-2225

[70] Γ. Χρυσουλάκης, Δ. Παντελής «Επιστήμη και τεχνολογία μεταλλικών υλικών», Εκδόσεις Παπασωτηρίου, 2003

[71] Όξενκιουν-Πετροπούλου «Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης-Φασματομετρικές Μέθοδοι» εκ. Συμμετρία, 2006

[72] Zeta Potential Theory,
<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>
Cornell University

[73] <http://www.qclabequipment.com/viscosity.html>

[74] J. Totjova, V. Lisy, “Relaxation times of flexible polymer chains in solution from non conventional viscosity measurements” , The Open Macromolecules Journal, 2010, 4, 26-31

[75] Suzuki, T., Yamamoto T et al, “Surface instability of Calcium phosphate ceramics in tissue culture, medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells” , J. Biomed. Mater. Res 1997 15;34(4): 507-17

[76] L. Chen, J.M. Mccrate, J.C.M. Lee, H. Li, “The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells” Nanotechnology, 2011 , 22 , 105 708 (10pp)

[77] Saifuddin Jailani, G.V. Franks, T.W. Healy “Zeta Potential of nanoparticle suspensions: Effect of electrolyte concentration, particle size and volume fraction” J. Am. Ceram. Soc., 2008, 91 [4] 1141-1147

[78] Barbani N. Guerra G.D., Cristallini et al “Hydroxyapatite/gelatin/gellan sponges as nanocomposites scaffolds for bone reconstruction” J. Mater. Sci. Mater. Med., 2012, 23(1) 51-61

[79] Slosarczyk, Paluszkiewicz, Gawlicki, Paszkiewicz. “The FTIR spectroscopy and QXRD studies of calcium phosphate based materials produced from powder precursors with different Ca/P ratios.” Ceramics International, 1997, 23, (4) , 297-304

[80] Slosarczyk, Paluszkiewicz, Gawlicki. “FTIR and XRD evaluation of carbonated Hydroxyapatite powders synthesized by wet methods” Journal of molecular structure, 2005, 744-747, 667-661

[81] Raynands, Champion, Bernache-Assollant, Thomas, “Calcium Phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I Synthesis, Characterization and thermal stability of powders” *Biomaterials*, 2002, 23(4)1065-1072

[82] Gesa Behrens, Liisa T.Kuhn, Rick Uvic and Arthur H.Heuer, “Raman Spectra of Vateritic Calcium Carbonate, *Spectroscopy Letters*, 1995, 28 (6), 983-995

[83] R. Štulajterová, L. Medvecký, “Effect of calcium ions on transformation brushite to hydroxyapatite in aqueous solutions”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, 316, (1–3), 104–109.

[84] Anbalagan Balamurugan, Jean Michel, Joel Faure, Hicham Benhayoune, Laurence Wortham, Ganesh Sockalingum, Vincent Banchet, Sylvie Bouthors, Dominique Laurent-Maquin, Gerard Balossier « Synthesis and Structural Analysis of sol gel derived stoichiometric monophasic hydroxyapatite *Ceramics – Silikáty*, 2006, 50 (1) 27-31

[85] Ruixin Dong, Xunling Yan, Xiaofeng Pang Shenggang Liu “Temperature – dependent Raman spectra of Collagen and DNA” , *Spectrochimica Acta Part A* , 2004, 60, 557-561

[86] Kai Zhang, Dieter Peschel, Johanna Helm, Thomas Groth, Steffen Fischer , “FT Raman Investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity” *Carbohydrate Polymers*, 2011 , 83 , 60-65

[87]N.J.Crane, V.Popescu, M.D. Morris, P.Steenhuis, Iquelzi M.A.,“Raman Spectroscopic Evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembraneous mineralization“ *Bone*, 2006, 39(3) 434-42

[88] Robert H. Bogue, “Conditions Affecting the hydrolysis of collagen to gelatin” *Lafayette college Easton P.A. Industrial and engineering Chemistry*, 1923, 15, (11) , 15 (11), 1154–1159

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Βάου Βασιλική Μηχανικός Μεταλλείων - Μεταλλουργός Μηχανικός ΕΜΠ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Ονοματεπώνυμο: Βάου Βασιλική
- Τόπος γέννησης: Αθήνα
- Έτος γέννησης: 1986

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2010: Δίπλωμα Μηχανικού Μεταλλείων - Μεταλλουργών Μηχανικών Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.
Κατεύθυνση: Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών
Διπλωματική Εργασία: «Αφρώδη Θερμομονωτικά Ανόργανα Πολυμερή Υλικά από Περίληψη», Υπεύθυνος Καθηγητής: Επ. Καθηγ. Δ. Πάνιας
- Σεπτέμβριος 2010 - σήμερα: Φοιτήτρια στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών» που συντονίζει η Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Ερευνητικά καθήκοντα στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου με τίτλο: «Βιομημητική Σύνθεση Σύνθετων Βιοκεραμικών Νανοϋδροξυαπατίτη παρουσία βιοπολυμερών- μελέτη και έλεγχος δομής και ιδιοτήτων» από 1/9/2010 μέχρι 31/8/2011 (12 μήνες).

ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

- 3/7/2006 έως 3/8/2006: Πρακτική Άσκηση στα Εργαστήρια Μπετονίτη της S&B Βιομημητικά Ορυκτά.
- 14/7/2008 έως 17/11/2008: Πρακτική Άσκηση στον Τομέα Ειδικών Διεργασιών και Εργαστηρίων της Διεύθυνσης Μελετών Υποστήριξης Παραγωγής της Ελληνικής Αεροπορικής Βιομημηχανίας.
- 21/5/2009 έως 20/11/2009: Πρακτική Άσκηση στα Κεντρικά Εργαστήρια Δημοσίων Έργων της Γενικής Διεύθυνσης Ποιότητας Δ.Ε. του Υπουργείου Υποδομών, Μεταφορών και Δικτύων.

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Άριστη Γνώση Αγγλικής Γλώσσας
- Certificate of Proficiency in English of the University of Cambridge
- Μέτρια Γνώση Γαλλικής Γλώσσας

- Παρακολούθηση μαθημάτων Γαλλικής Γλώσσας στη Μέση Εκπαίδευση/ Delf 1-Diplôme d'études en langue Francaise - 1er degré, Unite A1, Unite A2

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΕΣ

Πολύ καλή γνώση: Microsoft Office σε περιβάλλον Windows, Internet, Autocad κ.α.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- V.Vaou, D.Panias , “Thermal insulating foamy geopolymers from perlite”, Minerals Engineering, 23 [14] (2010) p. 1146-1151.