



**UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie**

**Wydział Chemii
Instytut Nauk Chemicznych**

mgr Marta Kalbarczyk

**Otrzymywanie fosforanów wapnia
z wykorzystaniem odpadów rolniczych**

Rozprawa doktorska
wykonana w Katedrze Zjawisk Międzyfazowych
pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Szcześ, prof. UMCS.

Lublin 2023

„Nauka to czary, które naprawdę działają.”

Kurt Vonnegut

Składam serdeczne podziękowania
Pani Promotor dr hab. Aleksandrze Szcześ, prof. UMCS
za całą przekazaną mi wiedzę, cenne uwagi, pomoc i opiekę promotorską,
poświęcony czas, wyrozumiałość oraz życzliwość.

Pragnę także podziękować moim rodzicom,
Iwoni i Januszowi,
którzy nauczyli mnie wytrwałości,
rodzeństwu- Kamilowi i Karolinie,
narzeczonemu Arturowi
oraz przyjaciołom,
w szczególności Agnieszce i Weronice,
za otuchę i wiarę w moje możliwości.
Bez Was ta praca by nie powstała.

Spis treści

STRESZCZENIE	4
ABSTRACT	6
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI	8
1. WPROWADZENIE I CEL PRACY	10
2. FOSFORANY WAPNIA	14
2.1. Charakterystyka form i właściwości fosforanów wapnia.....	14
2.2. Zastosowanie fosforanów wapnia	17
2.3. Dwufazowe fosforany wapnia.....	23
2.4. Metody otrzymywania fosforanów wapnia.....	24
2.5. Wykorzystanie skorupki jaj ptasich do otrzymywania fosforanów wapnia	25
3. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA STOSOWANYCH TECHNIK ANALITYCZNYCH ..	30
3.1. Emisyjna atomowa spektrometria z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES lub ICP-AES) oraz spektroskopia masowa z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-MS).....	30
3.2. Spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR)	31
3.3. Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD)	33
3.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	35
3.5. Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS).....	36
4. METODY BADAWCZE	38
4.1. Wykorzystane odczynniki chemiczne	38
4.2. Procedura przygotowania skorupki jaj ptasich.....	38
4.3. Procedura syntezy	39
4.4. Opis przeprowadzonych badań	41
5. OTRZYMYWANIE FOSFORANÓW WAPNIA Z WYKORZYSTANIEM SKORUPEK JAJ PTASICH.....	48
5.1. Wstępna synteza fosforanów wapnia z wykorzystaniem surowych jaj kurzych jako źródła wapnia	48
5.2. Wpływ działania promieniowania mikrofalowego na skład i morfologię syntetyzowanych fosforanów wapnia.	55
5.3. Wpływ pH na właściwości otrzymywanych fosforanów wapnia.	61
5.4. Wpływ skorupki jaj pochodzących od różnych gatunków ptaków oraz obecności błon pergaminowych w skorupkach.....	70
5.5. Wpływ domieszkowania jonami cynku na właściwości otrzymywanych fosforanów wapnia	80
6. WNIOSKI	104
7. LITERATURA.....	108
8. Wykaz dorobku naukowego.....	122

STRESZCZENIE

Głównym celem prezentowanej rozprawy doktorskiej była synteza fosforanów wapnia, uważanych za biomateriały, z wykorzystaniem skorupki jaj ptasich stanowiących powszechny odpad rolniczy, jako źródło wapnia. W pracy zaproponowana została metoda otrzymywania dwu i wielofazowych fosforanów wapnia o różnym składzie, przy założeniu jak najmniejszego wkładu energetycznego, wpisująca się tym samym w założenia „Zielonej Chemii”. Otrzymane produkty zbadano pod kątem potencjalnego zastosowania jako dodatki do produktów do higieny jamy ustnej wspomagających proces remineralizacji szkliwa, a także jako adsorbentów do usuwania metali ciężkich z wód. Procedura syntezy została poddana szeregowi modyfikacji takich jak: ekspozycja na promieniowanie mikrofalowe, zmiana początkowego pH mieszaniny reagentów, zastosowanie skorupki jaj pochodzących od różnych gatunków ptaków, usuwanie wewnętrznej błony pergaminowej oraz domieszkowanie jonami cynku, co pozwoliło na dobranie optymalnych warunków. Przedstawione badania ukierunkowane zostały na analizę składu, morfologii i właściwości powierzchniowych otrzymanych materiałów stosując głównie takie techniki analityczne jak: spektroskopia w podczerwieni (FTIR), dyfrakcja rentgenowska (XRD), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) i porozymetria (technika ASAP). Na podstawie analizy uwalniania jonów wapnia z otrzymanych produktów w roztworze soli fizjologicznej oraz roztworze sztucznej śliny, dowiedziono potencjału otrzymanych dwufazowych produktów będących mieszaniną stabilnego hydroksyapatytu (HA) i drugiej, lepiej rozpuszczalnej formy fosforanu wapnia, jako materiałów będących źródłem wapnia i fosforu w procesie remineralizacji szkliwa. Ponadto, udowodnione zostało, że domieszkowanie jonami cynku powoduje ich wbudowywanie się w strukturę HA, a zmiana stosunku molowego Zn względem jonów wapnia umożliwia kontrolę składu oraz właściwości powierzchniowych wytwarzanych fosforanów wapnia. Badania właściwości antybakteryjnych materiałów domieszkowanych jonami cynku wykazały znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową, która rosła wraz z zawartością cynku, jednakże analiza cytotoksyczności wskazała na obniżenie żywotności komórek mysich preosteoblastów dla wszystkich materiałów, co można powiązać z rozpuszczalnością produktów. Ponadto, dwa wybrane produkty o najlepszych właściwościach powierzchniowych zostały poddane badaniom adsorpcji metodą statyczną powszechnie występujących w ściekach jonów Cu^{2+} , Cd^{2+} i Ni^{2+} . Oba badane materiały odznaczały się dobrą pojemnością sorpcyjną wobec wybranych jonów metali ciężkich, a na podstawie lepszego dopasowania do modelu adsorpcji Langmuira oraz

kinetyki pseudo-drugiego rzędu stwierdzony został chemiczny charakter oddziaływań adsorbent-adsorbat. Uzyskane wyniki potwierdziły potencjał aplikacyjny materiałów otrzymanych ze skorupki jaj kurzych zarówno jako dodatku do produktów stomatologicznych, jak również adsorbentu do usuwania zanieczyszczeń metalami ciężkimi ze środowisk wodnych. Zastosowana metoda syntezy o zmniejszonym wpływie na środowisko pozwala na satysfakcjonującą konwersję skorupki jaj kurzych, uważanych powszechnie za odpad, w materiały o charakterze aplikacyjnym.

ABSTRACT

The main aim of the presented research was to produce calcium phosphates considered as biomaterials, using avian eggshells being an agricultural waste as a calcium source. The synthesis method of bi- and multiphasic calcium phosphates, corresponding to the “Green Chemistry” assumptions consisting in the energy input reduction was proposed. The prepared materials were analysed with respect to their potential application as a components of daily oral care products promoting the enamel remineralization and also as heavy metal adsorbents during the wastewater treatment. The synthesis procedure was modified by means of: the exposition on the microwave irradiation, the initial pH value changes, the usage of the eggshells derived from different avian species, the inner eggshell membranes removal as well as doping with zinc ions, which allowed to optimize the synthesis conditions. The studies were focused on the composition, morphology and surface properties of the obtained products analysis by means of such techniques as Infrared Spectroscopy with Fourier Transformation (FTIR), X-ray Diffraction Analysis (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), and Accelerated Surface Area and Porosimetry System (ASAP). The interpretation of calcium ions release profiles in the saline and artificial human saliva solutions proved the possibility of their application as the calcium and phosphorus source during the enamel remineralization process of the biomaterials being the mixture of a stable calcium phosphate form- hydroxyapatite and the other one characterized by greater solubility. Moreover, the tendency of Zn ions incorporation into the hydroxyapatite structure was proved, while the changes of the zinc to calcium molar ratio allowed to control the composition and surface properties of the synthesized products. The antibacterial activity studies indicated that the Zn-doped materials reduced the bacteria viability, and their activity against the bacteria stains increased with the increasing Zn ions contribution. However, the cytotoxicity assessment showed the decrease of mouse calvarial preosteoblasts viability for all fabricated powders. Two of the materials, with the best parameters with respect to sorptive properties were subjected to the adsorption studies against Cu^{2+} , Cd^{2+} and Ni^{2+} ions being the prevalent contaminants in the sewage. Both studied materials should be considered as good adsorbents characterized by the large value of adsorption capacity with respect to the chosen metals. Based on the better data fitting to the Langmuir adsorption model as well as the pseudo-second order kinetics it was shown that the chemical character of the interactions between the adsorbate and the adsorbent was found. The obtained results proved the potential of fabricated calcium phosphates from the hen eggshells as the additives to the dental products as well as

the adsorbent for wastewater purification. The applied method with the diminished impact on the environment, allowed a satisfying conversion of the hen eggshells, commonly considered as wastes into the materials with a high application potential.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

ACP – amorficzny fosforan wapnia

ASAP – analizator niskociśnieniowej adsorpcji gazowej

ATR-FTIR – spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni

BE (BEs) – energie wiązań wyrażone w eV

BET – metoda określania powierzchni właściwej przy użyciu izotermy Brunauera-Emmetta-Tellera

BJH – metoda Barreta, Joynera, Halendy

BP – błona pergaminowa będąca wewnętrzną częścią skorupki jaj ptasich

BSE – elektrony wstecznie rozproszone

Ca/P – stosunek molowy wapnia do fosforu w fosforanach wapnia

CDHA – hydroksyapatyt z deficytem wapnia

CFU – jednostka tworząca kolonię bakterii

CMC – krytyczne stężenie micelizacji

Cz.d.a. – oznaczenie czystości odczynników (czysty do analizy)

DCPA – bezwodny fosforan dwuwapniowy (monetyt)

DCPD – dwuwodny fosforan dwuwapniowy (bruszyt)

DSC – skaningowa kalorymetria różnicowa

DTG – dynamiczna analiza termogravimetryczna

EDX (EDS) – spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii

ETD – detektor Everharta-Thornleya

FAP – fluoroapatyt

FTIR – spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera

HA, HAp – hydroksyapatyt

HAADF – wysokorozdzielczy szerokokątowy pierścieniowy detektor pola ciemnego

ICP- OES (ICP- AES) – emisyjna atomowa spektrometria z indukcyjnie sprzężoną plazmą

ICP- MS – spektroskopia masowa z indukcyjnie sprzężoną plazmą

IEP – punkt izoelektryczny

IR – promieniowanie z zakresu podczerwieni

MCPA – bezwodny fosforan monowapniowy

MCPM – fosforan monowapniowy jednowodny

M-H – bulion Muellera Hintona

OCP – fosforan oktawaopniowy

PBS – roztwór buforu fosforanowego

R^2 – współczynnik dopasowania danych eksperymentalnych do linii trendu

SE – elektrony wtórne

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa

STEM – transmisyjny tryb skaningowy

TEM – transmisyjna elektronowa mikroskopia skaningowa

Test MTT – test redukcji soli tetrazolowej MTT określający aktywność metaboliczną komórek

TG – analiza termograwimetryczna

TTCP – fosforan czterowapniowy

Woda Milli-Q – woda oczyszczana przez Milli-Q Plus system (Millipore, USA) o przewodności 18,2 M Ω cm

XPS – rentgenowska spektroskopia fotoelektronowa

Zn-HA – hydroksyapatyt domieszkowany cynkiem

α -TCP – fosforan trójwapniowy

β -TCP – fosforan trójwapniowy

θ – miara kąta dyfrakcji

1. WPROWADZENIE I CEL PRACY

W 2015 roku na Szczycie Zrównoważonego Rozwoju, zrzeszająca prawie 200 krajów świata, Organizacja Narodów Zjednoczonych przyjęła jednogłośnie Agendę na Rzecz Zrównoważonego Rozwoju wskazującą 17 globalnych celów do zrealizowania do 2030 roku, których celem ma być wyeliminowanie ubóstwa na świecie i budowa zrównoważonej przyszłości (The United Nations website, 2023). Priorytetem krajów rozwiniętych powinien być nie tylko postęp gospodarczy, medyczny i technologiczny, ale przede wszystkim zrównoważony rozwój poprzez znalezienie balansu między potrzebami i możliwościami w odniesieniu do zmian klimatu, ubóstwa, pokoju na świecie i pomocy tym, którzy są w potrzebie. Wszystkie zauważone wyzwania zostały zadeklarowane jako 17 głównych celów przedstawionych na rys. 1.1. Nowoczesna i innowacyjna nauka powinna prowadzić do tworzenia i rozwijania pożądaných rozwiązań uwzględniających wszystkie istotne zagadnienia wymienione w Agendzie.



Rys. 1.1. Cele zrównoważonego rozwoju (UNIC, 2023).

Poszukiwanie nowych, biokompatybilnych i biodegradowalnych materiałów o wielu różnych zastosowaniach jest od kilku lat jednym z najważniejszych problemów naukowych. Dodatkowym wyzwaniem jest wypracowanie procedur zgodnych z podejściem Zrównoważonego Rozwoju oraz z założeniami zielonej chemii (rys. 1.2) (de Marco *et al.*, 2019), takich jak redukcja rozpuszczalników organicznych, wykorzystanie substratów pochodzących z recyklingu oraz zmniejszenie ilości wytwarzanych odpadów czy ograniczenie nakładów energii podczas procesu. Ze względu na bezpieczeństwo dla środowiska, biogodność, biodegradowalność oraz szerokie możliwości zastosowania w takich dziedzinach jak medycyna, stomatologia, a także rolnictwo, rekultywacja wód

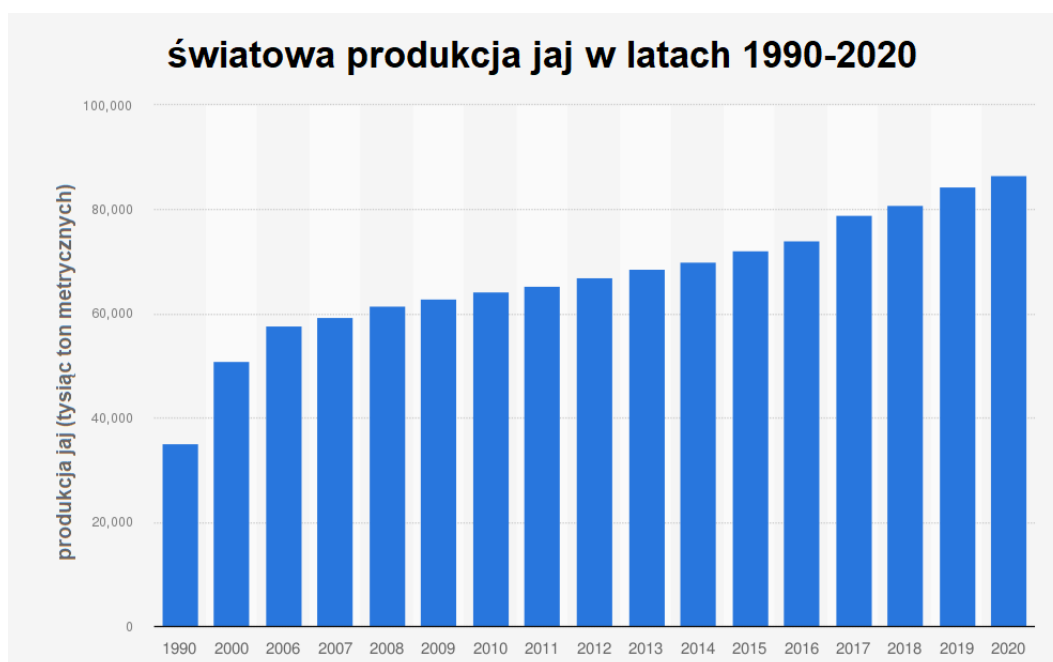
i wiele innych, grupa materiałów nazywanych ogólnie **fosforanami wapnia** jest przedmiotem szczególnego zainteresowania wielu naukowców (Eliasz i Metoki, 2017).



Rys. 1.2. Założenia zielonej chemii (de Marco *et al.*, 2019).

Badania w dziedzinie biomateriałów skupiają się głównie na syntezie, charakterystyce materiałów i ich zastosowaniu, ale należy również wziąć pod uwagę aspekt ekonomiczny. Rozwój nowych i tanich technologii produkcji sprawi, że biomateriały staną się powszechnie dostępne dla wszystkich potrzebujących. Ostateczna cena produktu zależy nie tylko od kosztów technologii produkcji, ale również od dostępności i ceny surowców. Tania technologia w połączeniu z tanim i łatwo dostępnym surowcem pozwoli na obniżenie ceny dla konsumenta. Takie podejście zwiększy dostępność produktów ochrony zdrowia i leczenia poprzez obniżenie kosztów produkcji. Pozwoli również uniknąć zanieczyszczenia wody, zmniejszy zużycie energii oraz zmniejszy zanieczyszczenie wód, wpisując się tym samym w cele Zrównoważonego Rozwoju.

Bogate w wapń skorupki jaj ptasich, zwłaszcza kurzych, wydają się być bardzo obiecującym odpadem rolniczym stosowanym jako źródło Ca podczas syntezy fosforanów wapnia. Analizując ostatnie dwie dekady, obserwuje się rosnący popyt na jaja (rys. 1.3). W 2019 roku ilość wyprodukowanych jaj kurzych przekroczyła 80 mln ton, co wskazuje, że od 1990 roku światowa produkcja wzrosła o ponad sto procent (*Production of eggs worldwide, 2020, 2022*).



Rys. 1.3. Światowa produkcja jaj od 1990 do 2020 roku (*Production of eggs worldwide, 2020, 2022*).

Zakładając, że skorupki jaj kurzych stanowią około 11% masy jajka (Hamilton, 1986; Hincke *et al.*, 2012) i są traktowane jako powszechny odpad rolniczy, mogą być wykorzystane jako źródło wapnia do produkcji fosforanów wapnia o odpowiednich właściwościach, takich jak skład chemiczny, wielkość cząstek, powierzchnia właściwa, porowatość, wytrzymałość mechaniczna i biokompatybilność, do potencjalnych zastosowań biomedycznych, oczyszczania środowiska oraz jako nawozy.

Głównym celem prowadzonych badań była konwersja odpadów rolniczych w postaci skorupki jaj ptasich w materiały biokompatybilne (biomateriały) na bazie fosforanów wapnia, które mogą znaleźć zastosowanie w medycynie jako systemy dostarczania leków i rusztowania do naprawy kości, w stomatologii jako składniki past do zębów wspomagające remineralizację szkliwa, w ochronie środowiska adsorbenty do oczyszczania wód oraz rolnictwie jako nawozy o niewielkim wpływie na środowisko. Zastosowanie surowych nieprażonych skorupki jaj oraz obniżenie temperatury syntezy i suszenia otrzymanego produktu wpisuje się w założenia zielonej chemii i znacznie obniża koszty produkcji. Produkcja oparta na wykorzystaniu skorupki jaj jest strategią, która może stanowić wartość dodaną w utylizacji odpadów i obniżyć koszty produkcji materiałów ceramicznych/adsorbentów.

Główny cel badań realizowano w oparciu o cele szczegółowe:

- ✓ opracowanie i optymalizacja procedury syntezy biomateriałów o określonych właściwościach fizykochemicznych z wykorzystaniem skorupki jaj ptasich;

- ✓ określenie wpływu promieniowania mikrofalowego, początkowego pH układu, skorupek jaj pochodzących od różnych gatunków ptaków oraz obecności błony pergaminowej skorupki na skład i właściwości otrzymywanych fosforanów wapnia;
- ✓ badania uwalniania jonów wapnia pod kątem zastosowania w stomatologii jako składniki past do zębów wspomagające remineralizację szkliwa;
- ✓ modyfikacja właściwości antybakteryjnych i cytotoksyczności materiałów poprzez domieszkowanie jonami cynku;
- ✓ badania właściwości adsorpcyjnych wybranych materiałów pod kątem zastosowania do oczyszczania wód z metali ciężkich;

2. FOSFORANY WAPNIA

2.1. Charakterystyka form i właściwości fosforanów wapnia

Z chemicznego punktu widzenia fosforany wapnia to sole wapnia i kwasu fosforowego(V) złożone z dwuwartościowych jonów wapnia i grup fosforanowych, w różnych stosunkach molowych. W zależności od stosunku molowego Ca/P materiały te mogą wykazywać różne właściwości fizykochemiczne, takie jak stabilność i rozpuszczalność, co przedstawiono w tabeli 2.1.

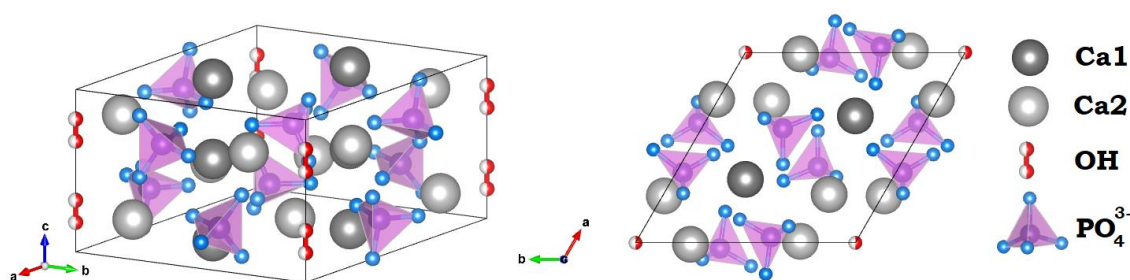
Tabela 2.1. Charakterystyka różnych form fosforanu wapnia i ich zastosowanie (Akram *et al.*, 2014; V. Dorozhkin, 2021).

Nazwa związku i wzór chemiczny	stosunek molowy Ca/P	Zakres pH w którym forma jest stabilna	pKa	Zastosowanie
Fosforan monowapniowy				
jednowodny				
(MCPM - Monocalcium phosphate monohydrate) $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	0,0-2,0	1,14	nawozy
Bezwodny fosforan monowapniowy				
(MCPA - Monocalcium phosphate anhydrous) $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5		1,14	nawozy, implanty kostne
Dwuwodny fosforan dwuwapniowy (bruszyt)				
(DCPD - Dicalcium phosphate dihydrate (brushite)) $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	2,0-6,0	6,59	produkty stomatologiczne (jako ochrona przed próchnicą), nawozy, produkcja szkła, suplementy diety i nośniki leków rozpuszczalnych w wodzie
Bezwodny fosforan dwuwapniowy (monetyt)				
(DCPA - Dicalcium phosphate anhydrous (monetite)) CaHPO_4	1,0		6,90	cementy fosforanowo-wapniowe, środek polerujący, suplementy diety
Amorficzny fosforan wapnia				
(ACP - Amorphous calcium phosphates) $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2-2,2	5,0-12,0		cementy fosforanowo-wapniowe, składnik bioaktywnych materiałów

n-3-4.5;12-20%H ₂ O				kompozytowych stosowanych w stomatologii i chirurgii
Fosforan oktawaapniowy				
(OCP - Octacalcium phosphate) Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	1,33	5,5-7,0	96,60	implanty kostne
α – fosforan trójwapniowy (α - TCP, α- Tricalcium phosphate) α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5		25,50	cementy fosforanowo-wapniowe i nawozy
β – fosforan trójwapniowy (β-TCP, β - Tricalcium phosphate) β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5		28,90	Kostne cementy fosforanowo-wapniowe, ceramika kostna, nawozy, proszek do polerowania, proszek dentystyczny, porcelana, ceramika i suplement diety dla zwierząt
Hydroksyapatyt z deficytem wapnia				
(CDHA - Calcium-deficient Hydroxyapatite) Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0<x<1)	1,5-1,67	6,5-9,5	85,00	implanty kostne
Hydroksyapatyt (HA, HAp - Hydroxyapatite) Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	9,5-12,0	116,80	powłoki w ortopedii (np. protezy stawu biodrowego), implanty dentystyczne, składnik cementów fosforanowo-wapniowych, naprawa tkanek twardych
Fluoroapatyt (FAp – Fluorapatite) Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	1,67	7,0-12,0	120,00	produkty farmaceutyczne
Fosforan czterowapniowy (TTCP - Tetracalcium phosphate) Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2,0		38,00-44,00	samowiązące cementy fosforanowo-wapniowe, powłoki implantów metalowych

Stechiometryczny **hydroksyapatyt (HA)** o wzorze chemicznym Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ i stosunku molowym Ca/P równym 1,67 krystalizuje w układzie heksagonalnym (a=b=9.432Å, c=6.881Å) (Jokanović *et al.*, 2006) (Rys. 2.1.). Hydroksyapatyt jest głównym nieorganicznym składnikiem kości i zębów. Kości to złożony układ zawierający około 70% HA, 20% kolagenu typu I i 10% wody (Tathe, Ghodke i Nikalje, 2010; Sadat-Shojai *et al.*,

2013). Kryształy hydroksyapatytu kostnego mają kształt igły o szerokości 5–20 nm i długości 60 nm (Ferraz, Monteiro i Manuel, 2004; Alobeedallah *et al.*, 2011). Warto podkreślić, że HA wytwarzany przez organizmy żywe jest strukturą bardziej skomplikowaną, raczej niestechiometryczną, ubogą w wapń o stosunku molowym Ca/P niższym niż 1,67. Ponadto, zawiera on śladowe ilości jonów, takich jak CO_3^{2-} , Mg^{2+} , Na^+ , F, Cl^- oraz kilka pierwiastków śladowych: Sr, Pb, Zn, Cu i Fe. Ich ilości różnią się w zależności od konkretnego typu tkanki, co jest związane z jej właściwościami i bioaktywnością. Podstawienie grupy węglanowej następuje albo w pozycji PO_4^{3-} (dla apatyty typu B), albo w pozycji OH^- (dla apatyty typu A) (Jokanović *et al.*, 2006; Kuśnieruk *et al.*, 2016).



