

# STUDII PRELIMINARE DE BIOCOMPATIBILITATE A OXIDULUI DE FIER ACOPERIT CU HIDROXIAPATITĂ PRELIMINARY BIOCOMPATIBILITY STUDIES OF HYDROXYAPATITE COATED IRON OXIDE

ECATERINA ANDRONESCU<sup>1</sup>, CARMEN STELUȚA CIOBANU<sup>1,2</sup>,  
LIVIA PALL<sup>1,3</sup>, MARIETA COSTACHE<sup>4</sup>, DANIELA PREDOI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universitatea POLITEHNICA București, Str. G. Polizu nr. 1, sect. 1, 011061 București, România

<sup>2</sup>Institutul Național pentru Fizica Materialelor, 077125, Măgurele, România,

<sup>3</sup>Institutul de Chimia Materiei Condensate din Bordeaux CNRS UPR 9048, 87 Avenue du Docteur Albert Schweitzer,  
33608 Pessac cedex Franța

<sup>4</sup>Centrul de Biologie Moleculară, Universitatea din București, Splaiul Independenței nr. 91-95, 76201, București, România

Compozitele bioceramice sunt obținute prin combinarea a două componente biocompatibile, spre exemplu - în studiul nostru - hidroxiapatita și nanoparticulele de oxid de fier. Metoda de obținere influențează puternic atât forma și dimensiunile particulelor de oxid de fier, cât și chimia suprafeței acestora și implicit proprietățile lor magnetice.

Probele au fost caracterizate prin difracție de raze X și spectroscopie în infraroșu. Comportarea termică a fost studiată prin analiză termică complexă. Aceste tehnici de caracterizare au confirmat prezența hidroxiapatitei pe suprafața magnetitei. Pentru determinarea proliferării celulare, viabilității și citotoxicității interacției celulelor cu pulberile s-au utilizat celule osteoblaste. Acestea au arătat o bună comportare in-vitro.

Bioceramic composites were obtained by combining two biocompatible components (by example - in our studies - hydroxyapatite and iron oxide nanoparticles). The preparation method determines the particle size and shape, the size distribution, the surface chemistry of the iron oxide particles and consequently their magnetic properties.

The samples were analysed by X-ray diffraction and IR spectroscopy. Their thermal behaviour was studied by thermogravimetric and thermodifferential analysis. These characterization techniques confirmed the presence of hydroxyapatite on the magnetite surface. Osteoblast cell cultures were used to determine cell proliferation, viability and cytotoxicity on interaction with the samples. The cultures displayed good in vitro behaviour.

**Keywords:** Nanoparticles, Iron oxide, Hydroxyapatite, Biocomposites, Cell viability, Cell culture

## 1. Introducere

Bioceramicile feromagnetice sunt utilizate pentru tratamentul hipertermic al cancerului osos [1-10]. Aplicații reale ale acestor materiale obținute prin metode sintetice, controlând dimensiunea și morfologia particulelor feromagnetice sunt utilizate frecvent în prezent în științele vieții.

Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , (HAp), a fost studiată datorită excelenței sale biocompatibilități și bioactivității [11]. Experimentele *in vivo* au confirmat avantajele bioceramicelor cu structură poroasă pentru implanturile ortopedice. Hidroxiapatita a fost utilizată în implanturile dentare și ortopedice pentru a ajuta creșterea țesutului osos natural, la interfața implant-țesut viu. Cu toate acestea, ceramicele sub formă de bulk (corp masiv) au o rezistență mecanică slabă. Pe de altă parte, atunci când este utilizată sub formă de filme subțiri pe implanturi metalice cu proprietăți mecanice bune, hidroxiapatita asigură biocompatibilitatea și bioactivitatea suprafeței în contact cu țesutul viu. Progresele recente din sinteza hidroxiapatitei, a biosticlelor și oxizilor de fier includ depunerea electroforetică [12], depunerea laser pulsată

## 1. Introduction

Ferromagnetic bioceramics are used in the hyperthermic treatment of bone cancer [1-10]. Real-life applications of these materials obtained by synthetic routes, controlling particle size and morphology are frequently used in life sciences nowadays.

Hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HAp) has been studied because of its excellent biocompatibility and bioactivity [11]. *In vivo* experiments have confirmed the advantages of a bioceramic with porous structure for tissue ingrowth. Hydroxyapatite has been used in dental and orthopaedic implants to promote the growth of natural bone onto the prostheses. However, bulk ceramic has poor mechanical wear. On the other hand, when used as a thin film on metallic implants with good mechanical properties, hydroxyapatite ensures the biocompatibility and bioactivity of the surface in contact with the human body. Recent progress in the synthesis of hydroxyapatite, bioactive glass and iron oxides includes electrophoretic deposition [12], pulsed laser deposition [13-15], mechanochemistry [16-21], sol-

\* Autor corespondent/Corresponding author,  
Tel.: +40 21 369 01 70, e-mail: dpredoi@ifim.ro

[13-15], mecanochimia [16-21], metoda sol-gel [22-25], precipitarea chimică [26-27], și metoda hidrotermală [28-29].

Structura apatitei este flexibilă în gama de elemente substituționale  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , Mg, Si etc. De asemenea, în lucrarea anterioară a autorilor [30] s-a arătat că introducerea ionilor feroși pe parcursul sintezei a produs o structură apatitică [31].