Rys. 2.1. Struktura krystalograficzna hydroksyapatytu (Momma i Izumi, 2011).

Jeśli wartość stosunku Ca/P jest bliższa 1,67 materiał jest bardziej stabilny w organizmie człowieka. Bardzo ważnym aspektem, który należy wziąć pod uwagę, jest również stopień krystaliczności. Zaobserwowano, że krystaliczność w tkankach szkliva zębów jest bardzo wysoka, podczas gdy w przypadku zębiny i kości bardzo słaba, co prawdopodobnie ma związek z małym rozmiarem kryształów, jak również resztkowymi naprężeniami w sieci krystalicznej. Ponieważ reaktywność w zębiny i kościach jest większa niż w szkliwie zębów, wydaje się, że reaktywność zależy również od stopnia krystaliczności (Fazel-Rezai, 2011; Habraken *et al.*, 2016).

Fosforan trójwapniowy (TCP) o wzorze chemicznym $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ i stosunku Ca/P wynoszącym 1,5 ma trzy odmiany polimorficzne: α , α' i β . α' -TCP przeważa w temperaturach wyższych niż 1470°C i jest najbardziej stabilny w zakresie temperatur od 1180°C do 1470°C , natomiast β -TCP występuje w temperaturach niższych niż 1180°C (Choi i Kumta, 2007). Przejście z jednej fazy do drugiej jest bezpośrednio związane ze zmianą gęstości materiału o wartościach odpowiednio $3,066$, $2,866$ i $2,702 \text{ g/cm}^3$ dla β -TCP, α -TCP i α' -TCP podczas wzrostu temperatury (Carrodegua i De Aza, 2011). Liczne doniesienia przedstawiają zalety każdej z tych trzech form, jednak β -TCP jest uznawany za bardziej wartościowy ze względu na swoją wytrzymałość mechaniczną, biogodność z tkankami ludzkimi oraz biodostępność w procesie biomineralizacji. Udowodniono również, że forma

α rozpuszcza się szybciej niż β , chociaż szybkość rozpuszczania β -TCP jest wciąż wyższa niż HA (LeGeros *et al.*, 2003). Pozwala to na wyciągnięcie ogólnego wniosku, że im większa wartość stosunku Ca/P, tym mniejsza rozpuszczalność danej formy fosforanu wapnia.

2.2. Zastosowanie fosforanów wapnia

Dzięki swoim właściwościom fosforany wapnia znalazły na przestrzeni lat wiele potencjalnych zastosowań (rys. 2.3). Materiały te są używane głównie w medycynie jako materiały do regeneracji, wymiany i odbudowy kości, w ortopedii oraz w stomatologii (Feng Chen *et al.*, 2012; Kumar i Mohanty, 2022). Dostrzeżono również liczne korzyści płynące ze stosowania fosforanów wapnia jako systemów dostarczania leków w różnych chorobach kości (Ghiasi, Sefidbakht i Rezaei, 2019; Zhao *et al.*, 2019). Ponadto, fosforany wapnia mogą skutecznie oczyszczać ścieki z zanieczyszczeń metalami ciężkimi (Nzihou i Sharrock, 2010; Núñez *et al.*, 2019; Hernández-Cocoletzi *et al.*, 2020; Kumar i Mohanty, 2022). Innym aspektem aplikacyjnym jest produkcja nawozów mineralnych pod kątem kontrolowanej suplementacji fosforem i wapniem będącymi składnikami pokarmowymi roślin (Maghsoodi *et al.*, 2020; Maghsoodi, Ghodszad i Asgari Lajayer, 2020; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020).



Rys. 2.3. Przykłady zastosowań fosforanów wapnia.

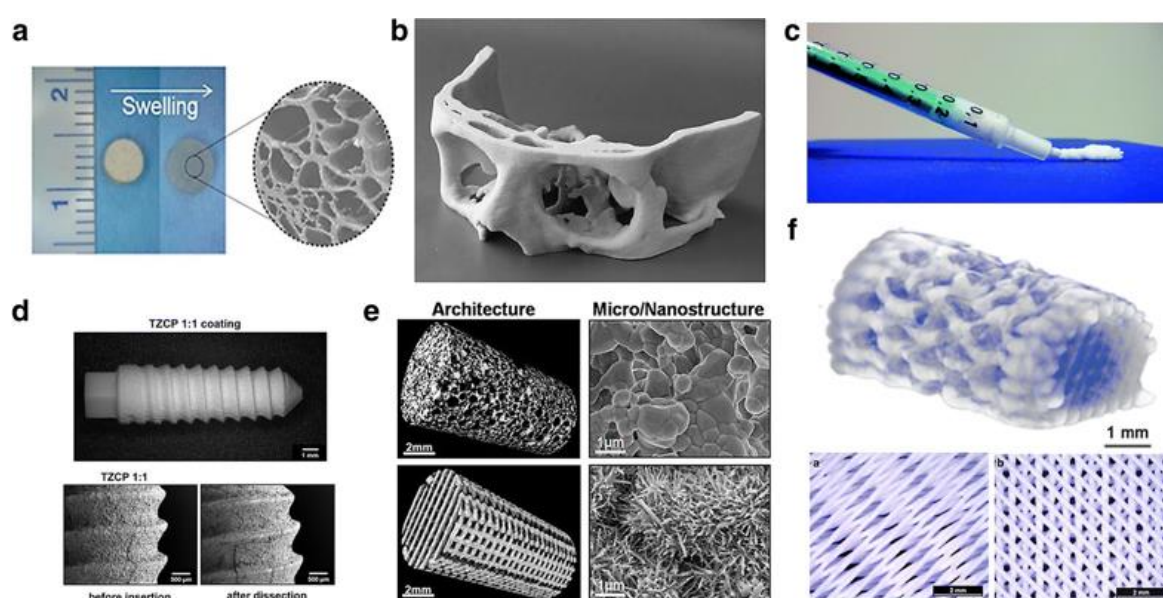
Zgodnie z konferencją Europejskiego Towarzystwa Biomateriałów „Biomaterials Consensus Conference”, która odbyła się w 1986 roku, biomateriał jest zdefiniowany jako materiał lub substancja, która może być użyta samodzielnie lub do wytworzenia wyrobu

medycznego przeznaczonego do interakcji z tkankami ludzkimi w celu monitorowania funkcji organizmu lub leczenia stanów patologicznych ciała. Biomateriał może być pozyskany z organizmów żywych lub otrzymany z materiałów nieożywionych. Pierwsze z nich nazywane są przeszczepami, a drugie implantami (Eliasz i Metoki, 2017). Według definicji zaproponowanej przez „Biomaterials Consensus Conference II” „biomateriał to materiał przeznaczony do oddziaływań z układami biologicznymi w celu oceny, leczenia, wzmocnienia lub zastąpienia dowolnej tkanki, narządu lub funkcji organizmu” (Leali i Merolli, 2009). Biomateriały muszą cechować się wieloma właściwościami. Idealny, syntetyczny substytut tkanki twardej powinien być:

- bioaktywny – zdolny do wytrącania się w reakcji biologicznej lub wywierania wpływu na żywe komórki,
- biokompatybilny – powodujący pożądane interakcje z organizmem gospodarza po implantacji,
- biostabilny – utrzymywany w odpowiedniej formie w żywym organizmie,
- osteointegrowalny – łatwo wbudowujący się w naturalną tkankę kostną,
- osteokondukcyjny – wspomagający proces tworzenia się nowej tkanki kostnej, stanowiący rusztowanie dla tworzenia się nowej kości wspomagając zasiedlanie i dojrzewanie nowych osteoblastów,
- osteoindukcyjny – stymulujący niezróżnicowane komórki do rozwoju w linię komórek kościotwórczych,
- bioabsorpcyjny – degradowalny w długim okresie czasu, aby stworzyć przestrzeń dla nowych tkanek,
- zwilżalny – przyciągający cząsteczki wody,
- stabilny fazowo – zapobiegający uszkodzeniom mechanicznymi
- krystaliczny – zapewniający odporność mechaniczną i niską rozpuszczalność w płynach ustrojowych.

Ponadto, z medycznego punktu widzenia pożądanymi właściwościami są takie, które pozwalają na wykorzystanie materiału jako nośnika terapeutycznego (przechowywanie leku i czynnika wzrostu z możliwością kontrolowania procesu uwalniania) oraz bioaktywnego czynnika utrwalającego (tworzącego wiązania chemiczne pomiędzy powierzchnią biomateriału i naturalną kością oraz minimalizującego tworzenie się włóknistych torebek). W zależności od zastosowania biomateriały mogą być wykonane z polimerów, metali, ceramiki, a także materiałów kompozytowych (Fazel-Rezai, 2011; Hassan *et al.*, 2015).

Zastosowanie bioceramiki obejmuje całkowitą lub częściową odbudowę kości, wypełnianie kości i zębów czy tworzenie powłok ochronnych w ortopedii i implantach dentystycznych. Spośród różnych form fosforanów wapnia, **hydroksyapatyt (HA)** wydaje się najbardziej atrakcyjny ze względu na swoje podobieństwo do nieorganicznego składnika kości i zębów. Ze względu na **niską toksyczność, dobrą biozgodność i bioaktywność** HA jest najczęściej stosowanym biomateriałem w ortopedii, stomatologii i chirurgii szczękowo-twarzowej. Może być stosowany w postaci proszku, bloków porowatych oraz kompozytów z biopolimerami wypełniającymi ubytki kostne. Powłoki hydroksyapatytowe są często wytwarzane na powierzchni implantów metalowych w celu zwiększenia ich biokompatybilności (rys. 2.4) (Narayanan *et al.*, 2008; George *et al.*, 2022; Litak *et al.*, 2022; Pani, Ranjan Behera i Roy, 2022).



Rys. 2.4. Przykłady implantów na bazie fosforanów wapnia: **a)** rusztowanie hydrożelowe zawierające HA, **b)** fragment czaszki wykonany z fosforanu czterowapniowego i β -TCP, **c)** pasta zawierająca nanocząstki fosforanów wapnia służąca do wstrzykiwania, **d)** mieszany fosforan wapniowo-cyrkonowy na implancie dentystycznym, **e)** rusztowania HA z niedoborem Ca (nadruk 3D), **f)** cementowy fosforan wapnia z nadrukiem 3D (Jeong *et al.*, 2019).

Stwierdzono, że właściwości strukturalne i powierzchniowe, w tym mikroporowatość, wielkość kryształów i związana z tym powierzchnia właściwa biomateriałów, odgrywają decydującą rolę w procesie osteoindukcji (Habraken *et al.*, 2016; Chauhan i Bhatt, 2022). Wykazano, że nanocząsteczkowy hydroksyapatyt jest bardziej odpowiedni do zastosowań biomedycznych niż hydroksyapatyt wielkości mikrometrów (Kuśnieruk *et al.*, 2016). Na przykład, hydroksyapatyt o średnicy około 20 nm miał najlepszy wpływ na promocję wzrostu komórek i hamowanie apoptozy komórek osteoblastopodobnych w porównaniu z cząstkami o średnicy 80 nm i mikrocząstkami (Shi

et al., 2009). Wykazano jednak, że nie tylko wielkość kryształów, ale także porowatość jest ważnym czynnikiem wpływającym na optymalną odpowiedź biologiczną. Wykazano, że *mikropory* (około 1–10 mm) i *makropory* (>100 mm) mają korzystny wpływ na tworzenie kości, zapewniając odpowiednią przestrzeń sprzyjającą wzrastaniu kości. Makropory zwiększają tworzenie i mineralizację osteoidów poprzez zwiększenie migracji osteoblastów i osteoprogenitorów do rusztowania tkankowego, podczas gdy połączone mikropory ułatwiają unaczynienie i dyfuzję składników odżywczych podczas odbudowy kości (Jakus, Rutz i Shah, 2016; Liu *et al.*, 2016). Pomimo wielu zalet stosowania HA jako materiału zastępującego kość, nadal istnieją pewne istotne wady, takie jak długi okres rekonwalescencji czy infekcje bakteryjne po przeszczepach (Eliaz i Metoki, 2017; Litak *et al.*, 2022).

Wiadomo również, że fosforany wapnia są dobrym adsorbentem dla wielu biomolekuł. Nanocząstki hydroksyapatytu są powszechnie uważane za materiał o mocno rozwiniętej powierzchni właściwej. Duży stosunek powierzchni do objętości i wyjątkowa zdolność adsorbowania różnych związków chemicznych na powierzchniach HA sprawiają, że jest to obiecujący **system dostarczania leków** (Ain *et al.*, 2020; Munir *et al.*, 2022). HA może być skutecznym nośnikiem leków, takich jak antybiotyki, hormony, czynniki wzrostu i inne. W konsekwencji zwiększa się skuteczność zabiegu i skraca się czas rekonwalescencji. W połączeniu z nietoksycznością, biokompatybilnością, osteointegracją, osteokonduktywnością i stabilnością, hydroksyapatyt jest obiecującym materiałem jako system dostarczania środków farmaceutycznych lub biologicznych z kontrolowanym uwalnianiem substancji aktywnej. Wszystkie biomateriały stosowane jako nośniki leków, poza nietoksycznością i biozgodnością, muszą umożliwiać uwalnianie leku w miejscu docelowym oraz charakteryzować się dobrze kontrolowanym i regulowanym profilem uwalniania (Lai *et al.*, 2016).

Precyzyjne podawanie do miejsca objętego chorobą oraz przedłużone uwalnianie leków pozwalają na skrócenie wydłużonych terapii i mogą przyspieszyć proces gojenia kości oraz zminimalizować zakres chirurgicznego usunięcia zmienionej kości. Udowodniono, że HA może stanowić platformę nośnikową dla takich leków jak: *antybiotyki* (Kolanthai *et al.*, 2016), *leki przeciw osteoporozie* (Khajuria *et al.*, 2016) *przeciwnowotworowe* (Li *et al.*, 2016), *leki przeciwzapalne* (Öner *et al.*, 2011) oraz inne, jak *witaminy*, *hormony*, *białka* czy *czynniki wzrostu* (Lai *et al.*, 2016). Leki mogą oddziaływać z powierzchnią HA poprzez wiązania kowalencyjne i wodorowe. Grupy hydroksylowe obecne w hydroksyapatycie mogą wiązać cząsteczki leku zawierające grupy -OH poprzez interakcje wiązań wodorowych, a tym samym poprawiać zdolność ładowania leku oraz profil uwalniania (Lai *et al.*, 2016).

W ostatnim czasie niezwykle ważne są badania nad systemami dostarczającymi antybiotyki bezpośrednio do tkanek twardych (niezbędna profilaktyka podczas operacji kości). Wiadomo, że **infekcje bakteryjne** stanowią poważny problem w regeneracji tkanki kostnej, dlatego istotne jest włączenie właściwości antybakteryjnych w rusztowania kostne. Powierzchnia hydroksyapatytu może być potencjalnym podłożem do adhezji bakterii i grzybów. Po implantacji może zostać skolonizowana przez gatunki bakterii, zwiększając tym samym możliwość rozwoju biofilmu bakteryjnego. W celu zapobiegania zakażeniu mikroorganizmami chorobotwórczymi stosuje się biobójcze jony metali lub antybiotyki. W przypadku długotrwałego stosowania antybiotyków mikroorganizmy mogą uodpornić się na ich działanie. Wykazano jednak, że impregnacja struktury HA jonami metali takich jak Ag, Sr, Zn, Cu może wzmocnić jego właściwości antybakteryjne (Ewald *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2012; Radovanović *et al.*, 2012; Szcześ, Hołysz i Chibowski, 2017; Munir *et al.*, 2022).

Badania *in vitro* wykazały, że w porównaniu z nanocząstkami HA kompozyty biopolimer/hydroksyapatyt mogą modulować profil uwalniania leku poprzez wydłużenie tego okresu (Uskoković i Desai, 2014; Wei *et al.*, 2015). Dlatego bioceramika jest często łączona z biokompatybilnymi polimerami w celu zapewnienia kontrolowanego dostarczania leków (Dubnika *et al.*, 2017). Jako powłoki HA stosuje się dwa rodzaje polimerów: *naturalne* i *syntetyczne*. Polimery naturalne, takie jak *chitozan*, *żelatyna*, *alginian*, *kolagen*, *kwasy hialuronowy* wykazują dobre powinowactwo do komórek (Szcześ, Hołysz i Chibowski, 2017). Ze względu na małą stabilność w kwaśnym środowisku żołądka hydroksyapatyt jest stosowany głównie w chorobach kości w ortopedii, takich jak osteoporoza, nowotwory i przerzuty do kości, a także w stomatologii, a nie w doustnych systemach terapeutycznych. Wykazano, że markocząsteczka polimeru może również wystarczająco stabilizować nanocząsteczki HA (Kong *et al.*, 2016).

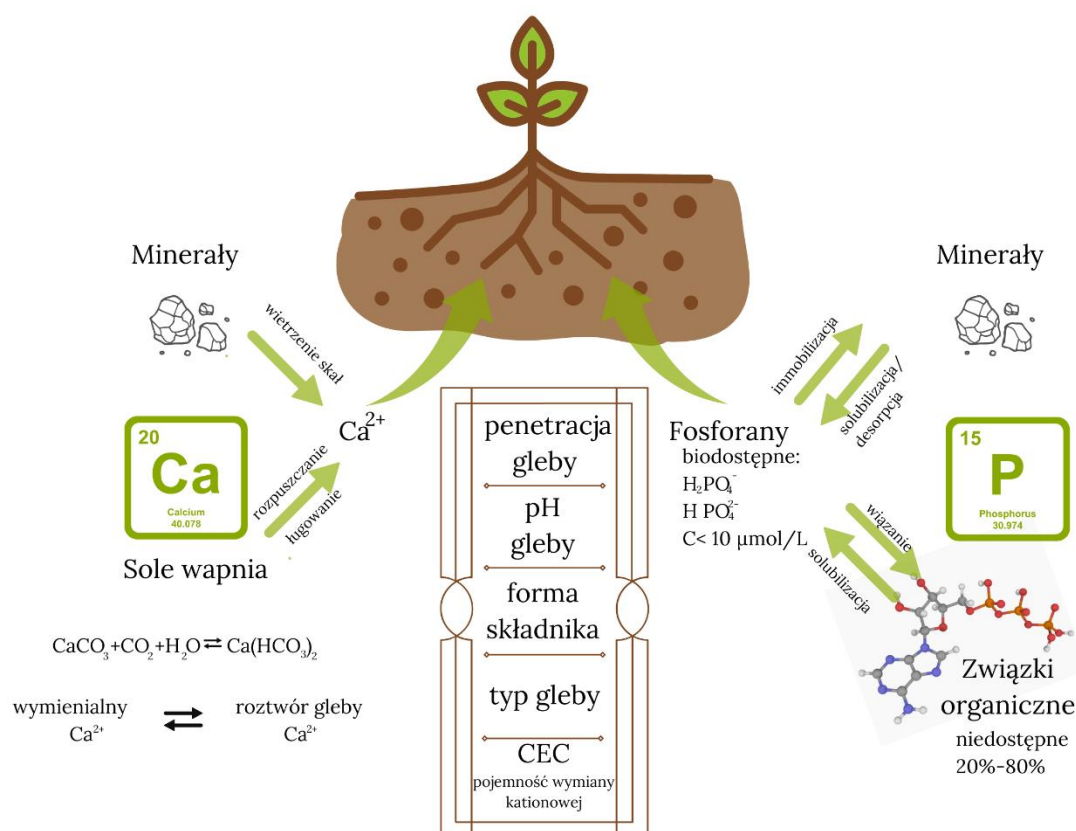
Nową koncepcją jest przygotowanie tzw. „**dual-control release systems**”, które umożliwiają dostarczanie czynników bioaktywnych dla różnych chorób lub np. dwóch lub więcej antybiotyków w celu wzmocnienia ich synergistycznego działania. Konstruowanie skutecznych nośników leków to jedno z wyzwań współczesnej chemii, technologii ceramicznej i inżynierii materiałowej.

Fosforany wapnia uważane są za materiały atrakcyjne nie tylko pod względem poprawy stanu zdrowia pacjentów, ale także ochrony środowiska. Wiele doniesień wskazuje na możliwość wykorzystania ich do **usuwania metali ciężkich ze ścieków** (Nzihou i Sharrock, 2010; Barakat, 2011; Hegazi, 2013; Núñez *et al.*, 2019; Hernández-Cocoletzi *et al.*, 2020; Kalbarczyk, Szcześ i Sternik, 2021; Nayak i Bhushan, 2021). Silnie rozwinięta

powierzchnia właściwa i wiele grup funkcyjnych pozwalają na adsorpcję z zadowalającą wydajnością różnych zanieczyszczeń metalami ciężkimi ze zbiorników wodnych poprzez wymianę jonową lub mechanizmy rozpuszczania-wytrącania z roztworów pojedynczych jonów metali. Udowodniono, że materiały złożone z HA mogą skutecznie usuwać jony takich metali jak ołów, miedź czy kadm z roztworów zawierających jony jednego metalu w środowisku wodnym, jak również preferencyjną adsorpcję jonów ołowiu z roztworów zawierających jony wielu metali (Nzihou i Sharrock, 2010).

Mechanizm wymiany jonowej polega na zastąpieniu w sieci krystalicznej jonu wapnia jonem innego metalu dwuwartościowym bez silnego wpływu na strukturę materiału. Substytucja powoduje uwalnianie jonów wapnia zarówno z powierzchni, jak i z wnętrza materiału. Ponadto, stabilność materiału na bazie hydroksyapatytu w środowisku kwaśnym była większa po procesie. Proces rozpuszczania-wytrącania jest związany z rozpuszczaniem fosforanów wapnia. Pierwszym etapem tego mechanizmu jest rozpad fosforanu wapnia w środowisku wodnym, po którym następuje wytrącenie trudno rozpuszczalnych soli jonów metali ciężkich. Ponadto, podkreślić należy nieinwazyjny i przyjazny dla środowiska charakter jego stosowania. Istnieją jednak oczywiste ograniczenia i nadal zauważalna jest potrzeba udoskonalenia tego materiału przed zastosowaniem go na skalę komercyjną. Współczesne badania powinny koncentrować się na zwiększeniu porowatości i funkcjonalności powierzchni, zwiększeniu stabilności i dostosowaniu właściwości mechanicznych materiału, co powinno poprawić selektywność, pojemność sorpcyjną i kinetykę sorpcji, zwłaszcza w odniesieniu do roztworów zawierających jony wielu metali w obecności różnych substancji zakłócających.

Kolejną dziedziną, w której właściwości fosforanów wapnia są uważane za pożądane, jest rolnictwo, gdzie fosforany wapnia mogą być stosowane jako **nawóz mineralny** (Gypser i Freese, 2020; Maghsoodi *et al.*, 2020; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020). Zarówno wapń, jak i fosfor są makroelementami niezbędnymi do rozwoju i wzrostu roślin, jednak forma chemiczna, w jakiej występują, wpływa na ich dostępność dla organizmów żywych (Maathuis, 2009). Ponieważ transport niezbędnych składników odżywczych jest złożonym i skomplikowanym procesem, wiele parametrów gleby, m. in. temperatura, rodzaj gleby, pH czy wiatr, dostępna przestrzeń i inne, mają wpływ na pobieranie składników pokarmowych (rys. 2.5).



Rys. 2.5. Dostępność wapnia i fosforu dla roślin w naturalnym ekosystemie.

Ze względu na swoją rozpuszczalność zastosowanie nanocząstek fosforanów wapnia może być skutecznym sposobem zaopatrzenia gleby w fosforany, a tym samym utrzymania produktywności upraw. Głównym problemem przy nawożeniu gleb jest tendencja fosforanów do wytrącania się i przekształcania w nierozpuszczalne sole, co znacznie ogranicza ich biodostępność. W rezultacie w glebach gromadzi się duża zawartość bezużytecznych dla roślin związków fosforu. Dlatego też, gdy te rezerwy nie są wykorzystywane przez rośliny, związki fosforu mogą przedostawać się do zbiorników wodnych i powodować eutrofizację oraz zanieczyszczenie wód powierzchniowych i podziemnych. Ze względu na dużą zawartość fosforanów w formie dostępnej dla roślin, fosforany wapnia wydają się być idealnym rozwiązaniem w zakresie precyzyjnie kontrolowanego dostarczania makroskładników. Innym problemem jest ruchliwość cząstek. Korzystne wydaje się stosowanie nanocząstek, ponieważ eliminuje to problemy z dotarciem do strefy korzeniowej i zapobiega wydłużającej się w czasie nityfikacji roślin.

2.3. Dwufazowe fosforany wapnia

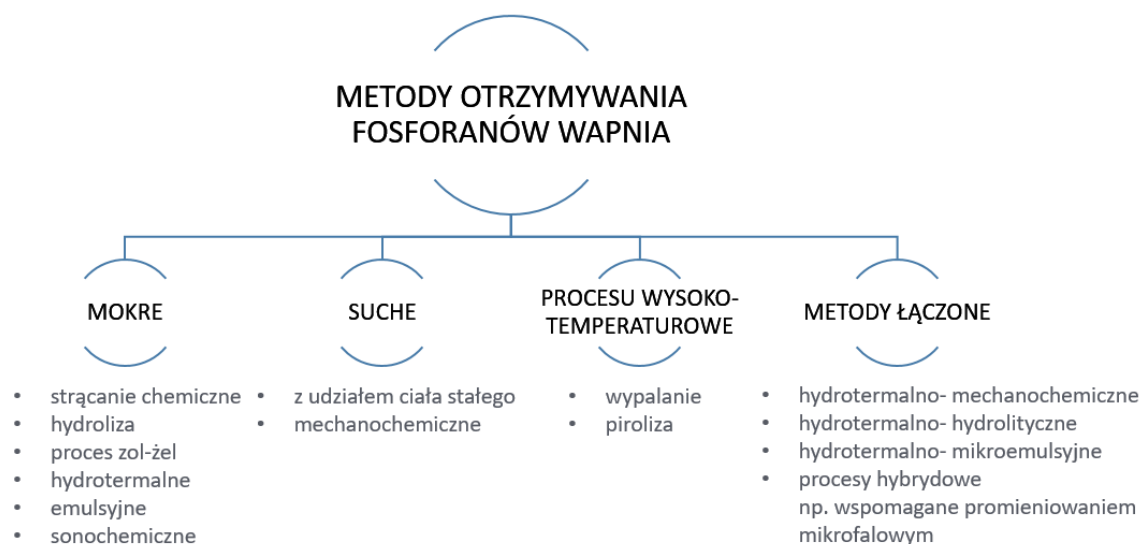
Szeroki zakres badań nad fosforanami wapnia pod kątem ich wykorzystania jako materiału kościozastępczego ujawnił przewagę materiałów dwufazowych, stanowiących

głównie mieszaninę HA i β -TCP w różnym stosunku, nad czystymi materiałami jednofazowymi (Basu i Basu, 2019). Trend badań nad opracowywaniem **materiałów dwufazowych składających się z HA i β TCP** w różnych stosunkach molowych, rozpoczął się pod koniec lat 80 XX wieku jako odpowiedź na syntetyczne przeszczepy kostne o zmieniającym się tempie resorpcji. Główny cel stanowiło połączenie zalet tych dwóch form krystalicznych i otrzymanie produktu, który będzie charakteryzował się stabilnością hydroksyapatytu, natomiast biorąc pod uwagę rozpuszczalność β -TCP forma ta będzie donorem jonów podczas biomineralizacji (Bouler *et al.*, 2017). Ponadto, resorpcję i bioaktywność takiego materiału można kontrolować za pomocą stosunku molowego HA/ β -TCP oraz zmian ich krystaliczności. Osteokonduktywność i osteoindukcyjność dwufazowych fosforanów wapnia były szeroko badane i wykazano, że wysoki potencjał osteoindukcyjny zależy od uwalniania Ca^{2+} z analizowanego materiału. Im więcej kationów wapnia jest uwalnianych, tym większy jest potencjał osteoindukcyjny materiału dwufazowego (Gallinetti, Canal i Ginebra, 2014). Udowodniono, że ze względu na kinetykę tworzenia nowej kości najlepsze właściwości wykazuje mieszanina złożona z 20% HA i 80% β -TCP (Eliaz i Metoki, 2017). Ponadto, otrzymany produkt ma wysoko rozwiniętą powierzchnię właściwą, co jest pożądane z aplikacyjnego punktu widzenia do wykorzystania jako adsorbentu niebezpiecznych zanieczyszczeń jonami metali ciężkich, a także jako środka dostarczającego farmaceutyki. Charakterystyczna struktura i różnica rozpuszczalności obu faz jest atrakcyjna także ze względu na zastosowanie jako nawóz (Carella *et al.*, 2021).

2.4. Metody otrzymywania fosforanów wapnia

W literaturze opisano wiele metod otrzymywania fosforanów wapnia w skali laboratoryjnej. Można je ogólnie sklasyfikować jako (Sadat-Shojai *et al.*, 2013; Kumar i Mohanty, 2022) (rys. 2.6):

- metody suche z udziałem ciała stałego i mechanochemiczne,
- metody mokre polegające na strącaniu chemicznym, hydrolizie, procesie zol-żel, hydrotermalne, emulsyjne i sonochemiczne,
- procesy wysokotemperaturowe w tym metoda wypalania i pirolizy,
- metody łączone.



Rys. 2.6. Klasyfikacja głównych metod otrzymywania fosforanów wapnia.

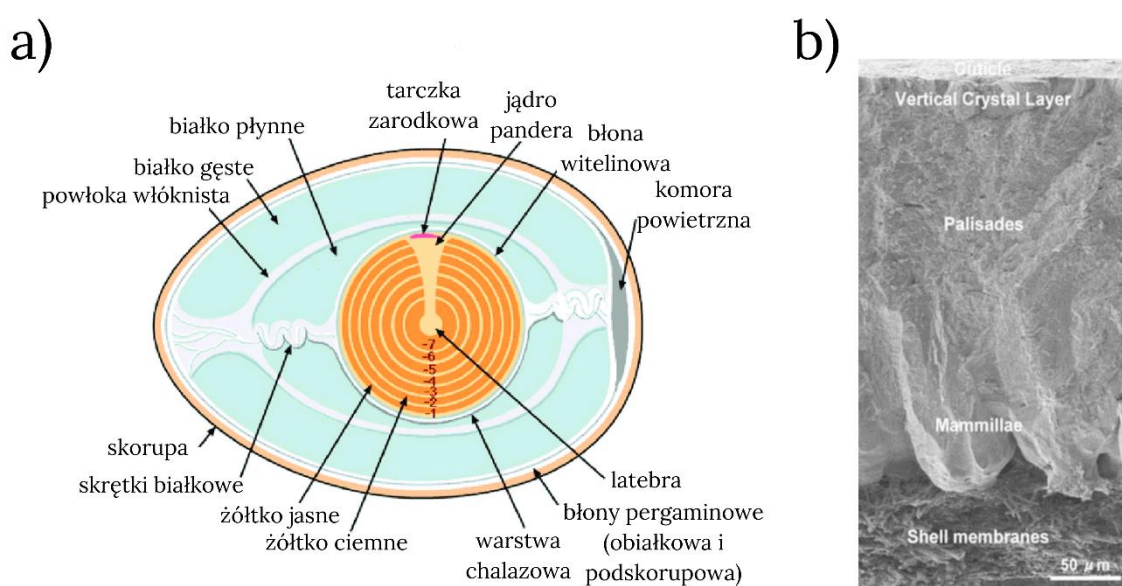
Według doniesień literaturowych, produkty tych syntez to w większości materiały zawierające jedną formę krystaliczną (jednofazowe). Ich struktura zależy od warunków prowadzenia procesu oraz zastosowanej metody syntezy i użytych odczynników. Głównym celem prowadzonych badań było otrzymanie czystego hydroksyapatytu w kształcie kwiatków („flower-like”) lub igieł („needle-like”). W pierwszej kolejności badania koncentrowały się na wykorzystaniu substancji syntetycznych, gdzie donorem wapnia był w większości CaCO_3 , a jako źródło fosforu zastosowano sole rozpuszczalne w wodzie, takie jak m.in. wodorofosforan disodowy Na_2HPO_4 . Obecnie nowym i ważnym aspektem w rozwoju metod syntezy biomateriałów jest wykorzystanie materiałów pochodzących ze źródeł niekonwencjonalnych. Biomateriały ceramiczne można syntetyzować za pomocą donorów wapnia pochodzących z zasobów naturalnych (Akram *et al.*, 2014; Bee i Hamid, 2020; Kumar i Mohanty, 2022), np. kości ryb (Milovac *et al.*, 2014; Sunil i Jagannatham, 2016), muszli morskich (Pal *et al.*, 2017), skorupki jaj (Goloshchapov *et al.*, 2013; Sajahan i Wan Ibrahim, 2014; Padmanabhan *et al.*, 2015; Adeogun *et al.*, 2018; Azis *et al.*, 2018), kości ssaków, takich jak bydło lub świnie (Heidari *et al.*, 2015; Maleki-Ghaleh *et al.*, 2016), skorupki krewetek (Heidari *et al.*, 2015), muszli ślimaków (Suresh Kumar *et al.*, 2015) czy kości drobiowych m.in. indyka (Esmailkhanian *et al.*, 2019).

2.5. Wykorzystanie skorupki jaj ptasich do otrzymywania fosforanów wapnia

Obecnie uważa się, że jajo ptasie reprezentuje najbardziej zaawansowane jajo owodniowe u kręgowców jajorodnych (rys. 2.7a). Skorupka stanowi złożoną bioceramikę regulującą wymianę gazów metabolicznych i wody, a jej właściwości są znakomicie dopasowane do środowiska życia danego gatunku. Skorupka jaja składa się z węglanu

wapnia (96%), materii organicznej (2%), magnezu, fosforu i różnych pierwiastków śladowych (2%). Jej struktura składa się z trzech warstw: wewnętrznej warstwy ciała sutkowego/stożka (mammillae), najgrubszej warstwy palisadowej oraz przejściowej pionowej warstwy krystalicznej na zewnątrz (rys. 2.7b). Powierzchnia skorupki pokryta jest niezwapniałą warstwą kutykuli. Przejściowa, wewnętrzna warstwa kutykuli zawiera kuliste agregaty hydroksyapatytu (Hincke *et al.*, 2012)

Skorupka jaja ptasiego to porowata bioceramika powstająca w temperaturze ciała w środowisku wolnym od komórek. Jej tworzenie jest jednym z najszybszych znanych procesów wapnienia w biologii. Skorupka jaja powstaje w wyniku kontrolowanego wytrącania węglan wapnia na włóknach błony zewnętrznej (Hincke *et al.*, 2012).



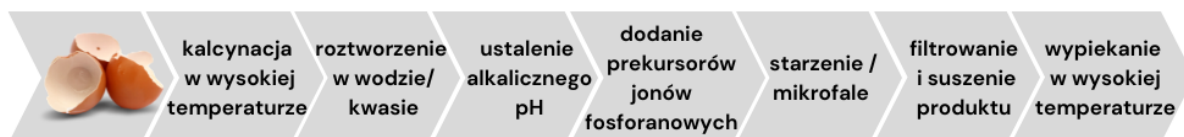
Rys. 2.7. a) Budowa jaja kurzego (Adegbenjo, Liu i Ngadi, 2020), **b)** zdjęcie SEM skorupki jaja ptasiego pokazujące ogólną strukturę i obszary zwapnionej skorupy jaja, które tworzą się na błonach pergaminowych podczas cyklu składania jaj (Hincke *et al.*, 2012).

Błony pergaminowe zbudowane są w około 10% z kolagenu (typu I, V i X) i w 70-75% z innych białek i glikoprotein zawierających pochodne lizyny. Błony wewnętrzne pozostają niezwapnione, natomiast włókna błony zewnętrznej ulegają mineralizacji w dyskretnych miejscach i zostają włączone w podstawę skorupki jajka (Hincke *et al.*, 2012; Torres, Troncoso i Montes, 2013).

Biorąc pod uwagę ilość jaj kurzych wyprodukowanych w 2020 roku (*Production of eggs worldwide, 2020, 2022*) oraz zakładając, że skorupka stanowi około 11% masy jaja, ilość skorupki jaj wyprodukowanych na świecie wynosiła około 10 milionów ton metrycznych. Tylko czasami skorupki jaj są wykorzystywane jako nawóz lub część diety niektórych zwierząt. Stąd materiał ten jest w zasadzie bezużyteczny i duża jego część uważana jest za odpad rolniczy.

Skorupki jaj ptasich mogą być wykorzystywane jako źródło wapnia w syntezie biomateriałów ceramicznych, takich jak fosforany wapnia. Wykorzystanie tego materiału odpadowego może przynieść podwójną korzyść: utylizację pozostałości organicznych powstających w życiu codziennym oraz produkcję materiału pożądanego ze względu na jego liczne potencjalne zastosowania. Istnieje wiele doniesień potwierdzających możliwość syntezy fosforanów wapnia, głównie hydroksyapatytu, przy użyciu skorupki jaj ptasich (Siva Rama Krishna *et al.*, 2007; Ahmed i Ahsan, 2008; Prabakaran i Rajeswari, 2009; Gergely *et al.*, 2010; Kumar, Thamizhavel i Girija, 2012; Goloshchapov *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Sajahan i Wan Ibrahim, 2014; Ibrahim *et al.*, 2015; Padmanabhan *et al.*, 2015; Bag, Ganguly i Biswas, 2016; Derkus *et al.*, 2016; Adeogun *et al.*, 2018; Azis *et al.*, 2018; Kalbarczyk, Szczeń i Sternik, 2021).

Z doniesień literaturowych wiadomo, że hydroksyapatyt można wytwarzać wykorzystując skorupki jaj ptasich jako bioźródło jonów wapnia. Większość opublikowanych metod przetwarzania skorupki jaj w biomateriał wymaga kalcynacji odpadów naturalnych w piecu wysokotemperaturowym. Ponadto, wielu autorów zastosowało dodatkowe źródło energii w postaci ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe, ze względu na założenie uzyskania czystego HA. Ogólna procedura przekształcania skorupki jaj w HA została przedstawiona na rys. 2.8.



Rys. 2.8. Schemat ogólny procedury syntezy hydroksyapatytu z wykorzystaniem skorupki jaj kurzych.

Skorupki jaj poddawano procesowi kalcynacji i rozpuszczano w wodzie lub kwasie. Później ustalano wyjściowe pH, przeważnie w zakresie od 9 do 12. Następnie stosowano źródło fosforu w postaci np. roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Większość eksperymentów wymagała dodatkowego nakładu energii, takiego jak spiekanie w wysokiej temperaturze (Ahmed i Ahsan, 2008; Prabakaran i Rajeswari, 2009; Ibrahim *et al.*, 2015), starzenie lub suszenie osadu w wysokiej temperaturze (Öner i Doğan, 2005; Szczeń, Hołysz i Chibowski, 2017) lub poddanie działaniu promieniowania mikrofalowego (Iqbal *et al.*, 2012).

Morfologia otrzymanych materiałów waha się od heksagonalnych kryształów (Azis *et al.*, 2018), aglomeratów o morfologii sferolitów złożonych z płytek o wymiarach nanometrów (Bag, Ganguly i Biswas, 2016), małych igielkowatych kryształów (Derkus *et al.*, 2016), globulek składających się z nanokryształów o średniej wielkości około 30 nm (Goloshchapov *et al.*, 2013) aż do mieszaniny kształtu kulistego, heksagonalnego

i cylindrycznego będącego kombinacją fazy amorficznej i krystalicznej (Ahmed i Ahsan, 2008). Ibrahim wraz z zespołem (Ibrahim *et al.*, 2015) otrzymali gąbczaste mezoporowate cząstki hydroksyapatytu o dużej powierzchni właściwej ($281,4 \text{ m}^2/\text{g}$) stosując kwas fosforowy(V) w temperaturze pokojowej. Prabakaran i Rajeswari (Prabakaran i Rajeswari, 2009) wykorzystali kwas fosforowy(V) i bromek heksadecylotrimetyloamoniowy w stężeniu odpowiadającym CMC (krytycznemu stężeniu micelizacji) jako organiczną matrycę do zarodkowania HA i stosując metodę hydrotermalną uzyskali dobrze skrytalizowane nanocząstki o jednolitym kształcie. Wu i jego współpracownicy (Wu *et al.*, 2013) zastosowali różne szablony biocząsteczkowe do syntezy nanostruktur HA przypominających igły, które przekształciły się w nanostruktury przypominające pręty, gdy czas syntezy hydrotermalnej został wydłużony.

W literaturze opisano także kilka metod syntezy dwufazowych fosforanów wapnia. Najczęściej dwufazową kompozycję uzyskuje się za pomocą techniki spiekania w wysokiej temperaturze fosforanów ubogich w wapń jako materiał wyjściowy (Daculsi *et al.*, 1989; Tadic, Peters i Epple, 2002; LeGeros *et al.*, 2003; Zyman, Tkachenko i Polevodin, 2008). Istnieją również inne metody stosowane do produkcji dwufazowych fosforanów wapnia, jak reakcja w stanie stałym w wysokiej temperaturze z wykorzystaniem dwuwodnego fosforanu wapnia (DCPD-bruszytu) (Tadjiev, Chun i Kim, 2007) lub fosforanu monowapniowego jednowodnego - MCPM (Hsu, 2003) i węgla wapnia. Jednak zdecydowana większość opisanych metod wymaga zastosowania pieca wysokotemperaturowego, a co za tym idzie dużego nakładu energii, co jest niekorzystne z ekologicznego punktu widzenia.

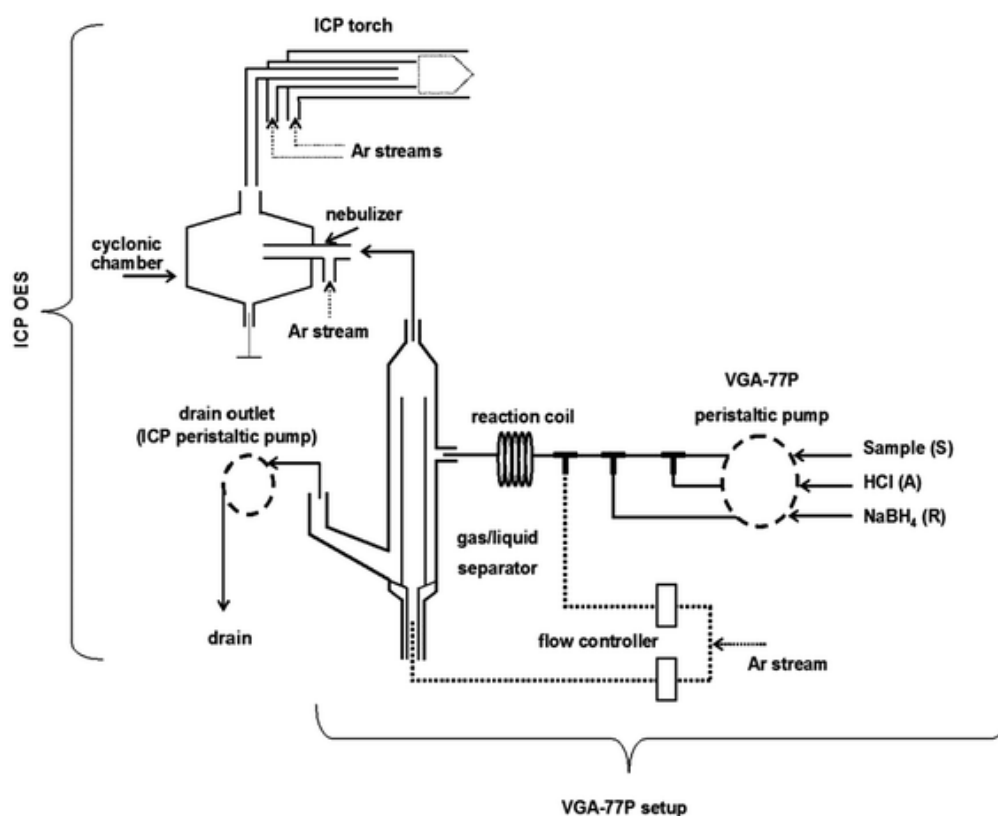
Ze względu na dużą liczbę potencjalnych zastosowań fosforanów wapnia pożądane jest nadanie ich powierzchniom właściwości antybakteryjnych. Zastąpienie kationów wapnia w sieci krystalicznej innymi kationami metali wydaje się idealnym sposobem na poprawę ich działania przeciwdrobnoustrojowego. Ponadto, taka modyfikacja może pozytywnie wpłynąć na właściwości mechaniczne wyrobu. Wiele doniesień wskazuje na możliwości wprowadzenia kationów takich metali jak kobalt (Veljovic *et al.*, 2019; Yazdani *et al.*, 2019), srebro (Díaz *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2019), stront (Zhang *et al.*, 2010), magnez (Xue *et al.*, 2008; Veljovic *et al.*, 2019) czy cynk (Xue *et al.*, 2008; Ofudje *et al.*, 2019). Powszechnie wiadomo, że cynk ma właściwości przeciwbakteryjne i jest stosowany na powierzchni implantów dentystycznych, a także jako dodatek w produktach do codziennej pielęgnacji jamy ustnej (Zhang *et al.*, 2021). Materiały domieszkowane cynkiem wykazują nie tylko właściwości antybakteryjne. Wykazano, że cynk odgrywa ważną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak aktywność enzymatyczna i hormonalna, synteza DNA oraz proces biomineralizacji. Liczne doniesienia naukowe wskazują na

wspomagający wpływ cynku w procesie regeneracji kości. Ponadto, cynk w odpowiednim stężeniu wykazuje właściwości niecytotoksyczne i jest uważany za bezpieczny dla zdrowia człowieka (Kolmas, Groszyk i Kwiatkowska-Różycka, 2014).

3. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA STOSOWANYCH TECHNIK ANALITYCZNYCH

3.1. Emisyjna atomowa spektrometria z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES lub ICP-AES) oraz spektroskopia masowa z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-MS)

Emisyjna atomowa spektrometria z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES lub ICP-AES), jest popularną, destrukcyjną metodą analityczną służącą do oznaczania pierwiastków z roztworów, którą można zastosować do analizy różnorodnych próbek. Na rys. 3.1 przedstawiono schemat działania przyrządu ICP-OES. Typowy ICP składa się z trzech koncentrycznych rurek kwarcowych. Są one często określane jako "zewnętrzna", "pośrednia" i "wewnętrzna". Rurka zewnętrzna może mieć różne rozmiary w zakresie od 9 do 27 mm. Dwu- lub trzyobrotowa cewka indukcyjna otacza górną część rury kwarcowej lub palnika i jest podłączona do generatora częstotliwości radiowej. Cewka jest chłodzona wodą.



Rys. 3.1. Schemat budowy spektrometru z indukcyjnie sprzężoną plazmą (Welna, Szymczycha-Madeja i Pohl, 2017).

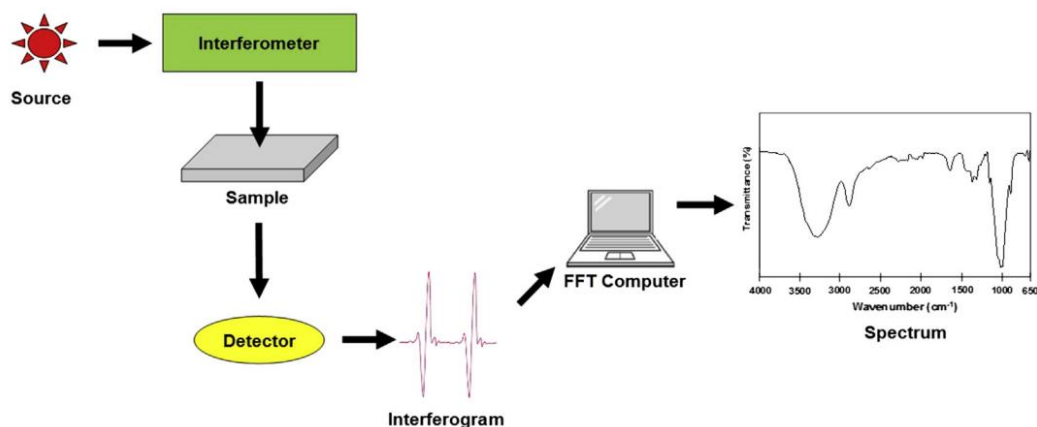
Gaz nośny, argon, zwykle w tempie przepływu około 1-2 L/min, jest wprowadzany do palnika, a pole fal radiowych działa przy częstotliwości od 4 do 50 MHz i mocy wyjściowej od 1 do 5 kW. Wokół cewki powstaje intensywne pole magnetyczne, a iskra z cewki Tesli służy do wytworzenia w tym regionie "nasion" elektronów i jonów.