În acest studiu, nanoparticulele de oxid de fier au fost sintetizate prin metoda coprecipitării. Pulberea de hidroxiapatită (HAp) și nanoparticulele de oxid de fier au fost măcinate și sinterizate la  $800^{\circ}\text{C}$ . În plus, proprietățile structurale ale nanoparticulelor de oxid de fier acoperite cu hidroxiapatită au fost studiate prin difracție de raze X, spectroscopie FTIR, și analize termice complexe. Lucrarea de față are drept scop investigarea influenței nanoparticulelor de oxid de fier acoperite cu hidroxiapatită asupra celulelor *in vitro*.

## 2. Parte experimentală

### a) Prepararea probelor

Nanoparticulele de oxid de fier au fost preparate după cum urmează: clorura feroasă tetrahidrată ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) în soluție de HCl 2M și clorura ferică hexahidrată ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) au fost amestecate la temperatura camerei ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 1/2$ ) [32-33]. Amestecul a fost adăugat în picături în 200 ml soluție de NaOH 1,5M sub agitare viguroasă timp de 60 min. Precipitatul rezultat a fost izolat în câmp magnetic. Precipitatul a fost spălat cu apă deionizată purificată și centrifugat cu 8000 rot/min. După repetarea de două ori a ultimei proceduri s-au adăugat 200 ml de soluție HCl 0,02M în precipitat sub agitare continuă. Produsul a fost separat prin centrifugare (8000 rpm) și uscat la  $40^{\circ}\text{C}$ .

Pulberea de HAp comercială (90%) și (nano)particulele de oxid de fier (10%) au fost măcinate timp de 5 ore cu 250 rot/min în mediu uscat. Pulberea obținută a fost apoi tratată termic la  $800^{\circ}\text{C}$  timp de 2 ore (proba M13).

### b) Caracterizarea probelor

Probele au fost caracterizate prin difracție de raze X (DRX) cu un difractometru Philips PW1050 utilizând radiația incidentă  $\text{CuK}_\alpha$ . S-a realizat o estimare a dimensiunii medii a cristalitelor cu ajutorul formulei lui Scherrer.

Studiile de spectroscopie IR s-au efectuat în domeniul  $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  utilizând un spectrometru FTIR Spectrum BX. Probele deshidratate la temperatura camerei au fost pastilate cu KBr uscată.

Analiza termică complexă - diferențială și analiza termogravimetrică s-a realizat utilizând un derivatograf Shimadzu DTG-TA-50 și analizor DTA 50, în domeniul de temperatură  $25\text{ - }800^{\circ}\text{C}$ , în aer, creuzet de platină și etalon  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

gel deposition [22-25], chemical precipitation [26-27], and hydrothermal method [28-29].

The apatite structure is relatively flexible in the range of  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , Mg, Si substitution elements. Previous work [30] indicates that the inclusion of ferrous ions during synthesis produces an apatite structure [31].

In this study, iron oxide nanoparticles were synthesized using the coprecipitation method. The hydroxyapatite (HAp) powder and iron oxide nanoparticles were milled and sintered at  $800^{\circ}\text{C}$ . In addition, the structural properties of iron oxide nanoparticles coated with hydroxyapatite were studied using X-ray diffraction, IR spectrometry (FT-IR) and DTA / TG analysis. This paper aims at investigating the influence of hydroxyapatite-coated iron oxide nanoparticles on cells *in vitro*.

## 4. Experimental

### a) Sample preparation

Iron oxide nanoparticles were prepared according to the following procedure: ferrous chloride tetrahydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) in 2M HCl solution and ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) were mixed at room temperature ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 1/2$ ) [32-33]. The mixture was added dropwise over 60 min to 200 ml of 1.5M NaOH solution under vigorous stirring. The precipitate was washed in deionised water and centrifuged at 8000 rot/min. After repeating the latter procedure two times, 0.02M HCl solution (200 ml) was added to the precipitate with continuous stirring. The product was separated by centrifugation (8000 rpm) and dried at  $40^{\circ}\text{C}$ .

HAp commercial powder (90 wt%) and iron oxide (nano)particles (15 wt%) were milled for 5 hours at 250 rot/min in a dry environment. The powders obtained were then thermally treated at  $800^{\circ}\text{C}$  for 2 hours (sample M13).

### b) Sample characterization

The samples were characterized by X-ray diffraction (XRD) with a Philips PW1050 X-ray powder diffractometer using  $\text{CuK}_\alpha$  incident radiation. An estimation of crystallite sizes was done from the width of the diffraction using the Scherrer formula.

IR spectroscopic studies were performed in the range  $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  using a FTIR Spectrum BX spectrometer. The samples were dehydrated at room temperature and pelleted with dried KBr.

Differential Thermal Analysis and Thermal Gravimetric Analysis were performed using the Shimadzu DTG-TA-50 and DTA 50 analyser, in the  $25\text{ - }800^{\circ}\text{C}$  temperature range, air environment, and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  standard.

### c) Cell culture

Osteoblasts were grown in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) with 10%

### c) Cultura de celule

Osteoblastele au fost crescute în Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) adăugând 10% ser foetal bovin, DMEM sodium pyruvate, 2% glutamină și antibiotice. Mediul de cultură a fost cumpărat de la Gibco (UK). Celulele au fost incubate la 37°C, 5% CO<sub>2</sub> și împărțirea a fost efectuată utilizând soluție de tripsină-EDTA 1x (Sigma-Aldrich) și soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) de la Gibco.

Osteoblastele folosite pentru a determina proliferarea celulară, viabilitatea și citotoxicitatea prin interacție cu proba bioceramică M13, au fost obținute din partea superioară a femurului pacientului. Pacientul a suportat o intervenție chirurgicală pentru artrită atunci când s-a îndepărtat articulația șoldului.

Cultura de osteoblaste primare de la explanturile osoase a fost proiectată în concordanță cu protocolul Gallagher [34-35]. Bucățile de țesut osos au fost transferate în recipiente sterile cu PBS. Țesutul obținut este detașat de pe țesutul conjunctiv moale de la suprafața externă a osului. Țesutul este clătit în PBS steril și izolat în cutii Petri care conțin un volum mic de PBS steril, proporțional cu dimensiunea bucăților.

Următorul pas a fost acela de a plasa fragmentele explantate în DMEM cu aport de antibiotice, prin spălări succesive cu soluție de antibiotic, cultivate în mediu DMEM livrat cu 15% Bovine Serum Albumin (BSA), 2% glutamine și tamponate cu bicarbonat de sodiu.

Primele osteoblaste din explanturi apar după 7-10 zile de incubare (atmosfera 5% CO<sub>2</sub>, T=37°C) și sunt potrivite pentru dividere după 4-6 săptămâni; după al doilea pasaj, cultura conține doar celule osteoblaste. Dividerile ulterioare au loc la confluență (2 x 10<sup>6</sup> celule/placă) în aproximativ 10 zile, cu un raport de 1:3. Culturile de confluență au fost tratate cu tripsină timp de 2-3 minute și apoi centrifugate cu 1500 rpm timp de 10 min. Celulele au fost re-suspendate într-un volum minim de DMEM, și numărate cu o cameră Bürker-Türk și distribuite uniform pe suporti sterili tratați în prealabil cu polilisină.

### d) Viabilitatea celulelor

Testarea biocompatibilității probei M13 (bioceramică) a fost efectuată utilizând o linie de celule osteoblaste primare. După obținerea culturii de osteoblaste, celulele au fost tratate cu tripsină 0,05% și divizate în cutii Petri de 35/35 mm.

Osteoblastele au fost semănate cu o densitate de 10<sup>5</sup> celule/ml în cutii Petri și incubate cu proba M13 timp de 2, 4, 12 și 24 ore. Viabilitatea celulelor a fost determinată cu testul de reducere MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide). Celulele au fost incubate (atmosfera 5% CO<sub>2</sub>, T=37°C) timp de 4h cu MTT (0,1 mg/ml).

foetal bovine serum, sodium pyruvate, 2% glutamine and antibiotic mix ; the reagents were purchased from Gibco (UK). The cells were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and the split was performed using trypsin-EDTA solution 1x (Sigma-Aldrich) and phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco).

Osteoblasts used to determine the cell proliferation, viability and cytotoxicity interaction with samples M13 bio ceramics were obtained from the upper part of the patient's femur. The patient underwent a surgical procedure for arthritis, in which the hip joint was removed.

Primary osteoblast culture from bone explants was designed according to Gallagher protocol [34-35]. The pieces of bone tissue are transferred into a sterile recipient with PBS. The tissue obtained is detached from the soft conjunctive tissue of the external bone surface. The tissue is rinsed in sterile PBS and isolated in Petri dishes containing a small volume of sterile PBS, proportional to the size of the pieces.

The next step was to place the explant fragments in DMEM with antibiotics: the explants were washed successively with antibiotic solutions, cultivated in DMEM supplied with 15% Bovine Serum Albumin (BSA), 2% glutamine and buffered with sodium bicarbonate.

The first osteoblasts arise from explants after 7-10 days of incubation (5% CO<sub>2</sub> atmosphere, T=37°C) and are suitable for splitting after 4-6 weeks; after the second passaging process, the culture contains strictly osteoblast cells. Subsequent splits were performed at 100% confluency (2 x 10<sup>6</sup> cells/plate) in about 10 days, with a 1:3 ratio. Confluent cultures were treated with trypsin for 2-3 min and then centrifuged at 1,500 rpm for 10 min. The cells were re-suspended in minimal DMEM volume, counted in a Bürker-Türk chamber and evenly distributed on sterile supports, previously treated with polylysine.

### d) Cell viability

The biocompatibility test of sample M13 (bioceramic) was performed on a primary osteoblast cell line. After the osteoblast culture was established, the cells were treated with trypsin 0,05% and split in 35/35 mm Petri dishes.

Osteoblasts were seeded at a density of 10<sup>5</sup> cells/ml in Petri dishes and incubated with M13 bio ceramics for 2, 4, 12 and 24 hours. The cell viability was determined by MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) reduction test. The cells were incubated (5% CO<sub>2</sub> atmosphere, T=37°C) for 4h with MTT (0.1 mg/ml).

## 3. Results and discussions

XRD patterns of the hydroxyapatite (HAp) coated iron oxide nanoparticles (sample M13), as

### 3. Rezultate și discuții

Spectrul de difracție de raze X al nanoparticulelor de oxid de fier acoperite cu hidroxiapatită (HAp) - proba M13, reprezentat în figura 1, arată prezența unor picuri ce corespund oxidului de fier și amestecului HAp și  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -tricalciu fosfat). Aceasta confirmă faptul că stoichiometria HAp influențează foarte mult stabilitatea termică, și anume HAp nestoichiometrică se descompune ușor în  $\beta$ -TCP după tratarea termică la 800°C [36-39]. Dimensiunea medie a particulelor este de 18 nm.