Ten indukowany prąd, płynący w zamkniętej, kołowej ścieżce, powoduje duże nagrzewanie gazu argonowego i wytwarzanie lawiny jonów. Temperatury w ICP zostały oszacowane na około 8000-10000 K. Wysokie temperatury wymagają chłodzenia, które jest uzyskiwane poprzez przepływ argonu zewnętrznymi rurami z szybkością do 17 L/min. Próbkę, najlepiej w postaci roztworu wodnego, jest wprowadzana do komory ICP za pomocą nebulizatora. W tym elemencie roztwór zostaje rozpylony, a powstały aerozol jest wprowadzany przez wewnętrzną rurkę i zostaje zadozowany do komory znajdującej się 5-20 mm nad cewką. Światło emitowane przez wzbudzone w plazmie atomy jest przekształcane na sygnał elektryczny i najczęściej mierzone ilościowo. Siatka dyfrakcyjna rozdziela światło na jego składowe promieniowanie w celu późniejszego pomiaru natężenia światła przez lampę fotopowielacza. Zalety ICP obejmują odtwarzalność i dokładność pomiaru, długi czas przebywania analitu w komorze, brak absorpcji wewnątrz źródła, brak zakłóceń związanych z obecnością tlenu, możliwość oznaczania trudno wzbudzalnych atomów i niewiele zakłóceń jonizacyjnych (Sneddon i Vincent, 2008).

Zasadniczo, system wprowadzania próbek w ICP-OES i ICP-MS wyglądają podobnie, różnią się natomiast sposobem detekcji analitu. Ważne jest, aby rozróżnić rolę palnika plazmowego w ICP-MS w porównaniu z ICP-OES. W ICP-MS palnik plazmowy, który jest ustawiony poziomo, jest używany do generowania dodatnio naładowanych jonów, a nie fotonów. W rzeczywistości podejmowane są wszelkie próby powstrzymania fotonów przed dotarciem do detektora, ponieważ mają one potencjał do zwiększenia szumu sygnału. To właśnie wytwarzanie i wykrywanie dużych ilości jonów nadają ICP-MS charakterystyczną zdolność do oznaczania śladowych ilości pierwiastków (ppt) – czułość detekcji jest do czterech rzędów wielkości lepsza niż ICP-OES. Wyselekcjonowane jony następnie przechodzą przez filtr masowy zanim dotrą do detektora. Stosunek masy jonu do jego ładunku, jest wyświetlany i oznaczany jako m/z , w zakresie mas 3-250 Daltonów (Sneddon i Vincent, 2008; Thomas, 2008).

3.2. Spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR)

Schemat budowy spektrofotometru z transformacją Fouriera (FTIR) został zilustrowany na rys. 3.2.

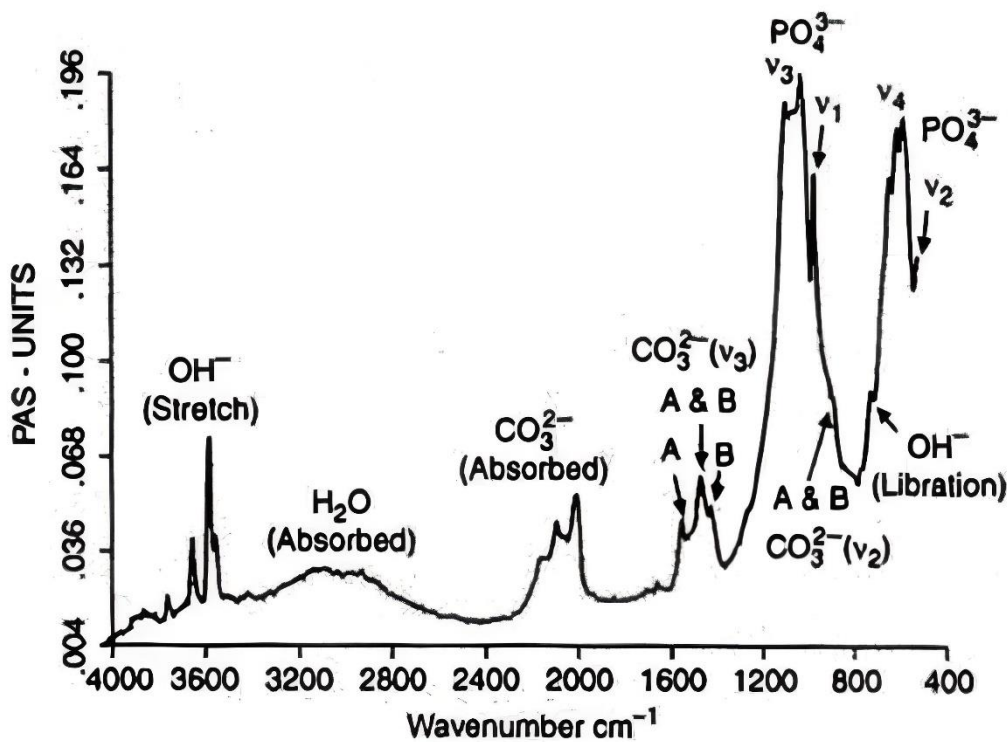


Rys. 3.2. Schemat budowy spektrofotometru FTIR.

Wiązka promieniowania podczerwonego (IR) jest emitowana z jarzącego się źródła, którym najczęściej jest włókno Nernsta rozgrzane elektrycznie do temperatury ok 1500°C. Następnie przechodzi ona przez interferometr (najczęściej stosowanym jest interferometr Michelsona), gdzie jest rozdzielana na dwie wiązki na półprzepuszczalnym zwierciadle. Jedna z wiązek jest kierowana następnie do komory próbki, gdzie analit absorbuje promieniowanie o określonych częstościach (energiach), które odpowiadają częstościom (energiom) drgań wiązań chemicznych. W wyniku interferencji dwóch wiązek o różnych długościach drogi optycznej w interferometrze tworzy się obraz w postaci prążków interferencyjnych. Następnie, detektor mierzy sygnał w funkcji energii dla wszystkich częstości jednocześnie. Zarejestrowane widmo otrzymywane jest po automatycznym odjęciu widma tła od widma próbki za pomocą matematycznej funkcji- transformacji Fouriera (Mohamed *et al.*, 2017). Maksima pików w zakresie częstości 4000-600 cm^{-1} (*mid-infrared*) są obrazem oscylacji wzbudzonych wiązań grup funkcyjnych wchodzących w skład analizowanej próbki. Otrzymane widmo można podzielić na cztery obszary: wiązań pojedynczych w zakresie liczb falowych od 4000-2500 cm^{-1} , wiązań potrójnych w zakresie od 2500-2000 cm^{-1} , wiązań podwójnych od 2000-1500 cm^{-1} oraz obszar daktyloskopowy w przedziale 1500-650 cm^{-1} zawierający charakterystyczne dla danej molekuly sygnały kompleksowe pochodzące od drgań cząsteczki jako całości (Mohamed *et al.*, 2017).

Technika wielokrotnego osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia ATR (*Attenuated Total Reflectance*) pozwala na wyeliminowanie interferencji pochodzących od cząsteczek wody obecnych w próbce. Polega ona na wprowadzeniu wiązki promieniowania IR do materiału o dużej wartości współczynnika załamania światła np. diamentu, który jest całkowicie przezroczysty dla promieniowania w używanym zakresie promieniowania IR. Analizowana próbka jest umieszczana na zewnętrznej powierzchni tego materiału, a wiązka promieniowania ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu gdy wartość kąta pod jakim

pada jest większa od wartości granicznej. Interferencje fali padającej i odbitej powodują powstanie prostopadłej do granicy ośrodków fali stojącej. Wyprowadzona z ośrodka wiązka promieniowania jest następnie kierowana do detektora, gdzie następuje pomiar jej intensywności (Grdadolnik, 2002).



Rys. 3.3. Charakterystyczne widmo spektroskopowe fosforanów wapnia (Berzina-Cimdina i Borodajenko, 2012).

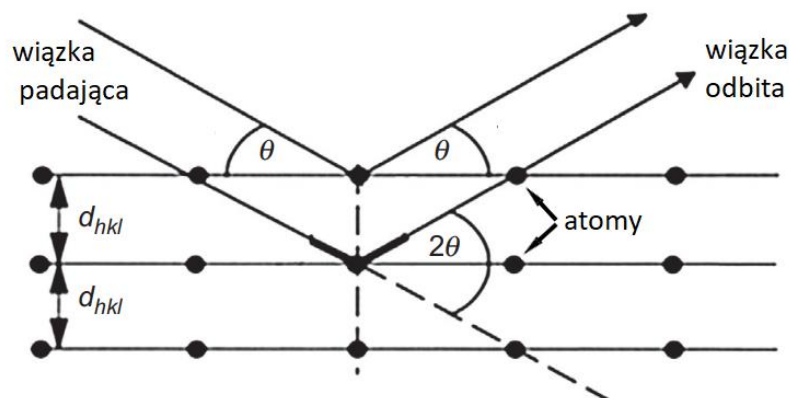
Spektroskopia fourierowska w podczerwieni jest jedną z metod, która pozwala na charakterystykę składu materiałów składających się z fosforanów wapnia (rys. 3.3). Zaletami tej techniki są szybkość analizy, brak konieczności uprzedniego przygotowania próbki do analizy oraz prosta obsługa aparatury. Dodatkowo, w przeciwieństwie do analizy XRD, technika FTIR umożliwi charakterystykę nie tylko substancji krystalicznych, ale także postaci amorficznych, dzięki czemu daje bardziej kompleksową informację o składzie materiału. W odniesieniu do analizy chemicznej materiałów składających się z fosforanów wapnia widmo IR dostarcza użytecznych informacji o lokalizacji pików, ich intensywności, szerokości i kształcie w wymaganym zakresie liczb falowych. Ponadto, jest bardzo czułą techniką określania składu fazowego (Berzina-Cimdina i Borodajenko, 2012).

3.3. Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD)

Rentgenowska dyfraktometria proszkowa XRD opiera się na zdolności kryształów do dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego w charakterystyczny dla siebie sposób

i umożliwia precyzyjne badanie struktury faz krystalicznych. Zarejestrowane wzory dyfrakcyjne zawierają addytywny wkład kilku cech mikro- i makrostrukturalnych próbki, tj.: położenia pików, parametry sieciowe, orientacji płaszczyzn krystalograficznych, grupy przestrzennej, składu chemicznego, czy też makroprzesunięć (Epp, 2016).

Wysokoenergetyczne promieniowanie X, będące falami elektromagnetycznymi o długości fali pomiędzy 10^{-3} a 10^{-1} nm, generowane jest przez elektrony uwalniane w wyniku ogrzewania żarnika wolframowego w lampie próżniowej. Elektrony te są następnie przyspieszane przez wysokie pole elektryczne i kierowane na anodę, gdzie bombardując jej powierzchnię prowadzą do powstania promieniowania hamowania o widmie ciągłym. Dodatkowo, na skutek napięcia pomiędzy anodą i katodą powstają także fotony o charakterystycznych energiach, zwane fotonami rentgenowskimi, tworzące dyskretne linie promieniowania X. Następnie powstałe promieniowanie poddaje się monochromatyzacji pozwalając na filtrowanie i utworzenie wiązki o małym kącie bryłowym. Tak otrzymane promieniowanie jest kierowane na próbkę, która powoduje jego elastyczne rozpraszanie oparte na zjawisku dyfrakcji opisanym prawem Bragga (rys. 3.4).



Rys. 3.4. Schemat dyfrakcji wiązki promieniowania X na płaszczyznach sieciowych (Epp, 2016).

Metoda proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej polega na pomiarze intensywności promieniowania wzmocnienia wiązki fali odbitej w funkcji kąta 2θ . Podczas pomiaru próbka jest obracana o kąt θ , natomiast położenie detektora jest zmieniane o kąt 2θ . Analiza powstałego na skutek pomiaru dyfraktogramu odbywa się poprzez porównanie z bazą danych widm substancji, umożliwiając ich identyfikację.

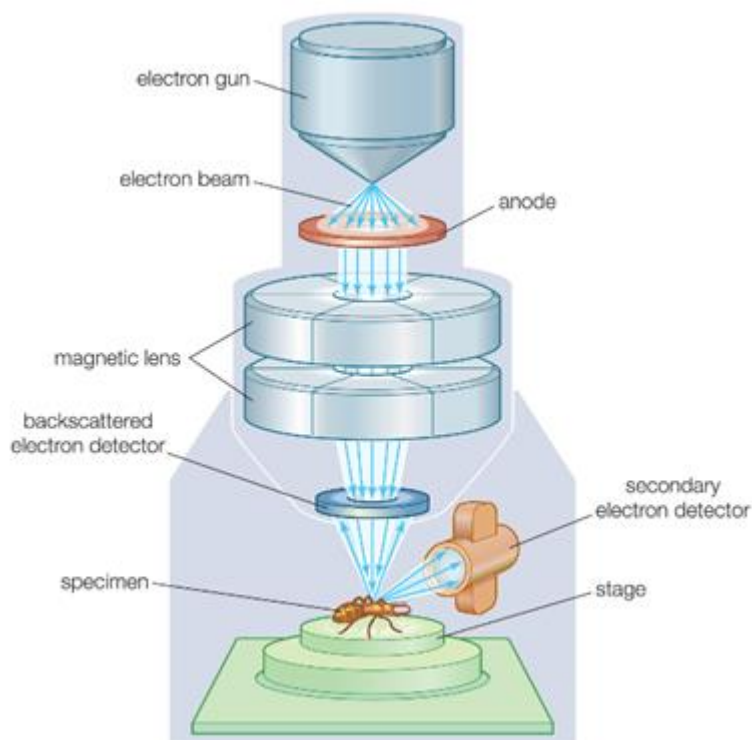
Jest to metoda niedestrukcyjna, pozwalająca na szybką analizę jakościową i ilościową czystych i wieloskładnikowych mieszanin, która wymaga minimalnego przygotowania próbki. Kiedy wiązka promieniowania rentgenowskiego oddziałuje na

materiał krystaliczny, powstają wzory dyfrakcyjne, które odzwierciedlają jego właściwości strukturalno-fizyczno-chemiczne.

Podstawowym zastosowaniem analizy XRD jest identyfikacja materiałów na podstawie ich wzoru dyfrakcyjnego. Oprócz identyfikacji faz, XRD dostarcza również informacji o tym, jak rzeczywista struktura odbiega od idealnej, dzięki naprężeniom wewnętrznym i defektom.

3.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Skaningowa mikroskopia elektronowa to metoda pozwalająca na wykonywanie zdjęć analizowanych materiałów z przybliżeniami nieosiągalnymi dla mikroskopów świetlnych. Obrazowanie wykonywane jest poprzez zastosowanie wiązki elektronów emitowanej przez działko elektronowe, posiadających energię w zakresie 100-30000 eV.



Rys. 3.5. Schemat budowy Skaningowego Mikroskopu Elektronowego (Abbas, 2018).

Układ soczewek elektromagnetycznych kieruje zogniskowane elektrony na próbkę umieszczoną na podstawie wykonanej z materiału nie powodującego interferencji (najczęściej glin lub węgiel). Uzyskane powiększenie obrazu może być regulowane przez odchylenie wiązki elektronów powodujące ruch skokowy. Powierzchnia skanowanej próbki powoduje częściowe rozproszenie elektronów (elektrony BSE), a częściowo jest absorbowana przez powierzchnię powodując emisję elektronów wtórnych (SE), światła w zakresie widzialnym oraz promieniowania rentgenowskiego. Skanowanie powierzchni próbki odbywa się punkt po punkcie poprzez ruch soczewek skanujących aż do powstania

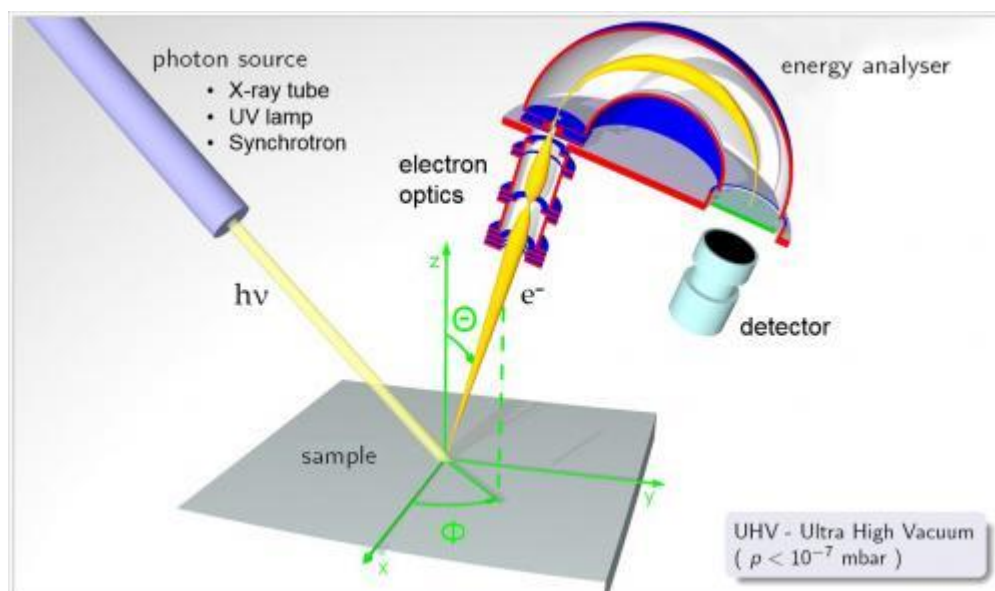
pełnego obrazu zaznaczonej powierzchni. Obraz powstaje na skutek przekształcenia na sygnał cyfrowy sygnału zbieranego przez detektory i pochodzącego od elektronów zarówno rozproszonych jak i wtórnych. Zdolność rozdzielcza mikroskopu elektronowego zależy od średnicy wiązki elektronów padających na próbkę. Poprzez kontrolę napięcia przyspieszającego możliwa jest kontrola poziomu penetracji próbki: stosując niższe wartości napięcia, mniejsze niż 5 kV skanowana jest powierzchnia, natomiast wyższe wartości napięcia (15-30 kV) umożliwia głębszą penetrację próbki na uzyskanie szczegółowych informacji dotyczących wnętrza próbki. Klasycznym konwencjonalnym detektorem w obrazowaniu SEM jest detektor „in- chamber” Everharta-Thornleya (ETD), który może działać zarówno w trybie SE jak i BSE (Vernon-Parry, 2000; Abdullah i Mohammed, 2019).

Istnieje wiele rodzajów detektorów stosowanych w połączeniu z mikroskopami skaningowymi. Połączenie obrazowania SEM ze spektroskopią rentgenowską z dyspersją energii (EDS lub EDX), pozwala na mapowanie skanowanej powierzchni pod względem składu pierwiastkowego na podstawie promieniowania rentgenowskiego powstającego, gdy wiązka elektronów penetruje i oddziałuje z objętością znajdującą się pod powierzchnią próbki. Fotony rentgenowskie mające charakterystyczne wartości energii dla poszczególnych pierwiastków trafiają do detektora, w którym są one rozdzielane tworząc widmo energetyczne. Następnie widmo to jest analizowane przez oprogramowanie systemu EDX, a energia fotonów zostaje przekształcona w sygnały elektryczne. Ostatecznie powstający sygnał pozwala na oznaczenia jakościowe i ilościowe składu pierwiastkowego skanowanej powierzchni (Abdullah i Mohammed, 2019).

3.5. Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS)

Rentgenowska spektroskopia fotoelektronowa (XPS) jest obecnie jedną z najszerzej stosowanych technik analitycznych do otrzymywania informacji o składzie pierwiastkowym i chemicznym oraz o strukturze elektronowej atomów obecnych na powierzchni analizowanych materiałów. Zazwyczaj analiza XPS jest przeprowadzana w warunkach ultra wysokiej próżni, przy wykorzystaniu jako źródła wzbudzenia promieniowania X, pochodzącego z anod glinowych lub magnezowych lub rzadziej monochromatycznego fotonu o energii poniżej ~1500 eV. Podstawą techniki XPS emisja fotoelektronów o określonej energii przez pierwiastki wzbudzone za pomocą wiązki z zakresu miękkiego promieniowania X (efekt fotoelektryczny). Energia kinetyczna wybitych z powierzchni próbki elektronów jest analizowana przez detektor i zmierzony sygnał jest przekształcany na wykres zależności względnej liczby elektronów od posiadanych przez nie energii. Elektrony o różnych energiach podążają różnymi ścieżkami przez detektor, co pozwala

komputerowi na rozróżnienie ich sygnałów i ich rejestrację w postaci widma. Ponieważ stan energetyczny elektronów w atomach pierwiastków różni się od siebie, pomiar wartości energii elektronów pozwala na precyzyjne oznaczenia składu powierzchni badanej próbki (Bagus, Ilton i Nelin, 2018; Simon, Baldovino-Medrano i Wojcieszak, 2022). Schemat budowy aparatury XPS został przedstawiony na rys. 3.6.



Rys. 3.6. Schemat budowy aparatury XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) | West Campus Materials Characterization Core, 2023).

Istnieją dwa rodzaje otrzymywanych widm XPS: przeglądowe, o mniejszej rozdzielczości w szerokim zakresie energii oraz szczegółowe, o wysokiej rozdzielczości rejestrowane w wąskim przedziale energii. Zaletami tej metody jest duża czułość i możliwość określenia wiązań występujących między atomami obecnymi na powierzchni próbki. Ponieważ emitowane przez źródło fotony mają ograniczoną zdolność do penetracji próbki w zakresie 1-10 μm metoda ta daje możliwość określenia składu tylko na powierzchni analizowanego materiału.

4. METODY BADAWCZE

4.1. Wykorzystane odczynniki chemiczne

- ✓ 65% kwas azotowy(V) HNO_3 , cz.d.a., Avantor
- ✓ 96% alkohol etylowy $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, cz.d.a., Avantor
- ✓ monowodorofosforan disodu $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cz.d.a., Avantor / cz.d.a., Chempur
- ✓ wodorotlenek sodu NaOH , cz.d.a., Avantor
- ✓ chlorek miedzi, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cz.d.a., Avantor
- ✓ roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl , $\text{pH}=6,8$), Laboratoires Gilbert (Francja)
- ✓ chlorek sodu, NaCl , cz.d.a., Avantor
- ✓ chlorek potasu, KCl , cz.d.a., Avantor
- ✓ wodorowęglan sodu, NaHCO_3 , cz.d.a., Avantor
- ✓ chlorek wapnia, CaCl_2 , cz.d.a., Avantor
- ✓ wielopierwiastkowy roztwór wzorcowy CPAChem Ltd. (33 pierwiastki, M8A96.K1.5N.L5),
- ✓ wielopierwiastkowy roztwór wzorcowy Spectrascan dla pierwiastków ziem rzadkich (D2-MEB359019)
- ✓ bufor fosforanowy PBS (tabletki) $\text{pH}=7,4$, Sigma-Aldrich
- ✓ azotan cynku, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, cz.d.a., Avantor
- ✓ azotan kadmu, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, cz.d.a., Avantor
- ✓ azotan miedzi(II), $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, cz.d.a., Avantor
- ✓ azotan niklu(II), $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, cz.d.a., Avantor

4.2. Procedura przygotowania skorupek jaj ptasich

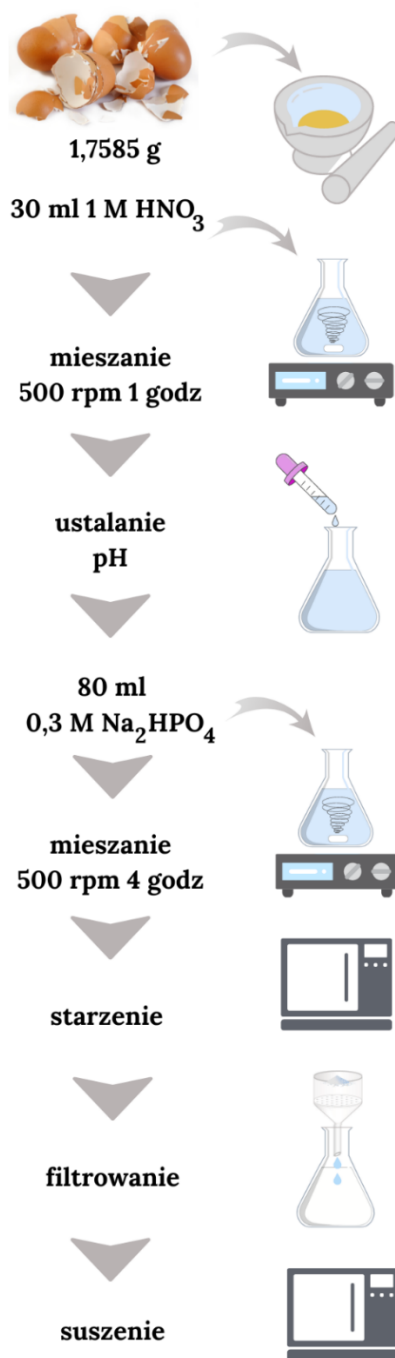
Skorupki jaj ptasich pochodziły z ekologicznych ferm drobiu z okolic Lublina i były zbierane w gospodarstwie domowym. W pierwszym etapie były one dokładnie myte w wodzie Milli-Q i suszone w temperaturze 50°C przez 24 godziny. Następnie ucierano je w młynku do otrzymania drobnego proszku. Tak otrzymane materiały były przechowywane w eksykatorze i służyły jako prekursor jonów wapnia w prowadzonych syntezach.

W celu pozyskania skorupki bez wewnętrznej błony pergaminowej, umyte skorupki dokładnie obierano z wewnętrznej membrany organicznej przy użyciu pincety. Następnie obrane skorupki umieszczano we wrzącej wodzie Milli-Q na 15 minut w celu usunięcia pozostałości organicznych i płukane zimną wodą Milli-Q. Kolejne etapy

przygotowania: suszenie, ucieranie i przechowywanie były takie same jak w przypadku skorupki jaj zawierających błony pergaminowe.

4.3. Procedura syntezy

Fosforany wapnia otrzymywano z wykorzystaniem surowych skorupki jaj kurzych jako źródła wapnia w trakcie syntezy według procedury opartej na metodzie mokrego strącania przedstawionej schematycznie na rys. 4.1.



Rys. 4.1. Ogólny schemat procedury syntezy fosforanów wapnia.

W celu redukcji zużycia energii pominięty został powszechnie stosowany w literaturze etap wypalania skorup jaj kurzych. We wszystkich procesach zmielone skorupki jajek roztwarzano w 1M kwasie azotowym(V), a jako źródło fosforu stosowano 0,3 M roztwór Na_2HPO_4 , który dozowano za pomocą pompy perystaltycznej z prędkością 20 ml/min. Po rozpuszczeniu skorupek jajek, ale przed dodaniem jonów HPO_4^{2-} ustalano zadaną początkową wartość pH roztworu. Szybkość mieszania na każdym etapie syntezy wynosiła 500 rpm (obrotów na minutę), a mieszanie wykonywano stosując mieszadło magnetyczne. Otrzymana zawiesina była filtrowana pod ciśnieniem stosując filtry membranowe o średnicy 0,45 μm , a przesącz był przemywany 96% alkoholem etylowym i wodą, a następnie suszony przez 24 godziny.

We wszystkich procedurach syntezy stosunek molowy Ca/P wynosił 0,6. Wartość ta wynikała z badań wstępnych, które nie zostały zawarte w pracy. Ponadto, taka ilość skorupki ulegała rozpuszczeniu w 1M roztworze kwasu azotowego(V).

W pierwszym etapie badań w ramach rozprawy doktorskiej wartość pH roztworu otrzymanego po rozpuszczeniu skorupki była ustalona na 11,40. Następnie dodawano 0,3 M roztwór Na_2HPO_4 a uzyskaną suspensję mieszano przez 4 godziny w temp. 25°C, a następnie poddano procesowi starzenia w 60°C przez 24 godziny. Po odfiltrowaniu i przemyciu otrzymany osad suszono w temp. 100°C przez 24 godziny.

W kolejnym etapie badań analizowano wpływ ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe na syntetyzowany materiał. Opisana wyżej procedura została zmodyfikowana poprzez zastąpienie procesu starzenia po dodaniu prekursora grup fosforanowych przez ekspozycję na promieniowanie mikrofalowe w piecu mikrofalowym CEM 5 MARS (Kanada) pracującym z częstotliwością magnetronu 2455MHz i mocą równą 800W. Wartości pH mieszaniny reakcyjnej były ustalone na 6 lub 12 za pomocą 1M HCl lub NaOH, a otrzymane suspensje były poddawane działaniu promieniowania mikrofalowego przez 5, 10 i 15 minut przy stałej temperaturze utrzymywanej w piecu w czasie ekspozycji na poziomie 60°C i 140°C. Tuż po ekspozycji osad filtrowano, przemyto etanolem i suszono zgodnie z powyższą procedurą. W celu zredukowania ilości energii stosowanych w trakcie analizy, temperatura suszenia produktu została zmniejszona do 50°C.

W celu analizy wpływu wartości pH mieszaniny reakcyjnej na skład i strukturę otrzymywanego materiału przeprowadzono syntezę zgodnie z ogólnym schematem przedstawionym na rys. 4.1 ustalając wartość pH: 1,1; 4,4; 5,4; 7,4; 10,6 i 12,4 stosując roztwory HCl lub NaOH. W procedurze zmniejszono temperaturę starzenia osadu z 60°C na 50°C. Obniżona została również ze 100 do 50°C temperatura suszenia osadu. Pozwoliło to obniżyć nakłady energii.

Kolejny etap badań prowadzony był zgodnie z powyżej opisaną procedurą wykorzystując skorupki jaj pochodzących od różnych gatunków ptaków powszechnie hodowanych w gospodarstwach rolniczych tj. kurzych, przepiórczych, kaczyc i gołębic. Stosowano skorupki z błoną pergaminową oraz bez błony. Początkowe pH syntezy ustalano na 11,4.

W celu wprowadzenia jonów cynku do struktury produktu obliczona ilość roztworu azotanu cynku była dodawana do rozpuszczonych w kwasie azotowym skorupki jaj kurzych w celu uzyskania roztworu o zawartościach 5, 10, 15 i 20 molowych % jonów cynku w stosunku do ilości jonów wapnia.

4.4. Opis przeprowadzonych badań

4.4.1. Analiza składu pierwiastkowego stosowanych skorupki jaj oraz pozyskanych fosforanów wapnia

Skład skorupki analizowano za pomocą metody termogravimetrycznej, optycznej spektroskopii emisyjnej z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES) oraz spektroskopii masowej z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-MS).



Rys. 4.2. Zdjęcie aparatury ICP-OES wykorzystywanej do pomiarów.

Do weryfikacji zawartości wapnia oraz różnic w składzie pierwiastkowym skorupki jaj pochodzących od różnych gatunków ptaków (rozdział 5.4) oraz określenia procentowej zawartości Zn w produktach domieszkowanych jonami cynku (rozdział 5.5) zastosowano techniki ICP-OES oraz ICP-MS. Do 100 mg analizowanego materiału dodano 10 ml stężonego kwasu azotowego o stężeniu 67% i gotowano na gorącej płytce w temperaturze 100-150°C przez 4 godziny do całkowitego wytrawienia. Następnie otrzymane roztwory rozcieńczano 4-krotnie wodą Milli-Q i dozowano do komory plazmowej aparatury ICP-OES

(Spectro Genesis, Germany) (rys. 4.2) oraz iCAP RQ ICP-MS (Thermo Scientific Inc., USA) w celu przeprowadzenia analizy pierwiastkowej. Krzywe kalibracyjne dla wszystkich oznaczanych pierwiastków otrzymano na podstawie pomiarów wielopierwiastkowego roztworu wzorcowego CPAChem Ltd. (33 pierwiastki, M8A96.K1.5N.L5) oraz wielopierwiastkowego roztworu wzorcowego Spectrascan dla pierwiastków ziem rzadkich (D2-MEB359019) o odpowiednich stężeniach. Wszystkie pomiary związane z technikami ICP zostały wykonane w Institute of Materials and Environmental Chemistry Research Center for Natural Science w Budapeszcie na Węgrzech we współpracy z dr Zoltánem May.

4.4.2. Analiza składu fazowego stosowanych skorupek jaj oraz otrzymanych fosforanów wapnia i morfologii otrzymanych produktów

Skład skorupki jaj stosowanych jako źródło wapnia do syntez fosforanów wapnia określono za pomocą analizy termicznej w atmosferze syntetycznego powietrza, wykorzystując urządzenie STA 449 Jupiter F1 (Netzsch, Niemcy) sprzężone ze spektrometrem IR. Analizowane próbki umieszczone były w ceramicznym tyglu, a badania prowadzone były w zakresie temperatur od 25 do 1100°C z szybkością grzania 10°C/min. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę obliczeń stechiometrycznych.

Analizę jakościową składu wszystkich otrzymanych w wyniku syntez materiałów wykonano metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera - FTIR (Inqry Molecular Nicolet IS 10, Thermo Scientific, USA).

Analizę jakościową i ilościową składu otrzymanych produktów wykonano przy użyciu dyfraktometru proszkowego Empyrean (Malvern PANalytical, UK). Identyfikację faz krystalicznych przeprowadzono poprzez najlepsze dopasowanie otrzymanych dyfraktogramów do dyfraktogramów teoretycznych (z bazy dyfrakcyjnej ICDD PDF 4+ 2019) w oparciu o rafinacje najmniejszych kwadratów przy użyciu oprogramowania HighScore Plus 3.0e, natomiast skład próbek obliczono w oparciu o metodę Rietvela.

4.4.3. Analiza morfologii otrzymanych produktów

Morfologię otrzymanych proszków produktów określono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (DualBeam Quanta 3D FEG, FEI, USA) z detektorem Everharta-Thornleya (ETD). Próbki przed obrazowaniem były mocowane do stolików aluminiowych o średnicy 10 mm pokrytych adhezyjną folią węglową. Przed analizą na próbki przytwierdzone do stolików była nanoszona cienka warstwa złota, poprzez napylenie w napyłarce wysokopróżniowej.

Do obrazowania powierzchni materiałów wykorzystano także transmisyjny elektronowy mikroskop skaningowy o wysokiej rozdzielczości (Titan3™ G2 60-300, FEI,

USA) o napięciu przyspieszającym w zakresie 60 - 300 kV wyposażony w: działło emisji polowej (FEG), monochromator, układ trzech soczewek kondensorowych, układ soczewek obiektywowych, korekcję obrazu (korektor Cs), detektor HAADF oraz spektrometr EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). Mapowanie przeprowadzono w trybie STEM zbierając punkt po punkcie widmo EDS każdego z odpowiadających pikseli na mapie. Zebrane mapy przedstawiano w postaci macierzy pikseli z odwzorowanym kolorem oznaczanego pierwiastka i intensywnością odpowiadającą jego procentowej zawartości.

Skład powierzchni materiałów oraz charakter oddziaływań pomiędzy cząstkami badano metodą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej (XPS) z wykorzystaniem wielokomorowego systemu UHV (PREVAC) z półkulistym analizatorem elektronów Scienta R4000. Jako wyposażenie uzupełniające zastosowano źródło promieniowania rentgenowskiego Scienta SAX-100 (Al K α , 1486.6 eV, pasmo 0.8 eV) połączone z monochromatorem promieniowania X XM 650 (pasmo 0.2 eV).

4.4.4. Analiza porozymetryczna otrzymanych fosforanów wapnia

Porowatość oraz wielkość powierzchni właściwej uzyskano z krzywych adsorpcji/desorpcji azotu mierzonych w temperaturze -196°C po odgazowaniu próbek w temperaturze 200°C wykonanych za pomocą Accelerated Surface Area and Porosimetry System ASAP 2420 V 2.09 (Micromeritics Inc., USA). Obliczenia wykonano za pomocą równania BET.

4.4.5. Określenie właściwości elektrokinetycznych otrzymanych fosforanów wapnia

Zawiesinę materiału o stężeniu 0,01% wagowych przygotowano w 1mM roztworze KCl. Przed zdyspergowaniem osadu ustalano pH roztworu w zakresie od 2 do 13. Następnie dodawano odważoną próbkę i układ pozostawiano na 24 godz. w celu osiągnięcia równowagi. Po tym czasie zmierzono pH zawiesiny a następnie zmierzono ruchliwość elektroforetyczną za pomocą urządzenia Zetasizer Nano (Malvern, UK). Potencjał dzeta obliczano za pomocą równania Smoluchowskiego:

$$U_E = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (1)$$

gdzie: U_E definiuje się jako ruchliwość elektroforetyczną, ε - przenikalność, ζ - potencjał dzeta, a η - lepkość rozpuszczalnika.

Z zależności potencjału dzeta w funkcji pH równowagowego wyznaczono punkt ładunku zerowego otrzymanych fosforanów wapnia.

4.4.6. Badanie uwalniania jonów wapnia w roztworze soli fizjologicznej/sztucznej śliny

Analizę uwalniania jonów wapnia przeprowadzono w komercyjnie dostępnym roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl, pH=7,4) oraz w roztworze sztucznej śliny. Roztwór sztucznej śliny o pH=6,8 zawierał 7,36 mM NaCl, 20 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 6,6 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM CaCl₂ (Richardson *et al.*, 2004). Analizowane materiały dyspergowano w roztworze soli/sztucznej śliny do uzyskania końcowego stężenia 0,1 mg/ml i mieszano próbkę w temperaturze 25°C przy 500 rpm. Stężenie jonów wapnia mierzono w różnych okresach czasu przy użyciu dedykowanej elektrody jonoselektywnej podłączonej do aparatury Elmetron CX-601. Każdy pomiar powtarzano 3-5 razy, a prezentowane wyniki są wartościami średnimi.

Po 48-godzinnym kontakcie z roztworem sztucznej śliny wybrane materiały przefiltrowano pod ciśnieniem stosując filtry membranowe o średnicy 0,45 µm, wysuszono w temperaturze 50°C przez 24 godziny i poddano dalszej analizie.

4.4.7. Badanie adsorpcji i desorpcji jonów metali ciężkich

Pojemność adsorpcyjną otrzymanych fosforanów wapnia względem jonów metali ciężkich badano metodą statyczną w temperaturze 25°C. Wszystkie eksperymenty adsorpcyjne przeprowadzono w temperaturze 25°C. 25±0,2 mg adsorbentu umieszczano w 5 ml wodnego roztworu wybranej i wytrząsano z prędkością 120 obr/min (badania prezentowane w rozdziale 5.1) lub stosując wytrząsarkę oscylacyjną IKA KS 260 orbital shaker (badania prezentowane w rozdziale 5.5). Po upływie zadanego czasu osad filtrowano za pomocą filtra strzykawkowego z hydrofilowymi filtrami 0,22 µm PTFE (Alfachem, Polska) i oznaczano stężenie jonów metalu w roztworze. Ilość zaadsorbowanych jonów metali wyznaczano z równania:

$$a = \frac{(C_0 - C_{rów}) \cdot V}{m} \quad (2)$$

gdzie: a - oznacza ilość zaadsorbowanych jonów [mg/g], C_0 - wartość początkową stężenia jonów metali przed adsorpcją [mg/L], $C_{rów}$ - wartość stężenia jonów metali po adsorpcji [mg/L], V oznacza objętość roztworu [L], m - masę adsorbentu [g].

Stężenie jonów Cu²⁺ w eksperymentach opisanych w rozdziale 5.1 wyznaczano metodą spektrofotometryczną na podstawie krzywej kalibracyjnej przy długości fali 740 nm przy użyciu spektrofotometru Spectronic Helios Alpha Beta UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation, USA.

Oznaczenia stężenia jonów metali podczas badań adsorpcyjnych opisanych w rozdziale 5.5 wykonano techniką ICP połączoną z dwoma różnymi detektorami.

Wpływ pH na proces adsorpcji badano w temperaturze 25°C w zakresie pH początkowego od 3 do 6 dostosowując pH układu za pomocą 1M roztworów NaOH lub HCl. W celu określenia charakteru procesów adsorpcyjnych zastosowano dwa modele izoterm adsorpcji: Langmuira i Freundlicha.

Model Langmuira wyrażono za pomocą równania liniowego:

$$\frac{C_{rów}}{q_{rów}} = \frac{1}{q_m b} + \frac{C_{rów}}{q_m} \quad (3)$$

Gdzie: $q_{rów}$ i q_m oznaczają ilości zaadsorbowanego metalu (mg/g) odpowiednio w stanie równowagi i tworzącej monowarstwę adsorpcyjną, $C_{rów}$ – stężenie równowagowe jonów (mg/L), a b - stałą Langmuira (L/mg).

Model Freundlicha został dopasowany w oparciu o równanie:

$$\ln q_{rów} = \frac{1}{n} \ln C_{rów} + \ln K_f \quad (4)$$

gdzie: n i K_f ($\text{mg}^{(1-1/n)} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$) są stałymi Freundlicha o wartości charakterystycznej dla danego układu, $q_{rów}$ oznacza ilość zaadsorbowanego metalu (mg/g) w stanie równowagi, $C_{rów}$ jest stężenie równowagowe jonów metalu w roztworze (mg/L).

Kinetykę adsorpcji analizowano przy użyciu modelu pseudo-pierwszego rzędu i pseudo-drugiego rzędu stosując odpowiednio równania:

$$\ln(q_{rów} - q_t) = \ln q_{rów} - k_1 t \quad (5)$$

i

$$\frac{1}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_{rów}^2} + \frac{1}{q_{rów}} t \quad (6)$$

gdzie: k_1 (min^{-1}) oznacza stałą szybkości kinetyki pierwszego rzędu, k_2 ($\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$) - stałą szybkości kinetyki drugiego rzędu, $q_{rów}$ (mg/g)- ilość jonów zaadsorbowana w stanie równowagi, a q_t (mg/g)- ilość zaadsorbowana w czasie t (min).

Określono również stopień desorpcji jonów miedzi(II), niklu(II) i kadmu(II) (rozdział 5.5). W tym celu po procesie adsorbenty przefiltrowano przez celulozowe bibuły filtracyjne i wysuszone w temp. 50°C. Następnie odważono po 18 mg każdej próbki, dodano 18 ml buforu octowego (pH=5,6) i mieszano z prędkością 500 obr/min. Po określonym czasie pobierano strzykawką 1 ml każdej próbki i filtrowano filtrami strzykawkowymi o średnicy porów 0,45 μm . Przesącz rozcieńczano 4-krotnie i analizowano pod względem stężenia jonów metali ciężkich za pomocą ICP-OES.

4.4.8. Badania właściwości antybakteryjnych

Badania właściwości antybakteryjnych zostały wykonane we współpracy z prof. Anną Belcarz z Katedry i Zakładu Biochemii i Biotechnologii z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, natomiast badania cytotoksyczności we współpracy dr Pauliną Kazimierczak

z Samodzielnego Zakładu Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

W doświadczeniu wykorzystano referencyjne szczepy bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Oba szczepy bakterii utrzymywano w systemie do przechowywania mikroorganizmów Microbank (Biomaxima, Polska) w temperaturze -80°C , następnie hodowano na podłożu agarowym Mueller-Hinton (M-H) (Biomaxima, Polska) w temperaturze 37°C przez 20-24h, a na koniec przenoszono do bulionu Mueller-Hinton (M-H) (Biomaxima, Polska) w celu dalszej 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C . Bezpośrednio przed eksperymentem uzyskiwano inokulanty bakteryjne poprzez rozcieńczenie zawiesiny do stężenia dobranego indywidualnie dla każdego szczepu. Badane biomateriały przed analizą (po trzy próbki dla jednego biomateriału) sterylizowano tlenkiem etylenu EthO.

W celu przeprowadzenia testu bezpośredniego kontaktu przygotowano zawiesinę z wysterylizowanych proszków fosforanu wapnia w sterylnym PBS o $\text{pH}=7,4$, o stężeniach 2 mg/ml i 0,2 mg/ml. Zawiesiny sonikowano (Sonic-6, Polsonic, Polska) w lodowatej wodzie przez 90 minut do uzyskania pełnej dyspersji. Dla każdego szczepu przygotowano bakteryjną zawiesinę roboczą w bulionie M-H rozcieńczonym 125-krotnie sterylnym 0,9% NaCl: $6,0 \times 10^5$ CFU/ml dla *S. aureus* i $6,0 \times 10^3$ CFU/ml dla *E. coli*. Następnie zawiesiny proszku i roztwory robocze bakterii mieszano w sterylnych zakręcanych probówkach o pojemności 5 ml, w proporcji 1:1 uzyskując mieszaniny proszku o stężeniu 1 mg/ml lub 0,1 mg/ml, $3,0 \times 10^5$ CFU/ml (dla *S. aureus*) lub $3,0 \times 10^3$ CFU/ml (dla *E. coli*) i bulionu M-H rozcieńczonego 250-krotnie w sterylnym 0,9% NaCl. Kontrole pozytywne dla każdego szczepu bakterii przygotowywano mieszając roztwór PBS $\text{pH} 7,4$ i roztwory robocze bakterii w takich samych proporcjach jak dla zawiesin proszkowych. Następnie próbki inkubowano przez 24 godziny w 37°C z ciągłym mieszaniem (20 rpm) przy użyciu mieszadła RM 5-30V CAT (Ingenieurbüro CAT M. Zipperer, Niemcy). Na koniec, 50 μl mieszanin posiewano na płytki Petriego z agarem M-H przy użyciu automatycznego plateru spiralnego EasySpiral Dilute (Interscience, Francja), każda próbka w trzech egzemplarzach; posiew w standardowym trybie wykładniczym. Płytki M-H agar inkubowano w temperaturze 37°C przez 18-28 h, w zależności od szczepu. Następnie zliczano CFU dla każdej płytki przy użyciu licznika kolonii Scan 300 (Interscience, Francja).

4.4.9. Badania cytotoksyczności

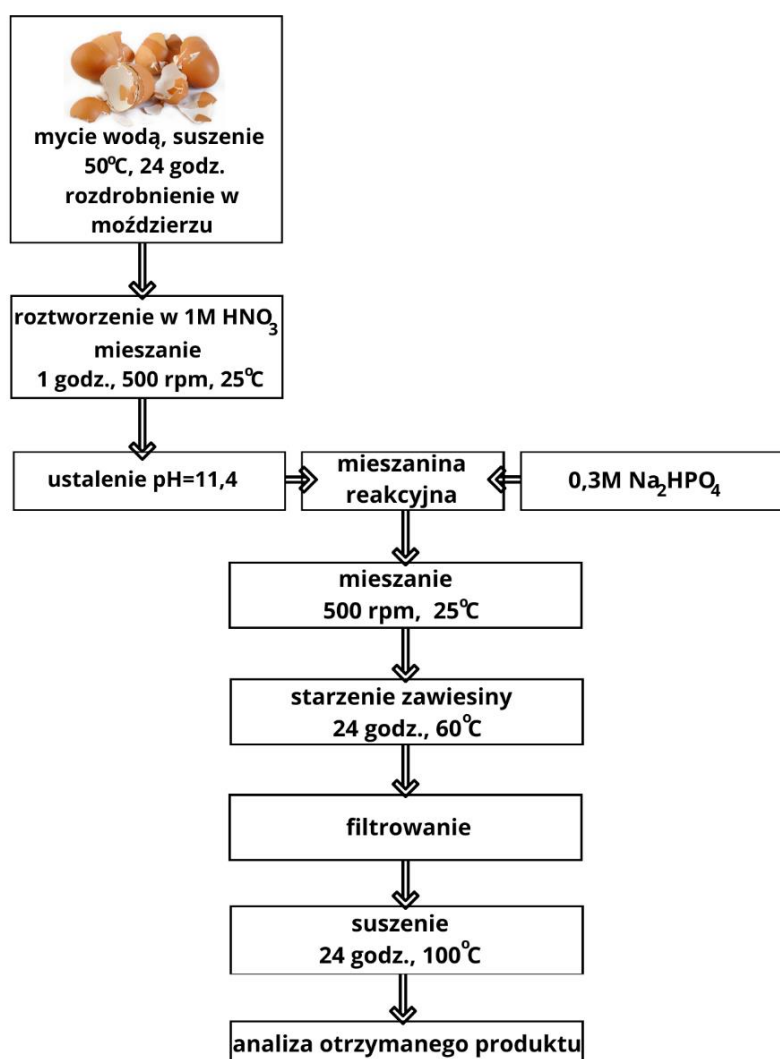
Ocenę cytotoksyczności uzyskanych materiałów fosforanu wapnia przeprowadzono zgodnie z normą ISO 10993-5, stosując 24-godzinne ekstrakty próbek przygotowanych

zgodnie z normą ISO 10993-12 (zachowując proporcje 100 mg próbki na 1 mL kompletnego podłoża hodowlanego). Do oceny cytotoksyczności in vitro wykorzystano linię komórkową mysich preosteoblastów (MC3T3-E1 Subclone 4, standardy ATCC-LGC, Teddington, UK). Komórki MC3T3-E1 utrzymywano w podłożu alfa-MEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą (Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Niemcy) oraz roztworem penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich Chemicals, Warszawa, Polska) i hodowano w temperaturze 37°C w atmosferze nasyconej 5% CO₂. Ocenę cytotoksyczności badanych materiałów będących mieszaniną form fosforanów wapnia przeprowadzono za pomocą testu MTT (Sigma-Aldrich Chemicals, Warszawa, Polska). Komórki MC3T3-E1 umieszczano na 96-studzienkowej płytce w zagęszczeniu 2×10^4 komórek. Po 24 godzinach usuwano medium hodowlane i zastępowano je 100 µL odpowiednich ekstraktów z próbek. Podłoże hodowlane inkubowane bez materiałów z fosforanu wapnia służyło jako negatywna kontrola cytotoksyczności (oznaczone jako kontrola PS). Komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny. Następnie oceniano żywotność komórek za pomocą testu MTT. Uzyskane wyniki testu MTT przedstawiono jako procent wartości absorbancji uzyskanej z kontrolą negatywną. Dodatkowo, ocenę stężenia Ca²⁺ i HPO₄²⁻ w 24-godzinnych ekstraktach próbek przeprowadzono przy użyciu kolorymetrycznych zestawów detekcyjnych (BioMaxima, Lublin, Polska), zgodnie z instrukcją producenta.