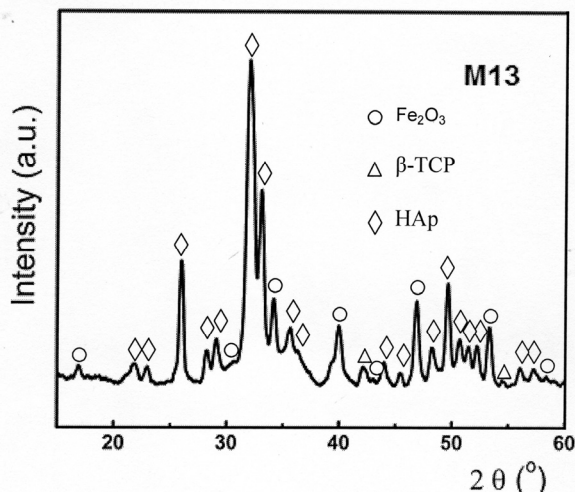
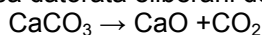


Fig. 1 - Spectrul difracției de raze X pentru proba a M13/X-Ray diffraction pattern of sample M13.

Fixarea HAp la suprafața particulelor a fost confirmată de spectroscopia FTIR. Spectrele infraroșu ale probei M13 (fig. 2) arată benzi caracteristice vibrației magnetitei ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) și ale HAp [40-43]. Benzile de la 550-600  $\text{cm}^{-1}$  pot fi atribuite  $\text{M}_{\text{Th}}\text{-O-M}_{\text{Oh}}$  ( $\nu_1$ ) și ionilor  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_4$ ). Umărul de la 960  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ) și banda de la 1040  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) pot fi atribuite ionilor  $\text{PO}_4^{3-}$ . Vibrațiile asociate vibrației legăturii de hidrogen din apa adsorbită la suprafață sunt la 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Banda de la 1419  $\text{cm}^{-1}$  se datorează vibrațiilor ionilor  $\text{CO}_3^{2-}$ . Prezența carbonului în probele comerciale indică faptul că și carbonul este o impuritate în procesul de obținere în aceste probe, impuritate care nu a fost detectată prin difracție de raze X.

În figura 3 este redată analiza termică complexă (curbele DTA/TG) pentru proba M13. Pierderea de masă din domeniul 100°C - 400°C poate fi atribuită pierderii apei din rețea [37-39, 44-45]. Descreșterea treptată în masă de la 400°C la 800°C este probabil rezultatul eliminării grupărilor carbonat legate de HAp, a căror prezență a fost confirmată prin FTIR [46]. Descompunerea carbonatului de calciu este marcată pe curbele termale de un efect endotermic (760°C). Acest efect este urmat de o pierdere de masă datorată eliberării de  $\text{CO}_2$ .



shown in Figure 1, exhibit phase peaks corresponding to iron oxide and a mixture of HAp and  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -tricalcium phosphate). This confirms that the stoichiometry of HAp determines to a great extent its thermal stability, i.e. non-stoichiometric HAp readily decomposes to  $\beta$ -TCP upon heat treatment at 800°C [36-39]. The average nanoparticle size is 18 nm.

The attachment of HAp on the particle surface was confirmed by FTIR spectroscopy. The infrared spectra of sample M13 (Figure 2) show the vibration modes of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and HAp [40-43].

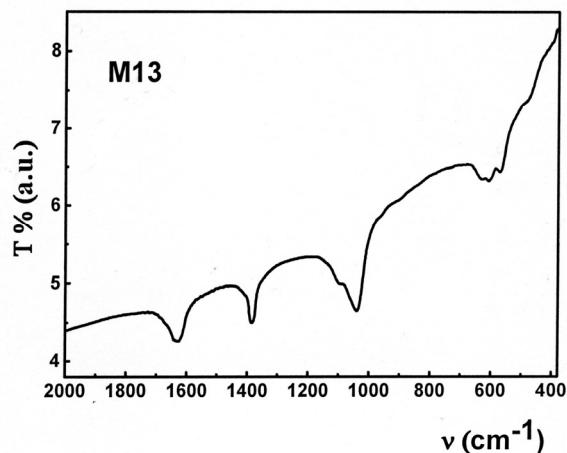


Fig. 2 - Spectrul FTIR al nanoparticulelor de oxid de fier acoperite cu hidroxiapatita: proba M13/IR spectra of iron oxide coated with hydroxyapatite: sample M13.

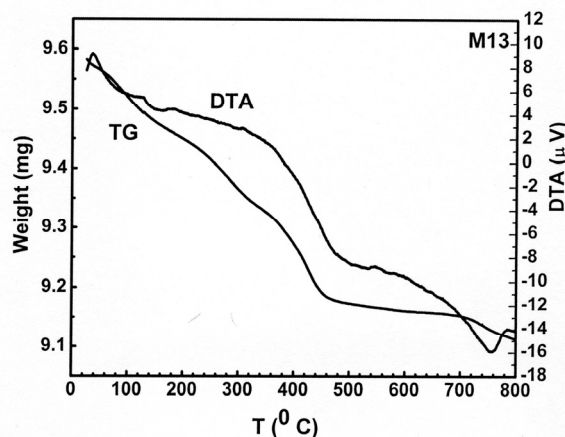


Fig. 3 - Curbele evoluției DTA/TG pentru proba M13/The DTA/TG evolution curves for sample M13.

The bands at 550-600  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to  $\text{M}_{\text{Th}}\text{-O-M}_{\text{Oh}}$  ( $\nu_1$ ) and  $\text{PO}_4^{3-}$  ions ( $\nu_4$ ). The shoulder at 960  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ) and the band at 1040  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) can be attributed to  $\text{PO}_4^{3-}$  ions. Vibrations associated to the vibration of hydrogen bonds in water molecules adsorbed on the surface are at 1640  $\text{cm}^{-1}$ . The band at 1419  $\text{cm}^{-1}$  is caused by the vibrations of  $\text{CO}_3^{2-}$  ions. The presence of carbon modes in commercial samples is an indication that carbon is an impurity in this sample due to the preparation

S-a observat că pierderea de masă pentru proba M13 a fost de 2%.

Testul MTT este un test de laborator și un test colorimetric standard (un test care măsoară modificările în culoare) utilizat pentru măsurarea proliferării celulare (creșterea celulară). Este de asemenea folosit pentru a determina citotoxicitatea potențialilor agenți medicinali și a altor materiale toxice.

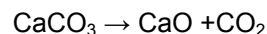
MTT galben (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, tetrazole) este redus la formazan mov în mitocondria celulelor vii. Se adaugă o soluție de solubilizare (isopropanol) pentru a dizolva formazanul mov insolubil produs într-o soluție colorată. Absorbanța acestei soluții colorate poate fi cuantificată prin măsurarea la o anumită lungime de undă (în general între 500 și 600 nm) cu un spectrofotometru.

Această reducere are loc numai atunci când enzimele mitocondriale reducătoare sunt active, și prin urmare conversia este direct legată de numărul celulelor viabile (vii). Când cantitatea de formazan mov produs de celulele tratate cu agent este comparată cu cantitatea de formazan produs de către celulele netratate (celule de control), eficacitatea agentului care provoacă moartea celulelor poate fi dedus, prin trasarea unei curbe doză-răspuns.

Rezultatele obținute după efectuarea testului MTT (tabelul 1) arată faptul că, proba martor prezintă una dintre cele mai mari valori (0,298575). Această valoare este, de asemenea, stabilită de intensitatea puternică a culorii probei martor (mov intens), datorată cantității de formazan produs de celule.

process; these impurities were not detected by X-ray diffraction analysis.

Figure 3 shows the DTA/TGA plot of sample M13. The weight loss between 100°C and 400°C can be attributed to the loss of water in the lattice [37-39, 44-45]. The gradual decrease in weight from 400°C to 800°C is probably a result of the elimination of the carbonate radicals linked to HAp, the presence of which has been confirmed by FTIR analysis [46]. The decomposition of calcium carbonate is marked on the thermal curves by an endothermic effect (760°C). This effect is followed by a loss in weight due to CO<sub>2</sub> release.



Weight loss observed in sample M13 is 2%.

MTT assay is a laboratory test and standard colorimetric assay (an assay which measures changes in colour) for measuring cellular proliferation (cell growth). It is used to determine cytotoxicity of potential medicinal agents and other toxic materials. Yellow MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) is reduced to purple formazan in the mitochondria of living cells. A solubilisation solution (isopropanol) is added in order to dissolve the insoluble purple formazan produced into a coloured solution. The absorbance of this coloured solution can be quantified by spectrophotometry measurements at a certain wavelength (usually between 500 and 600 nm).

This reduction only takes place when mitochondrial reductase enzymes are active;

Tabelul 1

Valoriile absorbanței la 595 nm pentru substratul M13/ Absorbance values at 595 nm for M13 substrate

Probe / Samples	DO <sub>595nm</sub>	Viabilitatea / Viability (%)
Control	0.298575	100
M13 – 2 h	0.1676	46.1325
M13 – 4 h	0.2018	57.4271
M13 – 12 h	0.30245	92.1534
M13 – 24 h	0.38606	114.1245

Nota : DO<sub>595</sub> reprezintă lungimea de undă la care s-a efectuat măsurătoarea/The DO<sub>595</sub> represents the wavelength at which the measurement was made.

În cazul substratului M13, studiul arată că, în acest caz, creșterea celulelor osteoblaste incubate timp de 24 h prezintă un pic mai pronunțat, iar cele incubate timp de 2h au un pic mai mic. Valoarea absorbanței (0,298) pentru proba martor este mai mare față de cea a celulelor incubate pe substratul bioceramic M13 timp de 2 și 4 h, este comparabilă cu cea a celulelor incubate pe substratul bioceramic M13 timp de 12 h dar mai mic față de cea a celulelor crescute pe același substrat timp de 24 h (tabelul 1).

Celulele osteoblaste incubate pe aceeași bioceramică pentru 2 și 4 h prezintă o inhibare a creșterii și o scădere a viabilității față de proba

therefore the conversion is directly related to the number of viable (living) cells. When the amount of purple formazan produced by cells treated with an agent is compared with the amount of formazan produced by untreated (control) cells, the effectiveness of the agent causing cell death can be deduced by tracing a dose-response curve.

MTT assay results (Table 1) have revealed that the control sample value (0.298575) is among the highest. This value is also established by the high-intensity colour (deep purple) of the control sample due to the amount of formazan produced by cells.

martor (100%). Este interesant că după 2h de expunere a bioceramicii M13 și diminuarea proliferării celulelor osteoblaste (46,13%), s-a observat o tendință de creștere liniară a viabilității și a proliferării, după 4h (57,42%) și 12 h (92,15), care este proporțională cu intervalul de expunere (fig. 4). Pentru 24 h (114,12%) s-a detectat o proliferare mai puternică față de proba martor. Acest efect poate fi datorat adaptării celulelor la interacția cu bioceramicile.