5. OTRZYMYWANIE FOSFORANÓW WAPNIA Z WYKORZYSTANIEM SKORUPEK JAJ PTASICH

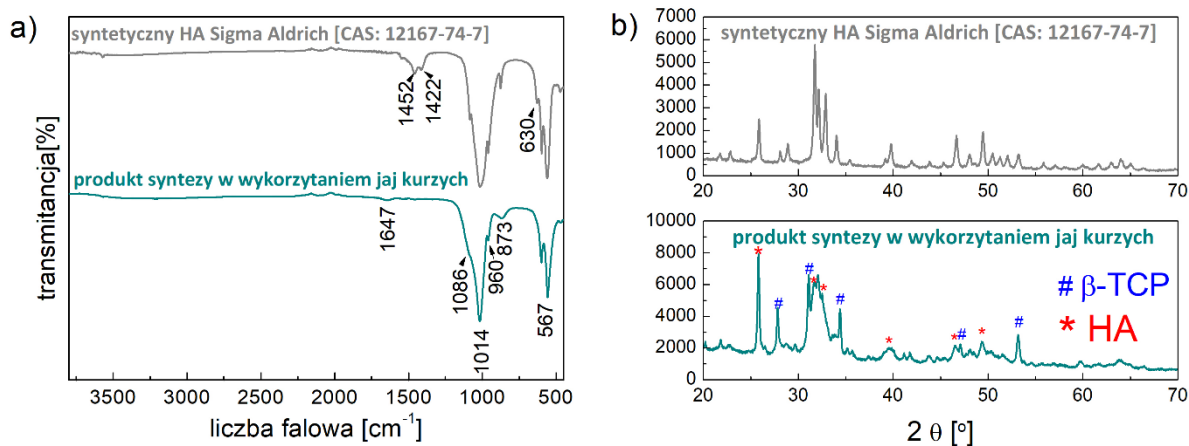
5.1. Wstępna synteza fosforanów wapnia z wykorzystaniem surowych jaj kurzych jako źródła wapnia

Jednym z założeń prowadzonych badań była redukcja zużycia energii podczas syntezy. Dlatego zdecydowano się wykorzystać skorupki jajek rozpuszczone w kwasie azotowym(V), zamiast powszechnie stosowanego procesu kalcynacji (Ahmed i Ahsan, 2008; Gergely *et al.*, 2010; Goloshchapov *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2015; Bag, Ganguly i Biswas, 2016; Adeogun *et al.*, 2018; Zanelato *et al.*, 2020). Zdecydowano się wykorzystać kwas azotowy(V) podobnie jak w badaniach dostępnych w literaturze przedmiotu (Ibrahim *et al.*, 2013; De Angelis *et al.*, 2017). Na podstawie eksperymentów wstępnych zastosowano stężenie kwasu 0,3M, a stosunek molowy Ca/P równy 0,6 (Kalbarczyk, Szczeń i Sternik, 2021). Syntezę prowadzono zgodnie z ogólnym schematem przedstawionym na rys. 5.1.



Rys. 5.1. Schemat syntezy fosforanów wapnia z wykorzystaniem skorupki jaj kurzych.

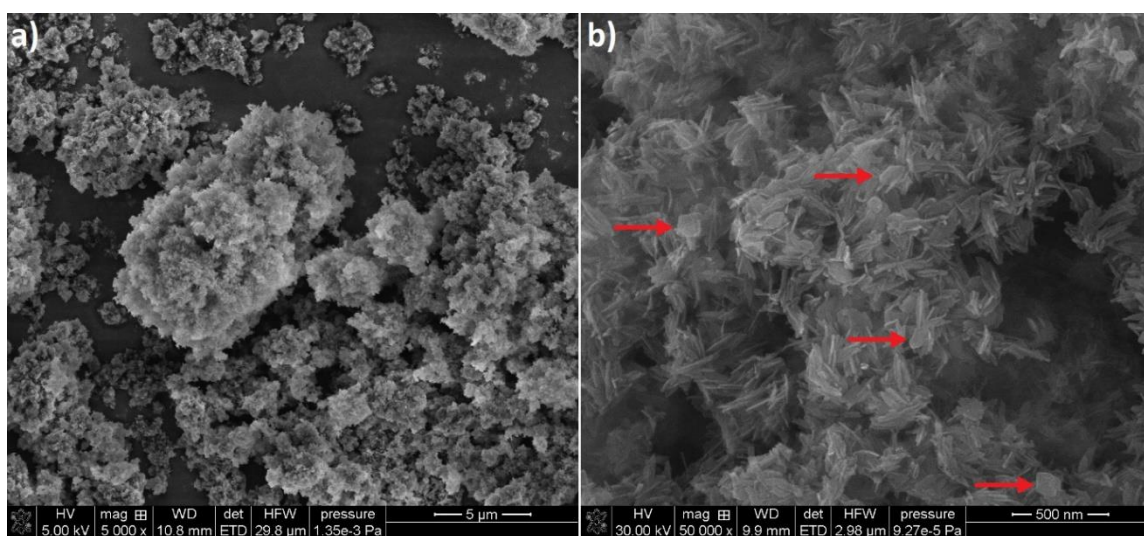
Otrzymany produkt w postaci drobnego, białego proszku został poddany analizie FTIR-ATR oraz XRD w celu zbadania składu otrzymanego produktu. Dla porównania wykonano również analizę syntetycznego hydroksyapatytu (Sigma-Aldrich >97%, CAS: 12167-74-7). W widmach FTIR syntetycznego HA oraz otrzymanego produktu (rys. 5.2a) zarejestrowane zostały pasma charakterystyczne dla fosforanów wapnia przy liczbach falowych wynoszących 1086 cm^{-1} , 1014 cm^{-1} , 960 cm^{-1} oraz 567 cm^{-1} odpowiadające zdegenerowanym drganiom zginającym oraz asymetrycznym drganiom rozciągającym grupy PO_4^{3-} . Ponadto, sygnały znajdujące się przy wartościach liczb falowych 1647 cm^{-1} oraz 873 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym grup węglanowych (Rehman i Bonfield, 1997). Dodatkowo w widmie otrzymanym dla syntetycznego hydroksyapatytu, zaobserwowano dwa dodatkowe pasma przy 1452 i 1422 cm^{-1} , świadczące o obecności grup CO_3^{2-} wbudowanych w strukturę sieci krystalicznej, a także piki przy 3569 cm^{-1} oraz 630 cm^{-1} będące sygnałami pochodzącymi od grup hydroksylowych (Berzina-Cimdina i Borodajenko, 2012). Obecność grup CO_3^{2-} w strukturze jest zjawiskiem typowym dla naturalnych fosforanów wapnia i może być wynikiem podstawienia grup fosforanowych przez grupy węglanowe wewnątrz sieci krystalicznej (substytucja typu B) (pasma przy wielkościach liczby falowej w zakresie $1600\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$) lub substytucją grup hydroksylowych przez grupy CO_3^{2-} na powierzchni materiału (substytucja typu A) charakteryzującą się pasmem przy 873 cm^{-1} . Na podstawie analizowanego widma można stwierdzić, że w otrzymanym materiale uprzywilejowana była substytucja typu A i grupy węglanowe zostały podstawione w miejscu grup wodorotlenowych na powierzchni materiału, jednocześnie nie zostały wbudowane w strukturę kryształu (brak sygnału w przedziale $1600\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$) (Rehman i Bonfield, 1997). Potwierdzenie stanowi także brak pików odpowiadających grupom hydroksylowym przy 3569 i 630 cm^{-1} . Na podstawie analizy kształtu pasm w przedziale liczb falowych $1100\text{-}550\text{ cm}^{-1}$, oraz dehydroksylacji, można zakładać, że badana próbka składa się z dwóch form fosforanów wapnia, tj. HA i β -TCP (Berzina-Cimdina i Borodajenko, 2012).



Rys. 5.2. Widma FTIR (a) oraz dyfraktogramy XRD (b) syntetycznego hydroksyapatytu oraz otrzymanego produktu .

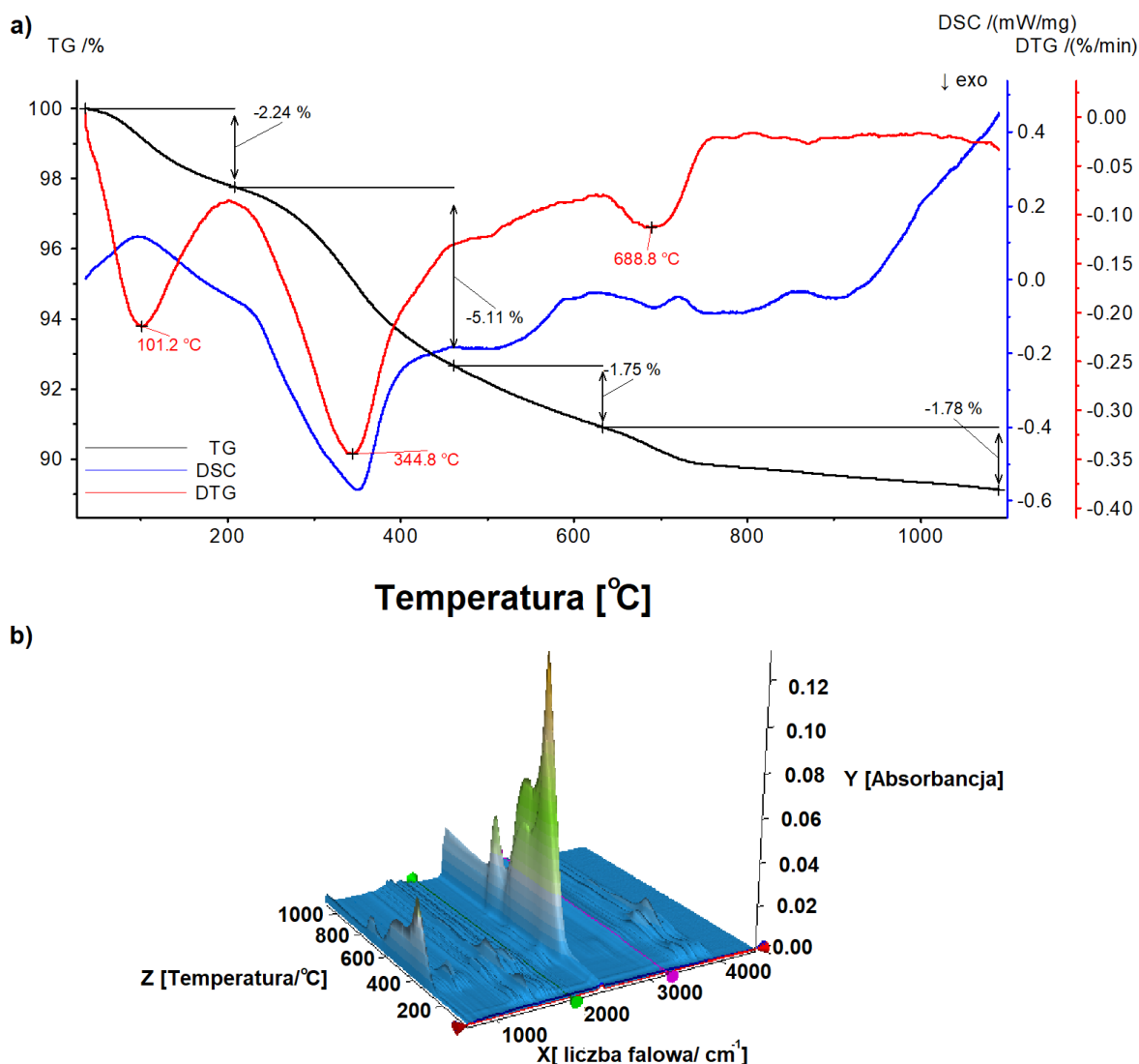
Wnioski wyciągnięte z analizy widm FTIR zostały potwierdzone na podstawie analizy dyfraktogramów proszkowych XRD (rys. 5.2b). Analiza otrzymanych danych potwierdziła obecność HA i β -TCP w badanym materiale (Tanimoto, Hayakawa i Nemoto, 2005; Sajahan i Wan Ibrahim, 2014). Obliczenia przeprowadzone w oparciu o metodę Rietvelde (Rietveld, 1969; Scrivener *et al.*, 2004) wykazały, że otrzymany materiał składa się w 74% z hydroksyapatytu i 26% β -TCP.

Mikrofotografie SEM otrzymanego produktu (rys. 5.3) pokazują, że otrzymane fosforany wapnia występują w postaci podobnych do kalafiora agregatów o dobrze rozwiniętej powierzchni. Na zdjęciu wykonanym w większym przybliżeniu można zaobserwować mieszaninę drobnych, igłowatych struktur, wśród których rozproszone są niewielkie, heksagonalne płatki o wymiarach mniejszych niż 250 nm. Powierzchnia właściwa próbki, określona metodą BET wynosi 66,1 m²/g.



Rys. 5.3. Zdjęcia SEM otrzymanego produktu w powiększeniu 5000x (a) i 50 000x (b).

Na podstawie krzywych DSC, TG i DTG ustalono, że produkt syntezy ulega 3-stopniowemu rozkładowi termicznemu i towarzyszy mu 10,9% ubytek masy (rys. 5.4).



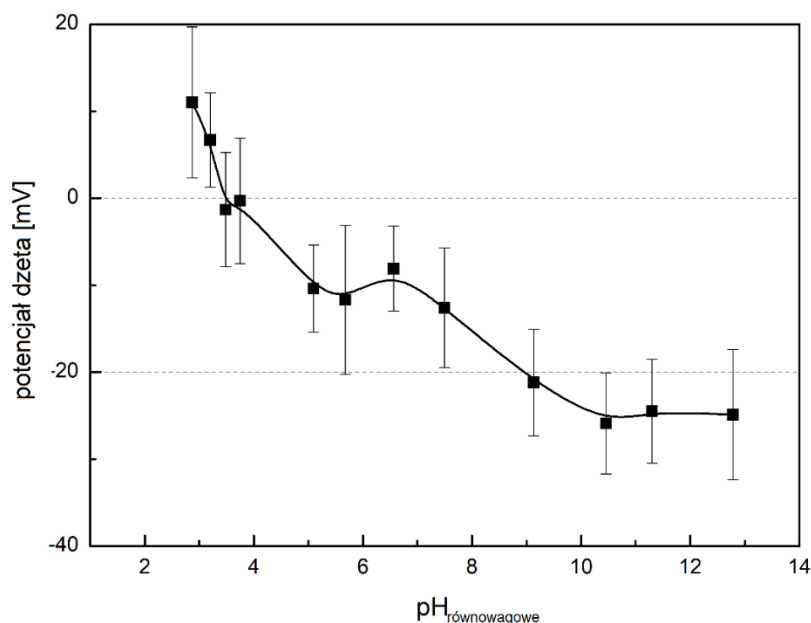
Rys. 5.4. Krzywe DTG, TG i DSC otrzymane dla produktu syntezy (a) oraz widma IR wykonane w trakcie analizy termicznej (b).

Pierwszy spadek masy próbki równy 2,24% w zakresie temperatur do 200°C był związany z utratą wody powierzchniowej, co potwierdza endotermiczny pik z krzywej DSC. Następny pik, z maksimum na krzywej DTG przy 344,8°C spowodowany utratą 5,11% całkowitej masy próbki, można powiązać z degradacją pozostałości organicznych oraz utratą wody sieciowej obecnej w sieci krystalicznej. Dalsze ogrzewanie materiału spowodowało kolejną stopniową utratę masy w zakresie temperatur od 450°C do 1100°C powiązaną ze stopniowym uwalnianiem grup węglanowych i wody z cząsteczek HA w trakcie przemiany do termicznie stabilniejszej formy TCP, co znalazło potwierdzenie na endotermicznych pikach krzywej DSC (Kumta *et al.*, 2005). W widmach IR rejestrowanych podczas rozkładu termicznego w temperaturze ok. 100°C pojawiają się pasma o wartościach

liczby falowej około 3500 cm^{-1} odpowiadające utracie wody, a ich intensywność rośnie w zakresie temperatur $200\text{-}450^\circ\text{C}$, co potwierdza utratę wody sieciowej. Pasma drgań IR ditlenku węgla przy ok. 2400 cm^{-1} i 550 cm^{-1} w zakresie temperatur $200\text{-}450^\circ\text{C}$ i $450\text{-}1100^\circ\text{C}$ potwierdzają jego eliminację w wyniku rozkładu reszt organicznych i grup węglanowych podczas przemiany HA.

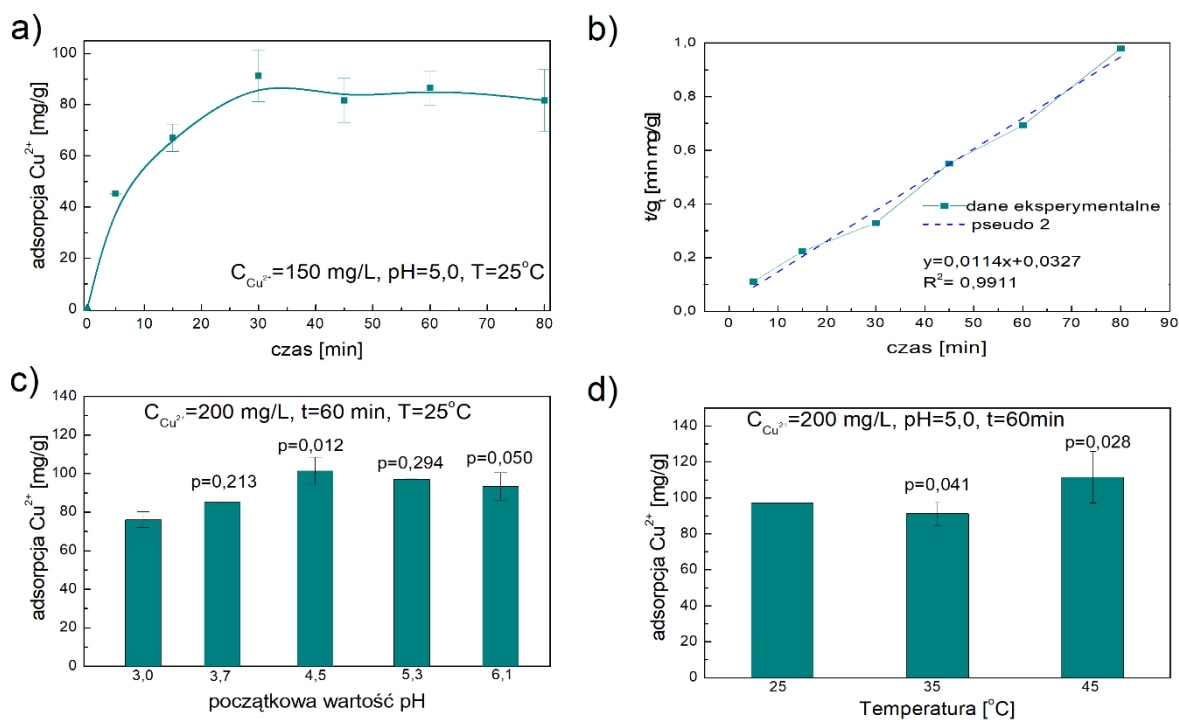
Właściwości elektrokinetyczne otrzymanego materiału określono na podstawie zmiany potencjału dzeta w funkcji pH równowagowego (rys. 5.5). Punkt izoelektryczny otrzymanego materiału znajduje się przy pH wynoszącym ok. 3,5. Niska wartość punktu izoelektrycznego świadczy o dominacji grup anionowych na powierzchni materiału, co może być spowodowane obecnością grup hydroksylowych i fosforanowych. W środowisku alkalicznym wartość potencjału dzeta oscyluje wokół -25 mV i jest stała. Obecność ujemnie naładowanych grup powierzchniowych może ułatwiać adsorpcję dodatnio naładowanych jonów.

Biorąc pod uwagę właściwości powierzchniowe otrzymanego materiału w kolejnym etapie badań sprawdzono możliwość jego potencjalnego zastosowania do usuwania jonów metali ciężkich. Do badań wybrano powszechnie występujące w wodach jony miedzi.



Rys. 5.5. Zależność wartości potencjału dzeta od równowagowego pH układu.

Metal ten wybrano ze względu na jego powszechne występowanie w ściekach (Jumasheva *et al.*, 2023). Analizując wpływ czasu na ilość zaadsorbowanych kationów można zauważyć, że adsorpcja zachodzi ze znaczną szybkością, a stan równowagi układ osiąga już po 30 minutach przy średniej wartości zaadsorbowanego Cu^{2+} równej 86 mg/g (rys. 5.6a).



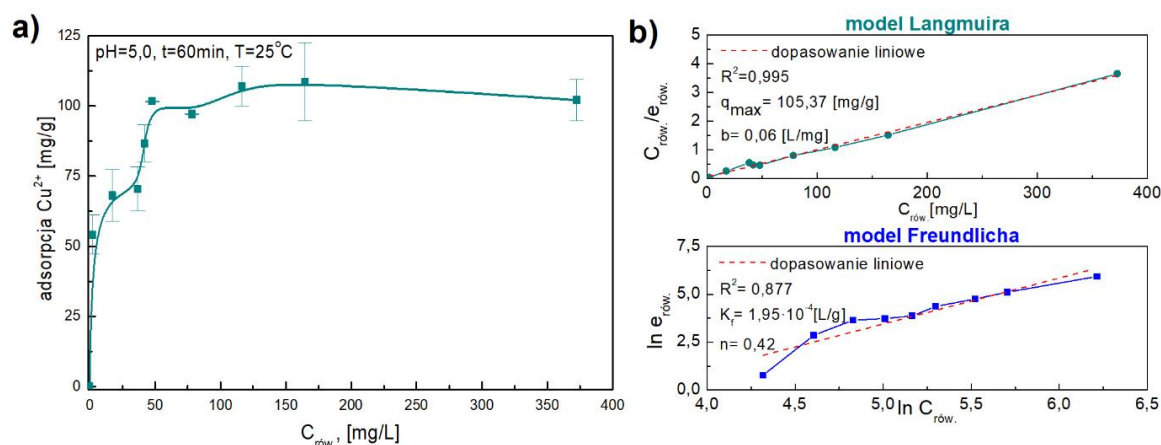
Rys. 5.6. Wykres zależności adsorpcji jonów miedzi(II) od czasu (a), dopasowania danych kinetyki pseudo drugiego rzędu (b), zależność od pH (c) i temperatury (d).

Kinetykę adsorpcji badano metodą kinetyki pseudo-pierwszego rzędu i pseudo-drugiego rzędu. Współczynnik korelacji (R^2) dla modelu pseudo-pierwszego rzędu był bardzo niski i wynosił 0,718. Dobre dopasowanie kinetyki pseudo-drugiego rzędu (rys.5.6b) może wskazywać, że adsorpcja jonów miedzi(II) na otrzymanym materiale ma charakter chemisorpcji. Obliczone wartości q_e i k_2 wynosiły odpowiednio 87,7 mg/g i $0,004 \text{ g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

Na rys. 5.6c przedstawiono wpływ pH początkowego roztworu na adsorpcję jonów miedzi(II). W zakresie pH od 3,0 do 4,5 adsorpcja wzrasta z 76,0 mg/g do wartości maksymalnej 101,4 mg/g. Przy dalszym wzroście pH do 6,0 zaobserwowano spadek wartości adsorpcji. Spadek ten jest prawdopodobnie powstawaniem nierozpuszczalnego wodorotlenku miedzi(II).