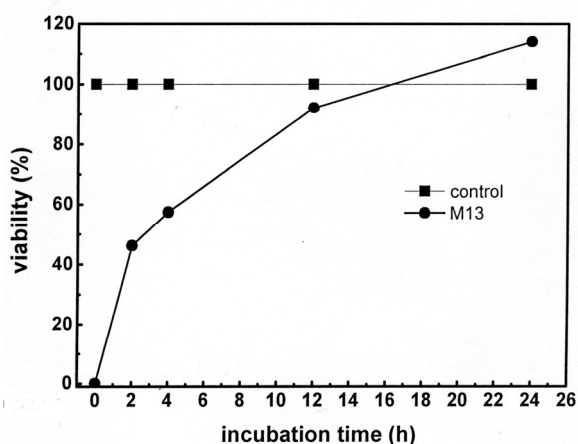


Fig. 4 - Testul MTT pentru celulele osteoblaste incubate pe substratul M13/ MTT assay for osteoblast cells incubated on substrate M13.

#### 4. Concluzii

Nanoparticulele de oxid de fier au fost obținute prin coprecipitare. Au fost studiate proprietățile nanoparticulelor de oxid de fier acoperite cu hidroxiapatită. Absorbția hidroxiapatitei pe suprafața nanoparticulelor de oxid de fier a fost evidențiată prin spectroscopie FTIR și confirmată de analiza termogravimetrică. Configurația de microcelule (bioceramice) făcută de hidroxiapatita dopată cu magnetită nanometrică poate fi un suport potrivit pentru aderarea și proliferarea celulelor osteoblaste, fără a avea loc o modificare a structurii sau funcției celulelor osteoblaste.

Testul citotoxic arată că celulele incubate pe substratul M13 modifică parametrii de creștere, cauzând creșterea sau scăderea proliferării și viabilității față de proba martor. Astfel timpul de expunere (2, 4, 12 sau 24 h) este un factor important care afectează creșterea celulelor osteoblaste, acest lucru permițându-ne să cuantificăm principalul interval și orele precise pentru proliferarea și creșterea celulară. Substratul M13 oferă o biocompatibilitate superioară și poate reprezenta un important substrat bioceramic pentru obținerea de suporti medicali biocompatibili.

#### Mulțumiri

Lucrarea a fost susținută financiar de

In the case of M13 bioceramic substrate, the study reveals that osteoblast cell growth after 24 hours presents a higher peak compared to that of cells incubated for 2 hours. Absorbance (0.298) in control sample is higher compared to that of cells incubated on M13 bioceramic for 2 and 4 hours, is comparable to the absorbance of cells incubated on M13 bioceramic for 12 hours but lower than that of cells grown on the same substrate for 24 hours (Table 1).

The osteoblast cells incubated on the same bioceramic substrate for 2 and 4 hours presented growth inhibition and a decrease in viability, compared to control (100%). Interestingly, after 2 hours of exposure of M13 bioceramic and the decrease in proliferation of osteoblast cells (46.13%), we observed a tendency of linear increase in viability and proliferation (57.42%) after 4 hours and (92.15%) after 12 hours, which is proportional to the exposure interval (Figure 4). For 24 hours (114.12%) we detected a higher proliferation when compared to control. This effect might be due to cell adaptation at the interaction with bioceramics.

#### 4. Conclusions

Iron oxide nanoparticles have been prepared by coprecipitation. The properties of iron oxide nanoparticles coated with hydroxyapatite have been investigated. The adsorption of hydroxyapatite on the surface of iron oxide nanoparticles was evidenced by FTIR spectroscopy and confirmed by TG analysis. The microcell configuration (bioceramics) made by hydroxyapatite doped with nanometric magnetite could be a suitable support for osteoblast cell adhesion and proliferation, without any modification of cell structure and function.

The cytotoxicity test shows that the M13 substrate used for cell incubation changes the parameters of cell growth, causing the increase or decrease of proliferation and viability relating to control. Thus, the exposure period (2, 4, 12 or 24 hours) is a significant factor affecting osteoblast cell growth, allowing us to quantify the main interval and the precise hours for cell proliferation and growth. Substrate M13 offers superior biocompatibility and could represent an important bioceramic substrate for medical biocompatible supports.

#### Acknowledgements:

This work was financially supported by the Romanian Ministry of Education and Research (Project PNCDI 71-097/2007, POSDRU ID 60203 and POSDRU ID 7713). We gratefully acknowledge l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux for granting us access to their facilities for sample characterizations.

către Ministerul Educației și Cercetării din România (Proiect PNCDI 71-097/2007, POSDRU ID 60203 și POSDRU ID 7713), Mulțumim Institutului de Chimia Materiei Condensate din Bordeaux pentru accesul în laboratoarele lor în vederea caracterizării probelor.

#### REFERENCES

1. A. Krestou, A. Xenidis, and D.Panias, Mechanism of aqueous uranium(VI) uptake by hydroxyapatite, *Minerals Engineering*, 2004, **17**, 373.
2. G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, and M. Saladini, Removal of cadmium ion by means of synthetic hydroxyapatite, *Waste Management*, 2002, **22**, 853.
3. E.D. Vega, J.C. Pedregosa, G.E. Narda, and P.J. Morando, Removal of oxovanadium(IV) from aqueous solutions by using commercial crystalline calcium hydroxyapatite, *Water Research*, 2003, **37**, 1776.
4. A.G. Leyva, J. Marrero, P. Smichowski, and D. Cicerone, Sorption of Antimony onto Hydroxyapatite, *Environmental Science & Technology*, 2001, **35**, 3669.
5. K.Ohura, M. Ikenaga, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Ebisava, T. Kokubo, Y. Kotoura, and M. Oka, A bioactive glass-ceramic for treatment of bone tumors, *Bioceramics*, 1992, **3**, 225.
6. Y. Ebisava, T. Kokubo, K. Ohura, and T. Yamamuro, Bioactivity of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-containing CaO-SiO<sub>2</sub> glasses: in vitro evaluation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1993, **4**, 225.
7. M. Ikenaga, K. Ohura, T. Yamamuro, Y. Kotoura, M. Oka, and T. Kokubo, Localized hyperthermic treatment of experimental bone tumors with ferromagnetic ceramics, *Journal of Orthopaedic Research*, 1993, **11**, 849.
8. Y. Ebisava, F. Miyaji, T. Kokubo, K. Ohura, and T. Nakamura, Bioactivity of ferrimagnetic glass-ceramics in the system FeO-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-CaO-SiO<sub>2</sub>, *Biomaterials*, 1997, **18**, 1277.
9. K. Takegami, T. Sano, H. Wakabayashi, J. Sodona, T. Yamazaki, S. Morita, T. Shibuya, and A. Uchida, New ferromagnetic bone cement for local hyperthermia, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, **43**, 210.
10. U. Gross, and V. Strunz, The interface of various glasses and glass ceramics with a bony implantation bed, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1985, **19**, 251.
11. X. Miao, Y. Hu, J. Liu, and A.P. Wong, Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements, *Materials Letters*, 2004, **58**, 397.
12. M. Wei, A.J. Ruys, B.K. Milthorpe, and C.C. Sorrell, Solution ripening of hydroxyapatite nanoparticles: Effects on electrophoretic deposition, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, **45**, 11.
13. C.M. Cotell, Pulsed laser deposition and processing of biocompatible hydroxyapatite thin films, *Applied Surface Science*, 1993, **69**, 140.
14. R.K. Singh, F. Qian, V. Nagabushnam, R. Damodaran, and B.M. Moudgil, Excimer laser deposition of hydroxyapatite thin films, *Biomaterials*, 1994, **15**, 522.
15. L. Torrisi, and R. Setola, Thermally assisted hydroxyapatite obtained by pulsed-laser deposition on titanium substrates, *Thin Solid Films*, 1993, **12**, 237.
16. T. Brendel, A. Engel, and C. Russel, Hydroxyapatite coatings by a polymeric route, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1992, **3**, 175.
17. T. S. B. Narasaraju, and D.E. Phebe, Some physico-chemical aspects of hydroxyapatite, *Journal of Materials Science*, 1996, **1**, 31.
18. M. Okazaki, and J. Takahashi, Rietveld analysis and Fourier maps of hydroxyapatite, *Biomaterials*, 1997, **18**(11)795.
19. K.C.B. Yeong, J. Wang, and S.C. Ng, Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO<sub>4</sub>, *Biomaterials*, 2001, **22**, 2705.
20. T. Isobe, S. Nakamura, R. Nemoto, M.Senna, and H. Sfihi, Solid-state nuclear magnetic resonance study of the local structure of calcium phosphate nanoparticles synthesized by a wet-mechanochemical reaction, *Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**, 5169.
21. A. Melinescu, M. Preda, L. E. Sima, and S. M. Petrescu, and I. Teoreanu, In vitro testing of hydroxyapatite bioceramics, *Romanian Journal of Materials*, 2008, **38** (3), 233.
22. E. Andronescu, O. Nicola, C. Bârsan, and C. Ghițuică, Ferrimagnetic biomaterials with applications in medicine, *Romanian Journal of Materials*, 2007, **37**(2), 122.
23. A. Melinescu, M. Preda, and I. Teoreanu, Synthesis of hydroxyapatite in the presence of silicon compounds, *Romanian Journal of Materials*, 2007, **37**(4), 299.
24. A. Puri, M. Georgescu, and G. Voicu, Hardening processes in the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O system, *Romanian Journal of Materials*, 2002, **32** (3), 197.
25. D. M. Liu, T. Troczynski, and W.J. Tseng, Aging effect on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite, *Biomaterials*, 2002, **23**, 1227.
26. D. Predoi, V. Kuncser, M.Zaharescu, W. Keune, B. Sahoo, M. Văleanu, M. Crișan, M. Răileanu, A. Jitianu and G. Filoti, Structural and magnetic properties of iron species/SiO<sub>2</sub> nanocomposites obtained by sol-gel methods, *Physica Status Solidi (c)*, 2004, **1** (12), 3507.
27. D. Predoi, O.Crișan, A. Jitianu, M.C. Valsangiacom, M. Raileanu, M. Crișan, and M. Zaharescu, Iron oxide in a silica matrix prepared by the sol-gel method, *Thin Solid Films*, 2007, **515**, 6319.
28. R. Kamar, K.H. Prakash, P. Cheang, and K.A. Khor, Temperature Driven Morphological Changes of Chemically Precipitated Hydroxyapatite Nanoparticles, *Langmuir*, 2004, **20**, 5196.
29. J.Liu, X.Ye, H. Wang, M.Zhu, B. Wang, and H. Yan, The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method, *Ceramics International*, 2003, **29**, 629.
30. D. Prodan Predoi, C. Chaneac, E. Tronc, J.P.Jolivet, M. Noguees et al, Adsorption phenomena and magnetic properties of γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999, **203**, 63.
31. L.Yan, Y. Li, Z. Deng, J. Zhuang, and X. Sun, Surfactant-assisted hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods, *International Journal of Inorganic Materials*, 2001, **3**, 633.
32. R.A. Vătășescu-Balcan, D. Predoi, and M. Costache, Study of osteoblast interaction with iron oxide nanoparticles coated with dextrin in cell culture, *Febs Journal*, 2008, **275**, 374.
33. D. Predoi, A study on iron oxide nanoparticles coated with dextrin obtained by coprecipitation, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2007, **2**(1)169.
34. A.J. Gallagher, R. Gundle, and N.J.Beresford, Isolation and culture of bone forming cells (osteoblast) from human bone, *Human Cell Culture Protocols* (Jones, E.G., eds.), 1996, 233.
35. V. Mureșan, R. Vătășescu, Aura Mihalcea, Anca Dinischiotu, Marieta Costache, Roxana Vasilco, and Elena Ionică, Study of adherence on silica and gold thin films of dermal fibroblast obtained from normal skin biopsy, *SNBC Annals*, 2004, **IX**(2), Chapter VI – Techniques, 367-371.
36. N. Kivrak, and A. Tas Cuneyt, Synthesis of calcium hydroxyapatite-tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior, *Journal of the American Ceramic Society*, 1998, **81**(9)2245.
37. D. Predoi, S. Derible, and H. Duflo, Synthesis and ultrasonic characterization of hydroxyapatite ceramic powders, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2009, **11**(6)852.
38. D. Predoi, R.A. Vătășescu-Balcan, I. Pasuk, R. Trușcă and M. Costache, Calcium phosphate ceramics for biomedical applications, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2008, **10**(8)2151.