Wpływ temperatury na adsorpcję jonów miedzi przedstawiono na rys. 5.6d. Zmiany pojemności adsorpcyjnej w wyniku wzrostu temperatury nie wykazują regularnej tendencji. W temperaturze 25°C adsorpcja Cu^{2+} wynosiła 97,1 mg/g. Po zwiększeniu temperatury do 35°C wydajność adsorpcji nieznacznie spadła, ale w granicach odchylenia standardowego, i osiągnęła wartość 91,3 mg/g. Dalszy wzrost temperatury do 45°C spowodowała dalszy wzrost pojemności adsorpcyjnej do 111,6 mg/g. Bazując na wynikach przedstawionych na rys. 5.6 wybrano optymalne warunki adsorpcji w celu określenia izoterm adsorpcji (rys. 5.7a). Adsorpcję jonów miedzi(II) na otrzymanym proszku lepiej opisuje model Langmuira

($R^2=0,995$) niż model Freundlicha ($R^2=0,877$) przy pojemności monowarstwy q_m równym 105,4 mg/g (1,7mM/g) i stałej adsorpcji $K_L=0,06$ L/mg (rys. 5.7b).



Rys. 5.7. Izoterma adsorpcji jonów miedzi(II) (a) oraz dopasowanie modeli Langmuira i Freundlicha do otrzymanych danych (b).

Porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi (tabela 5.1) wskazuje na dobre właściwości adsorpcyjne i możliwość potencjalnego zastosowania otrzymanego dwufazowego produktu do usuwania metali ciężkich z wód.

Tabela 5.1. Porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi.

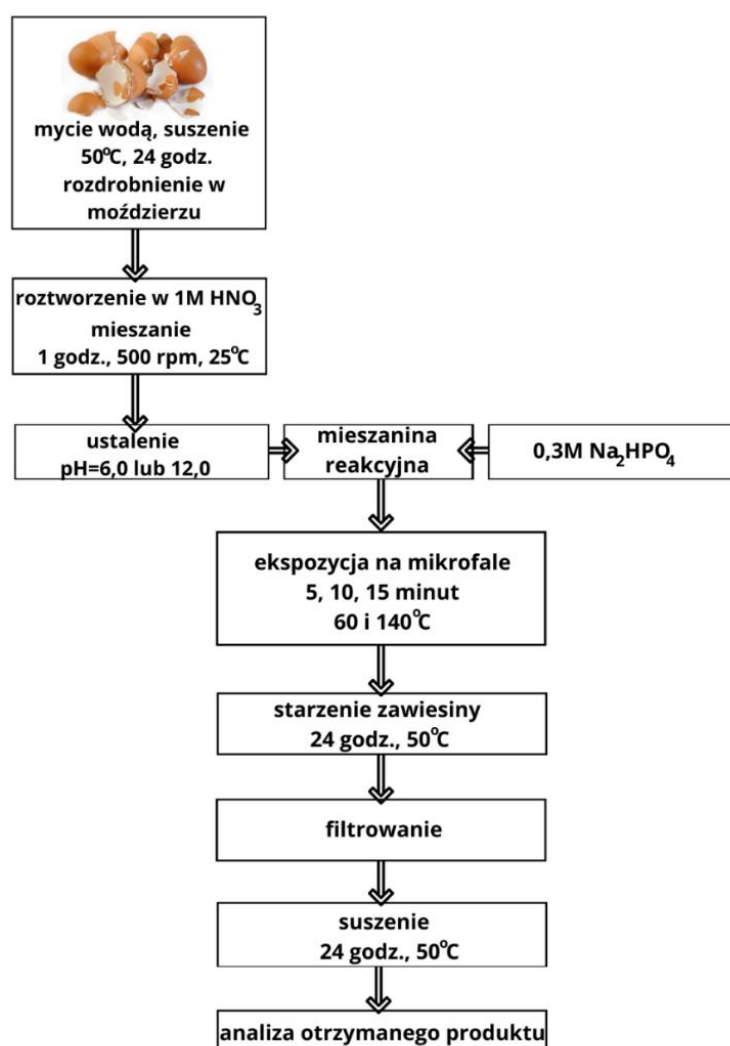
Wykorzystany adsorbent	Model Langmuira			Warunki	Cyt.
	q_m [mg/g]	K_L [L/mg]	R^2		
Modyfikowany węgiel aktywny	23,9	0,003	0,971	pH=5 T= 30°C	(Gu <i>et al.</i> , 2019; Núñez <i>et al.</i> , 2019)
Nanokompozyty Fe_3O_4 /hydroksyapatyt / β -cyklodekstryna	66,7	0,1972	0,997	pH=6 T= 25°C	(Ansari <i>et al.</i> , 2019)
hydroksyapatyt	81,6	0,00012	0,920	Neutralne pH, T= 25°C	(Orlova <i>et al.</i> , 2019)
hydroksyapatyt	55,9	0,060	0,990	pH=5 T= 25°C	(Núñez <i>et al.</i> , 2019)
Dwufazowy fosforan wapnia	105,4	0,060	0,995	pH=5 T= 25°C	Prezentowane wyniki badań

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonej syntezy otrzymano proszek składający się w 74% z hydroksyapatytu i 26% β -TCP o punkcie izoelektrycznym (IEP) przy pH=3,5. Ujemna wartość potencjału dzeta (ok. -25mV) w pH powyżej IEP wskazuje na potencjalne

wykorzystanie otrzymanego materiału jako adsorbentu do usuwania kationów metali ciężkich z roztworów wodnych. Zostało to potwierdzone wysoką pojemnością adsorpcyjną proszku względem jonów Cu^{2+} ($q_m=1,7\text{mM/g}$). Charakter adsorpcji wskazuje na adsorpcję chemiczną.

5.2. Wpływ działania promieniowania mikrofalowego na skład i morfologię syntetyzowanych fosforanów wapnia.

W celu zbadania wpływu mikrofal na strukturę i morfologię otrzymanego produktu, wykorzystano działanie mikrofal zamiast mieszania zawiesiny w temp. 25°C (Kalbarczyk, Szczeń, 2020). Syntezę przeprowadzono według schematu przedstawionego na rys. 5.8. Promieniowanie mikrofalowe dostarcza energię w postaci ciepła generowanego wewnątrz w reagujących cząsteczkach co umożliwia im szybki wzrost temperatury, a tym samym skrócenie czasu syntezy oraz efektywną transformację energii w całej objętości mieszaniny reakcyjnej (Apalangya *et al.*, 2018; Lamkhao *et al.*, 2019).

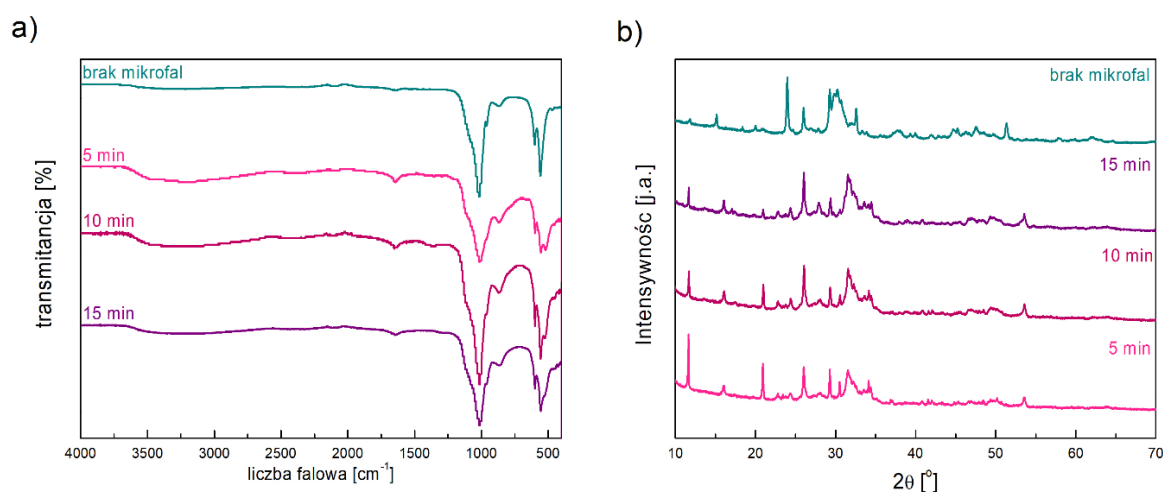


Rys. 5.8. Schemat syntezy fosforanów wapnia z wykorzystaniem mikrofal.

Widma FTIR produktów otrzymanych podczas syntezy z działaniem promieniowania mikrofalowego przez 5, 10 i 15 minut są przedstawione na rys. 5.9a. Widma wszystkich otrzymanych materiałów zawierają pasma charakterystyczne dla drgań rozciągających grupy fosforanowej w zakresie liczb falowych od 1100-550 cm^{-1} . Kształt tych pasm wskazuje, że otrzymany produkt stanowi mieszaninę form krystalicznych. Materiał otrzymany bez stosowania mikrofal zawiera pasma charakterystyczne dla β -TCP. Ponadto nie zawiera sygnałów pochodzących od grupy hydroksylowej charakterystycznych dla czystego hydroksyapatytu, co potwierdza częściową transformację HA w β -TCP (Tanimoto, Hayakawa i Nemoto, 2005). W widmach produktów otrzymanych po 5, 10 i 15 minutowym działaniu promieniowania mikrofalowego zaobserwować można dodatkowe sygnały pochodzące od kolejnych form fosforanów wapnia wskazujące, że materiały te składają się z wielu faz. W widmie materiału otrzymanego po 5-minutowej ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe obecne są pasma przy liczbach falowych 603 i 559 cm^{-1} pochodzące od drgań wiązań grupy fosforanowej, a także przy 517 cm^{-1} charakterystyczne dla wiązania (H-O)-P=O występującego w bruszytcie (Rehman i Bonfield, 1997; Binitha i Pradyumnan, 2013; Hirsch *et al.*, 2014; Sajahan i Wan Ibrahim, 2014). Ponadto, obecność pasma przy 1640 cm^{-1} wskazuje na substytucję grup PO_4^{3-} przez grupy węglanowe wewnątrz sieci krystalicznej (Rehman i Bonfield, 1997; Sajahan i Wan Ibrahim, 2014). Szerokie pasmo w zakresie 3500- 3000 cm^{-1} pochodzi od wody i obecne w widmach wszystkich produktach. W miarę wydłużania czasu ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe obserwowane jest zmniejszenie intensywności pasma przy 517 cm^{-1} , wskazujące na zanikanie bruszytu w analizowanych materiałach. Wraz z wydłużeniem czasu działania mikrofal widoczna jest także redukcja intensywności sygnału pochodzącego od rozciągającego drgania grup hydroksylowych przy 3500- 3000 cm^{-1} oraz od drgań grup węglanowych przy 1640 cm^{-1} . Na podstawie powyższej analizy można wnioskować, że wydłużenie czasu działania mikrofal powoduje przemianę bruszytu w stabilniejszą termicznie formę β -TCP.

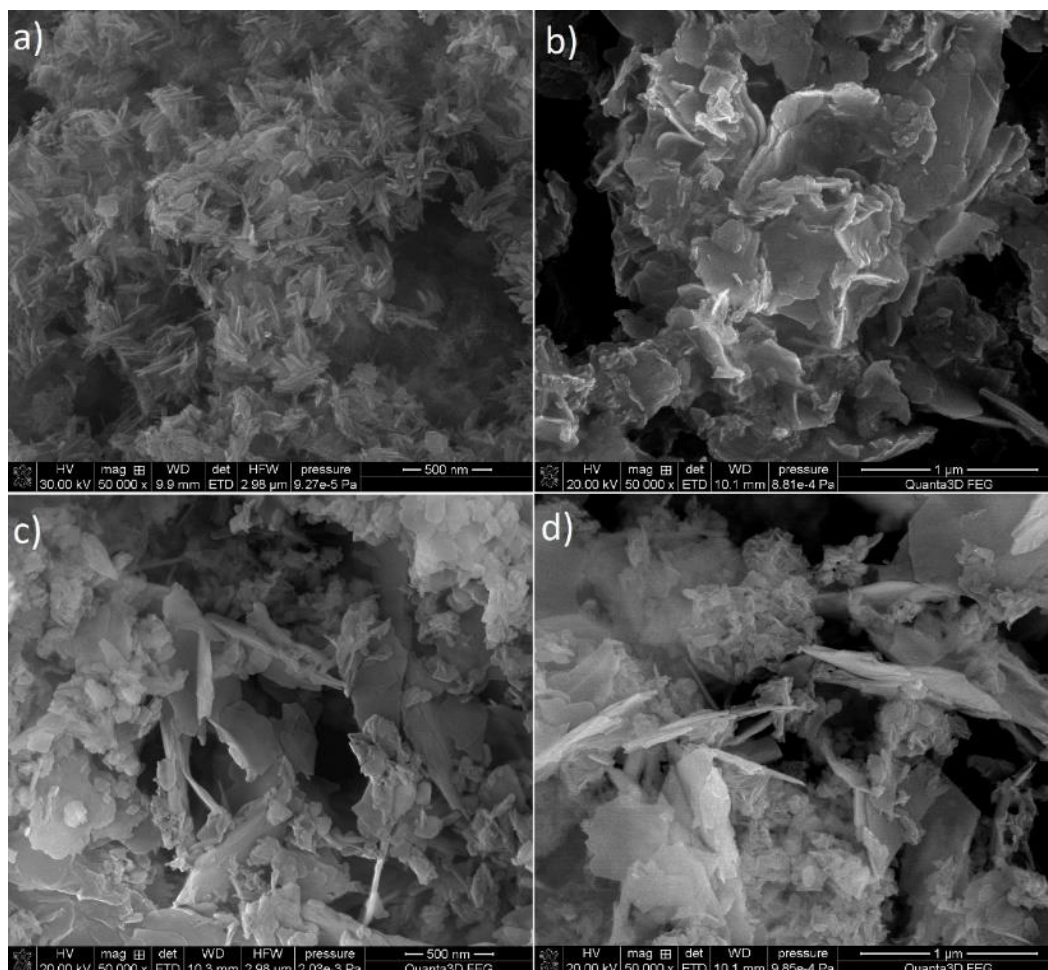
Wnioski wyciągnięte na podstawie analizy widm FTIR zostały potwierdzone za pomocą dyfraktogramów XRD (rys. 5.9b). Analizując wpływ czasu działania mikrofal można zauważyć, że w strukturze próbki otrzymanej bez działania mikrofal obecne były dwie formy: HA i β -TCP, natomiast niezależnie od długości trwania ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe w pozostałych widmach wykryto także sygnały charakterystyczne dla bruszytu przy wartościach kątów 11,5°, 20,9°, 22,7°, 29,3° oraz 34,5° (Tanimoto, Hayakawa i Nemoto, 2005). Zauważalny jest także spadek intensywności tych sygnałów wraz z wydłużaniem działania promieniowania mikrofalowego, co sugeruje stopniowe zanikanie fazy bruszytu w próbce. Należy także zwrócić uwagę na różnice

w intensywnościach pików charakterystycznych dla HA (26,0°, 31,6°, 32,0°, 34,0°, 46,2° oraz 49,3°), a także dla β -TCP (26,7°, 31,1° oraz 34,5°), przy czym intensywności te rosną wraz z wydłużaniem czasu działania mikrofal. Jest to spójne z wnioskami wynikającymi z widm FTIR i sugeruje, że 5 minutowa ekspozycja na promieniowanie mikrofalowe skutkuje materiałem wielofazowym ze znacznym udziałem HA, β -TCP i bruszytu, natomiast wydłużenie czasu ekspozycji do 15 minut powoduje zmniejszenie zawartości niestabilnego termicznie DCPD i jego transformację do odporniejszych form HA i β -TCP.



Rys. 5.9. Widma FTIR (a) oraz dyfraktogramy proszkowe (b) otrzymanych materiałów w zależności od czasu działania mikrofal.

Analiza SEM otrzymanych produktów wskazuje na znaczące różnice w budowie otrzymanych materiałów (rys. 5.10). Produkt syntezy bez użycia promieniowania mikrofalowego składał się głównie z kryształów o kształcie drobnych igieł o rozmiarach mniejszych niż 200 nm skupiających się w agregaty w obecności pojedynczych heksagonalnych płytek. Struktury igielkowe są charakterystyczne dla HA, natomiast heksagonalne dla β -TCP (Ibrahim *et al.*, 2015; Apalangya *et al.*, 2018). W wyniku 5- minutowej ekspozycji mieszaniny reakcyjnej na promieniowanie mikrofalowe w otrzymanym produkcie przeważały nieregularne blaszkowate struktury, które można przypisać do bruszytu, pomiędzy którymi zaobserwowane zostały drobne skupiska igielkowych kryształów (LeGeros *et al.*, 2003). Wydłużenie czasu działania promieniowania mikrofalowego do 10 oraz 15 minut spowodowało redukcję liczby nieregularnych, wydłużonych struktur z jednoczesnym zwiększeniem się liczby skupisk kryształów igielkowych powiązanych z fazą HA.

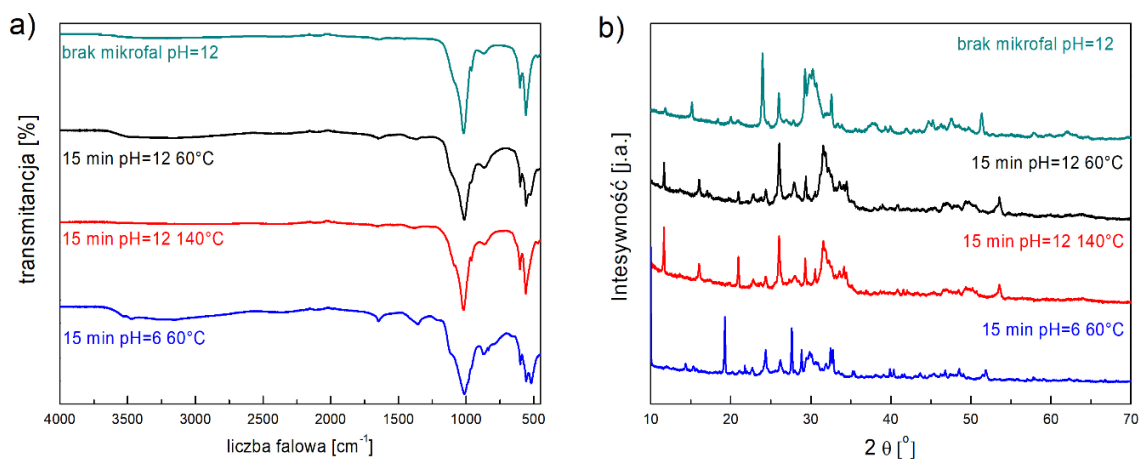


Rys. 5.10. Zdjęcia SEM materiału otrzymanego bez wykorzystania mikrofal (a) oraz przy działaniu promieniowania mikrofalowego przez: 5 (b), 10 (c) i 15 (d) minut.

W dalszych badaniach zdecydowano się określić wpływ temperatury i pH mieszaniny reakcyjnej przy najdłuższym czasie działania mikrofal, czyli 15 minut. Analizując wpływ temperatury na skład otrzymanego produktu w widmach FTIR (rys. 5.11a) zauważalna jest mniejsza intensywność pasma pochodzącego od grup węglanowych przy wartości liczby falowej ok. 870 cm^{-1} oraz w zakresie $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, a także brak sygnału pochodzącego od wody w zakresie $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ w widmach materiałów poddawanych wyższej temperaturze w trakcie syntezy. Porównując natomiast widma próbek otrzymanych przy różnych wartościach pH mieszaniny reakcyjnej można zauważyć, że prowadzenie syntezy w pH lekko kwaśnym powoduje zwiększenie intensywności pasma przy 517 cm^{-1} , jak również tych, pochodzących od grup hydroksylowych. Na tej podstawie można przypuszczać, że kwaśne środowisko stabilizuje bruszyt w badanym materiale.

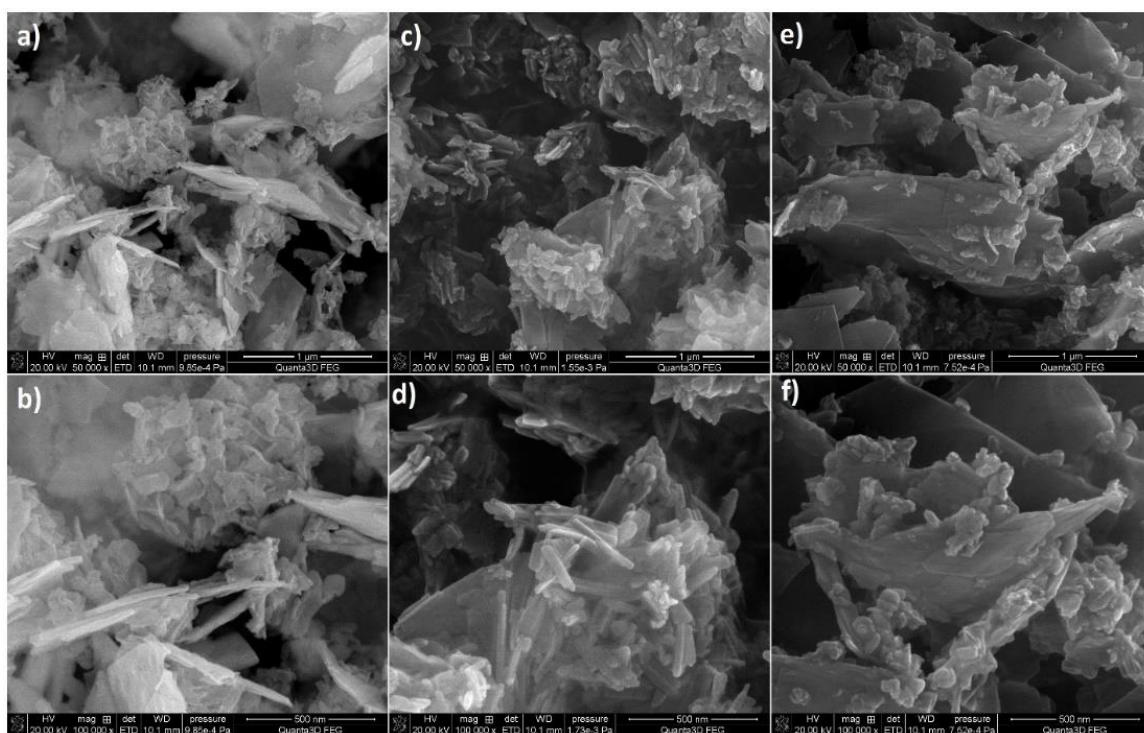
Dyfraktogramy proszkowe osadów otrzymanych w różnych temperaturach (rys. 5.11b) wskazują na większą intensywność pików pochodzących od β -TCP przy $11,5^\circ$, jak również przy $20,9^\circ$. Oznacza to, że wraz z podwyższeniem zwiększa się zawartość bruszytu w otrzymanych proszkach. Obserwuje się również wzrost sygnału przy $31,1^\circ$ pochodzącego od β -TCP. Wskazuje to, że wraz ze wzrostem temperatury wzrasta również zawartość

β -TCP w materiale, co może być spowodowane większą odpornością temperaturową i mechaniczną fazy β -TCP. Dyfraktogramy XRD materiałów otrzymanych przy różnej początkowej wartości pH również potwierdziły wnioski z analizy FTIR. Sygnały przy 11,5°, 20,9°, 29,2° i 34,1° pochodzące od fazy DCPD znacząco wzrastają wraz z obniżeniem początkowego pH roztworu (5.11b). Ponadto w widmach obecne są także charakterystyczne pozycje pików dla β -TCP i HA.



Rys. 5.11. Widma FTIR (a) oraz dyfraktogramy proszkowe (b) materiałów syntetyzowanych w różnej temperaturze oraz przy różnej wartości pH mieszaniny reakcyjnej.

Zdjęcia SEM materiałów otrzymanych na drodze syntezy z zastosowaniem mikrofal w temperaturze 60°C i 140°C pokazują powstawanie większej liczby kryształów o kształcie igieł (rys. 5.12a-d). Ponadto, struktury te są większe niż w przypadku materiału otrzymanego bez użycia mikrofal. Dodatkowo, widoczna jest także znaczna redukcja wydłużonych nieregularnych struktur (bruszytu) względem próbki otrzymanej w temperaturze 60°C. W przypadku materiału otrzymanego w lekko kwaśnym pH, w jego strukturze widoczne są duże blaszkowate fragmenty, natomiast nieliczne igiełkowe kryształy wydają się być krótsze i mieć mniej regularny kształt w porównaniu z produktem otrzymanym z roztworu alkalicznego (rys. 5.12e i f).