39. D. Predoi; M. Bârsan, E. Andronescu, R.A. Vătăşescu - Balcan and M. Costache, Hydroxyapatite-iron oxide bioceramic prepared using nano-size powders, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2007, **9**(11)3609.
40. I.F. Vasconcelos, M.A. Pimenta, A.S.B. Sombra, Optical properties of Bi<sub>12</sub>SiO<sub>20</sub> (BSO) and Bi<sub>12</sub>TiO<sub>20</sub> (BTO) obtained by mechanical alloying, *Journal of Materials Science*, 2001, **36**, 587.
41. M.N. Taravel, A Domard, Collagen and its interaction with chitosan .2. influence of the physicochemical characteristics of collagen, *Biomaterials*, 1995, **16**(11)865.
42. C.C. Silva, H.G. B. Rocha, F.N.A. Freire, M.R.P. Santos, K.D.A. Saboia, J.C. Goes, A.S.B. Sombra, Hydroxyapatite screen-printed thick films: optical and electrical properties, *Materials Chemistry and Physics*, 2005, **92**, 260.
43. D. Predoi, R.V. Ghiţă, F. Ungureanu, C.C. Negrila, R.A. Vatasescu-Balcan and M. Costache, Characteristics of hydroxyapatite thin films, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2007, **9**(12) 3827.
44. W. Suchanek, Y. Masahiro, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *Journal of Materials Research*, 1998, **13**(1) 94.
45. W.L. Suchanek, P. Shuk, K. Byrappa, R.E. Riman, K. S. Tenhuisen, and V.F. Janas, Mechanochemical - hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature, *Biomaterials*, 2002, **23**, 699.
46. P.N. Kumta, C. Sfeir, D.H. Lee, D. Olton, and D. Choi, Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization, *Acta Biomaterialia*, 2005, **1**, 65.

\*\*\*\*\*

**MANIFESTĂRI ŞTIINŢIFICE / SCIENTIFIC EVENTS**



**3<sup>rd</sup> International Congress  
on Ceramics**

**14-18 November 2010, Osaka**

The 3<sup>rd</sup> Congress (ICC3) will be held in Japan, 2010, is organized by the Ceramic Society of Japan (CerSJ). This Congress incorporates the 23<sup>rd</sup> Fall Meeting of Ceramic Society of Japan and the 20<sup>th</sup> Iketani Conference, and is endorsed and supported by ICF, Asia-Oceania Ceramic Federation (AOCF) as well as many other organizations.

The Congress will consist of voluntarily organized 22 symposia:

- Emerging Technologies and Future Aspects for Ceramics
- Advanced Structure Analysis and Characterization of Ceramic Materials
- Novel Chemical Processing; Sol-Gel and Solution-Based Processing
- Novel Chemical Processing; Molecular Routes to Ceramics and Ceramics-based Materials
- Novel Chemical Processing; Chemical Tectonics for Materials Design
- Nano-Crystals and Advanced Powder Technology
- Green and Smart Processing
- Hybrid and Nano-Structured Materials
- Advances in Electro Ceramics
- Optical Ceramics
- Glasses - Science & Technology, and Photonic Applications-
- Ceramics for Electricity; Energy Conversion and Storage Systems for Green World
- Ceramics for Electricity; SOFC and Related Technologies
- Ceramics for Electricity; Direct Conversion Technology between Heat and Electricity
- Ceramics for Electricity; Advanced Superconducting Materials
- Ceramics and Composites for Advanced Nuclear Energy and Hazardous Waste Treatment Applications
- Advanced Ceramic Surface for Environmental Purification: Photocatalysis and Wettability Control
- Porous Ceramics for Environmental Protection and Advanced Industries
- Ceramics for Medicine, Biotechnology and Biomimetics
- Advanced Engineering Ceramics and Composites
- Advanced Ceramic Sensor Technologies
- Innovation in Refractories and Traditional Ceramics
- Health and Safety Aspects of Ceramic Nanoparticles

Contact: <http://www.ceramic.or.jp/icc3/introduction.html>

\*\*\*\*\*