Rys. 5.12. Zdjęcia SEM materiałów poddawanych działaniu promieniowania mikrofalowego przez 15 minut w temperaturze 60°C przy początkowym pH=12 (**a, b**), w 140°C przy początkowym pH=12 (**c, d**) jak również w 60°C przy początkowym pH=6 (**e, f**).

Rozkład wielkości porów oraz powierzchnia właściwa otrzymanych produktów określone zostały na podstawie izoterm adsorpcji i desorpcji N₂ dla materiału otrzymanego bez stosowania promieniowania mikrofalowego, jak i dla tego, otrzymanego na skutek 15 minutowej ekspozycji na promieniowanie w temperaturze 60°C w środowisku zasadowym. Wielkości powierzchni właściwej określone metodą BET, całkowitej objętości porów i średniej średnicy porów określonej metodą BET oraz BJH zostały przedstawione w Tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Parametry strukturalne wyznaczone dla materiałów syntetyzowanych przy początkowym pH=12: bez działania mikrofal oraz przy działaniu promieniowania mikrofalowego przez 15 min. w temperaturze 60°C.

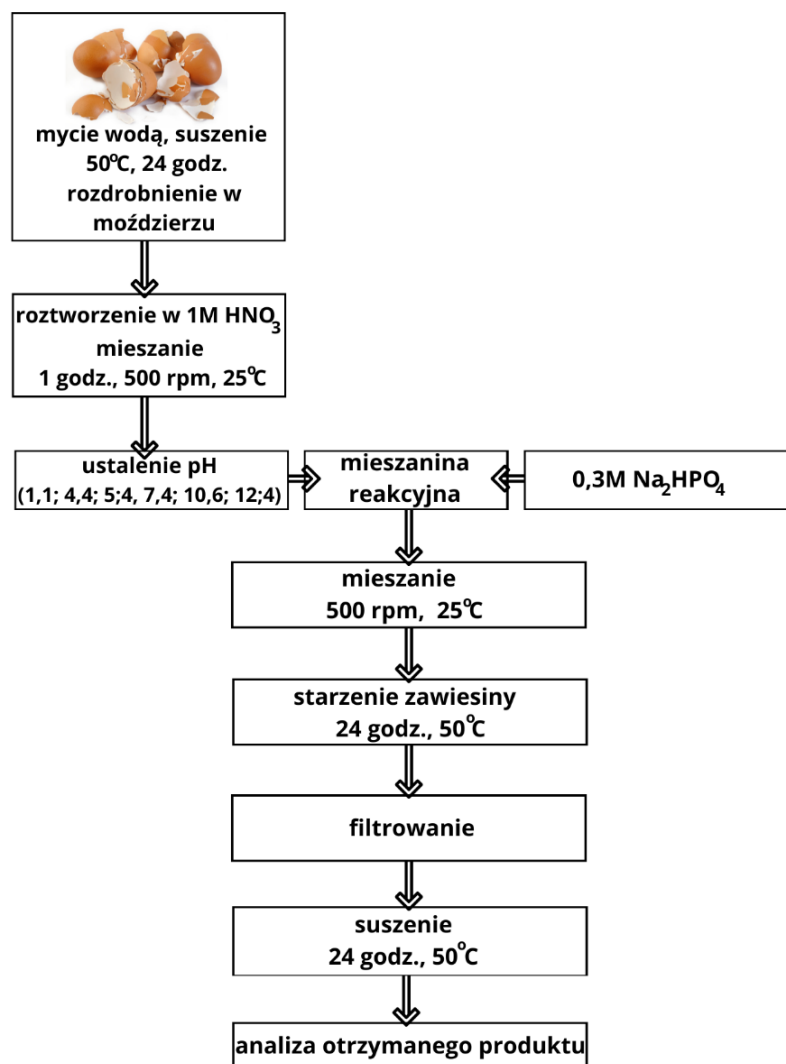
	<i>Bez działania mikrofal</i>	<i>+ 15 min działanie mikrofal</i>
Powierzchnia właściwa BET [m ² /g]	66,1	65,8
Całkowita objętość porów [cm ³ /g]	0,37	0,27
Objętość mikroporów [cm ³ /g]	0,0061	0,0055
Średnica porów wyznaczona z izoterm adsorpcji BJH [nm]	25,3	19,3

Powierzchnia właściwa i całkowita objętość porów przyjmują wartości powyżej 65 m²/g dla obu produktów. Podobne wartości tych parametrów uzyskano stosując zarówno syntetyczne, jak naturalne prekursory wapnia, jednak przy wyższych nakładach energetycznych i bardziej skomplikowanych procesach syntezy (Akram *et al.*, 2014; Yudin *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Udział mikroporów jest niewielki, stąd można stwierdzić, że oba materiały wykazują mezoporowaty charakter struktury, co jest pożądane w przypadku materiałów stosowanych jako adsorbenty przemysłowe. Duże wartości powierzchni właściwej i całkowitej objętości porów są wynikiem morfologii kryształów obserwowanej na zdjęciach SEM. Minerale otrzymane bez ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe składają się z agregatów utworzonych z kryształów igiełkowych oraz pojedynczych płatków heksagonalnych (rys. 5.10a), natomiast próbka otrzymana przy użyciu promieniowania mikrofalowego składa się głównie z arkuszowych struktur o większych rozmiarach (ok. 500 nm) i dużo mniej licznych agregatów kryształów igło-podobnych (rys. 5.10b-d). Znajduje to odzwierciedlenie w znacznie mniejszej całkowitej objętości i średnicy porów, ale nieco mniejszej wielkości powierzchni właściwej.

Material otrzymany metodą wspomaganą mikrofalami syntezy fosforanu wapnia z wykorzystaniem skorup jaj jako źródła wapnia składa się z trzech różnych form krystalicznych: HA, DCPD i β -TCP. Porównując z danymi literaturowymi, materiały otrzymane w wyniku podobnych procedur syntezy składają się w większości z jednej lub dwóch faz, głównie hydroksyapatytu o najczęściej jednorodnej morfologii i charakterystycznych dla różnych warunków syntezy kształtach nanokryształów. W przedstawionych badaniach uzyskano mieszaninę struktur igiełkowych, heksagonalnych i blaszkowatych.

5.3. Wpływ pH na właściwości otrzymywanych fosforanów wapnia.

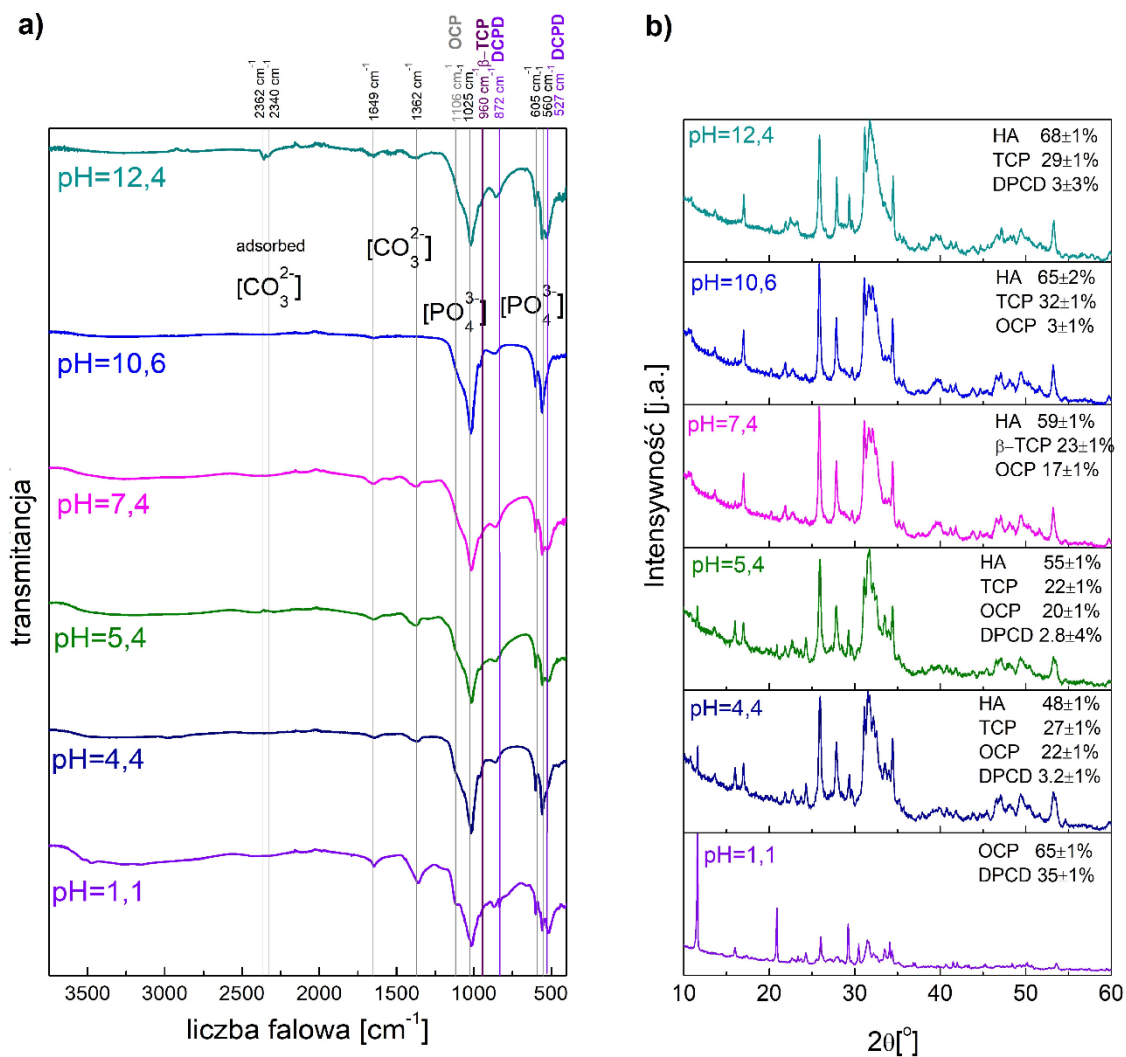
W kolejnym etapie badań postanowiono dodatkowo obniżyć temperaturę mieszania zawiesiny z 60 do 50°C oraz temperaturę starzenia osadu ze 100 do 50°C. Następnie określono wpływ pH początkowego na skład i właściwości otrzymywanych osadów fosforanu wapnia (Kalbarczyk, Szcześ, 2021). Ogólny schemat syntezy przedstawiono na rys. 5.13.



Rys. 5.13. Schemat syntezy fosforanów wapnia przy różnej wartości pH mieszaniny reakcyjnej.

Widma FTIR wszystkich otrzymanych materiałów przedstawiono na rys. 5.14a. Charakterystyczne położenia pasm absorpcji przy $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, 605 cm^{-1} oraz 560 cm^{-1} odpowiadają grupom PO_4^{3-} . Obecne są również sygnały pochodzące od grup węglanowych przy 1360 cm^{-1} , oraz w zakresie liczby falowej od $2400\text{ do }2300\text{ cm}^{-1}$ (Berzina-Cimdina i Borodajenko, 2012; S. L. Wijesinghe *et al.*, 2017). Pasma przy 1650 cm^{-1} może być pochodzić zarówno od grup węglanowych jak i wody (Destainville *et al.*, 2003). Wszystkie widma wykazują piki charakterystyczne dla fosforanów wapnia. Należy jednak zauważyć, że przy niższych początkowych wartościach pH występują dodatkowe pasma przy 872 i 527 cm^{-1} charakterystyczne dla DCPD oraz przy 1106 cm^{-1} wskazujące na tworzenie się OCP (Lee i Kumta, 2010; Karampas i Kontoyannis, 2013). Ponadto, przy najniższym $\text{pH}=1,1$ sygnały te charakteryzują się największą intensywnością, która maleje wraz ze wzrostem wartości pH . Trendy zmian widm FTIR pozwoliły zauważyć, że wraz ze wzrostem wartości pH zmniejsza się zawartość DCPD i OCP. Natomiast sygnały

charakterystyczne dla β -TCP i HA pojawiły się, gdy wartość początkowego pH wynosiła 4,4, a ich intensywność wzrastała wraz ze wzrostem wartości pH. Im bardziej alkaliczne było środowisko, tym większy był udział HA w składzie badanego proszku. Dodatkowe piki przy 1362 cm^{-1} i 832 cm^{-1} obecne w widmie próbki otrzymanej przy pH 1,1 mogą być przypisane grupom NO_3^- będącym pozostałością kwasu azotowego stosowanego w procedurze syntezy (Raynaud *et al.*, 2002; estainville *et al.*, 2003; Salimi, Javadpour i Anbia, 2012). Przy wartości pH=10,6 zanika pasmo charakterystyczne dla DCPD, a intensywność pasm charakterystycznych dla OCP znacznie się zmniejsza. Ponadto należy podkreślić, że w widmie przy wartości pH=12,4 intensywności pików pochodzących zarówno od zaadsorbowanych, jak i przyłączonych grup węglanowych ulegają zwiększeniu. W poprzednich etapach pracy, widmo FTIR materiału otrzymanego przy początkowym pH=11,4 wykazywało jedynie pasma charakterystyczne dla HA i β -TCP bez obecności DCPD i OCP. Mogło to być spowodowane wyższą temperaturą suszenia otrzymanego materiału po jego filtracji. Materiały otrzymane w tym etapie pracy suszono w temperaturze 50°C , natomiast omawiane poprzednio produkty w 100°C .

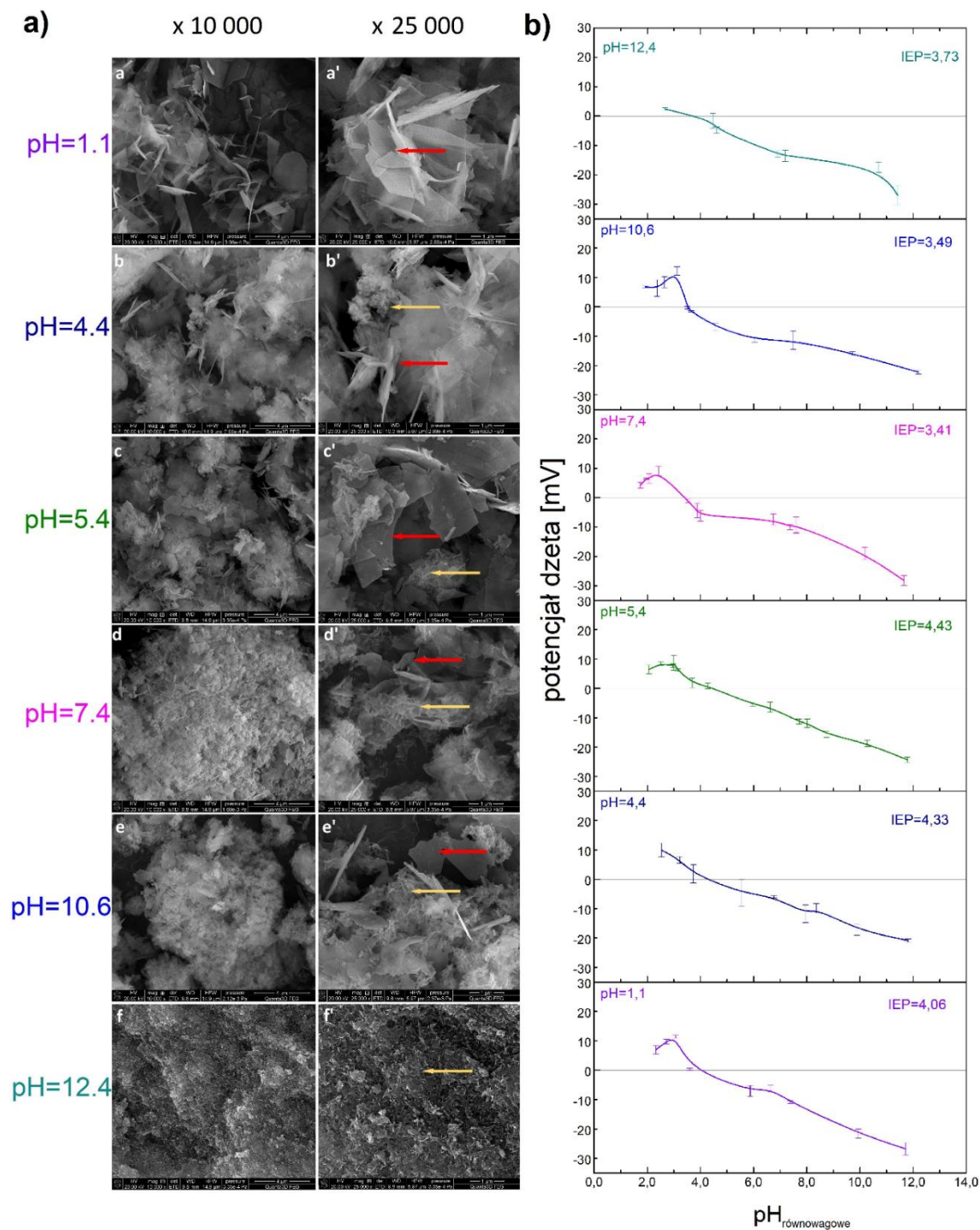


Rys. 5.14. Widma FTIR (a) i dyfraktogramy XRD (b) produktów otrzymanych w przy różnych wartościach pH mieszaniny reakcyjnej.

W celu potwierdzenia składu wytworzonych materiałów przeprowadzono analizę XRD, której wyniki przedstawiono na rys. 5.14b. Można zauważyć, że przy wartości pH równej 1,1 produkt jest materiałem dwufazowym złożonym z OCP (65%) i DCPD (35%). Wraz ze wzrostem pH zawartość OCP zmniejsza się z 65% do 22%, 20%, 8%, 0,6%, kolejno dla syntezy przy wartościach pH 4,4; 5,4; 7,4; 10,6. Zawartość bruszytu zmieniała się z 35% w próbkach przy pH 1,1 do 3% i 2,8% dla materiałów przygotowanych przy początkowych wartościach pH równej 4,4 i 5,4. Przy początkowym pH=10,6 faza bruszytu całkowicie zanikła, natomiast zawartość OCP znacznie się zmniejszyła i wynosiła tylko 0,6%. Zanikowi faz DCPD i OCP towarzyszy pojawienie się i wzrost procentowej zawartości HA i β -TCP. Sygnały charakterystyczne dla HA występowały na dyfraktogramie produktu syntetyzowanego przy wartości pH równej 4,4 i ich intensywność wzrastała wraz ze wzrostem pH. Wyniki wykazały największą zawartość HA dla produktu otrzymanego przy początkowym pH=10,6. Gdy wartość pH wzrosła do 12,4 ponownie pojawiły się

sygnały charakterystyczne dla bruszytu, położone przy wartościach θ wynoszących $11,6^\circ$ i $21,0^\circ$. Pozwala to wnioskować, że gdy początkowa wartość pH syntezy przekracza wartość 11,4 dwufazowy materiał składający się z HA i β -TCP staje się trójfazowy z fazą DCPD jako dodatkowym składnikiem.

W celu porównania zobrazowania morfologii otrzymanych minerałów wykonano zdjęcia SEM, które przedstawiono na rys. 5.15a.



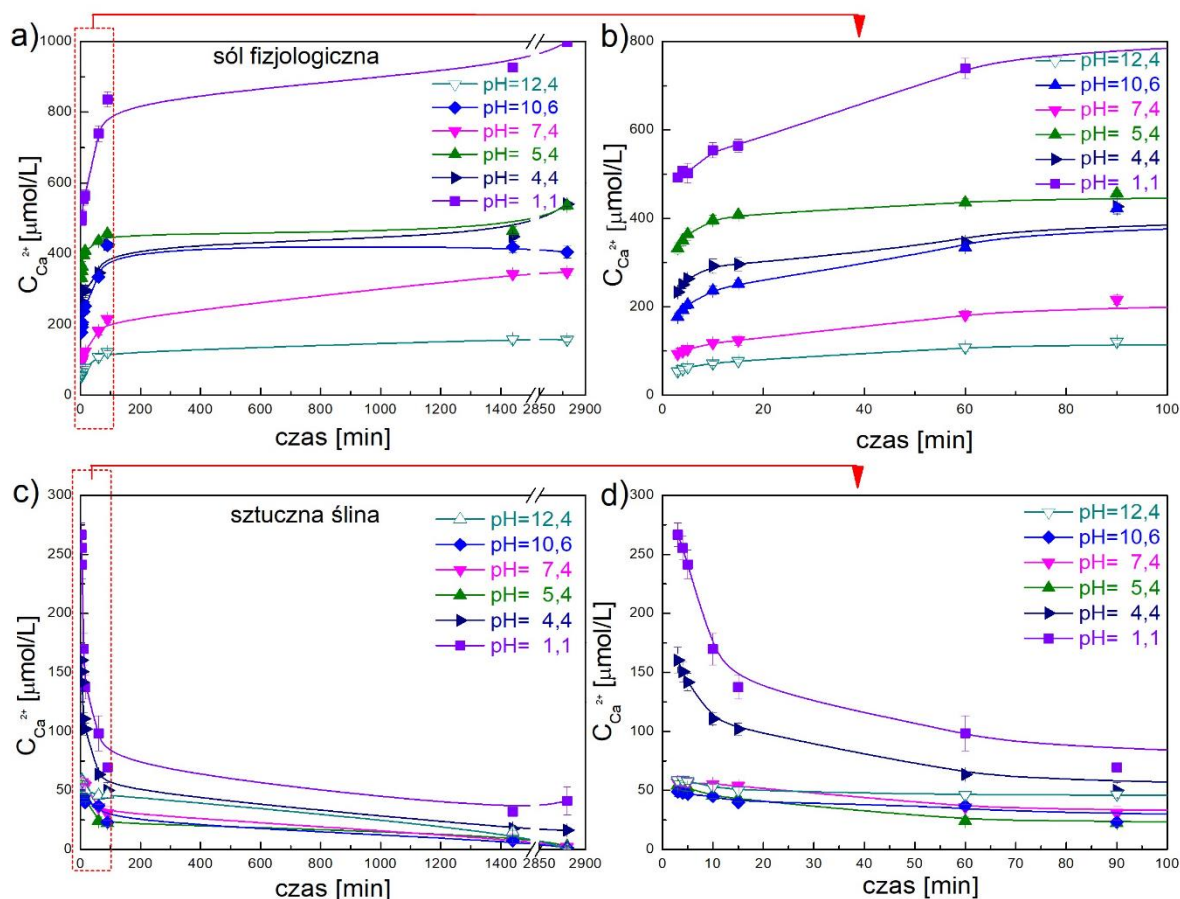
Rys. 5.15. Zdjęcia SEM produktów otrzymanych w przy różnych wartościach pH mieszaniny reakcyjnej (a) oraz zależności wartości potencjału dzeta od pH równowagowego (b).

Można zauważyć, że w strukturach otrzymanych przy niższych wartościach pH przeważają struktury podobne do arkuszy (zaznaczone czerwoną strzałką). Dla produktu zsyntetyzowanego przy pH=1,1 obecne są nieliczne, drobne, niezagregowane igielkowe struktury (oznaczone żółtą strzałką). Po przekroczeniu wartości pH=5,4 mniejsze, igielkowate struktury wykazują tendencję do tworzenia agregatów, a ich ilość wyraźnie wzrasta wraz ze wzrostem pH. Obecność tych struktur jest prawdopodobnie związana z występowaniem HA, co potwierdzają wyniki badań FTIR i XRD. Można stwierdzić, że w bardziej alkalicznym środowisku syntezy obserwuje się większą ilość agregatów składających się z drobnych struktur igielkowych.

Wartości punktu izoelektrycznego wyznaczono w 1mM roztworze KCl z dodatkiem 1 procenta wagowego produktu na podstawie pomiarów potencjałów dzeta (rys. 5.15b). Należy podkreślić, że wartości IEP są zbliżone i wynoszą nieco ponad 4 dla materiałów otrzymanych w środowisku kwaśnym i nieco poniżej 4 dla materiałów otrzymanych w środowisku alkalicznym.

W celu określenia potencjalnych możliwości zastosowania otrzymanych proszków jako składników past do zębów wspomagających proces mineralizacji szkliwa wykonano badania uwalniania jonów wapnia w roztworze sztucznej śliny. Na rys. 5.16a i b przedstawiono profil uwalniania jonów wapnia podczas kontaktu otrzymanych materiałów z komercyjnie dostępnym roztworem soli fizjologicznej. Największy wzrost stężenia jonów wapnia w roztworze występuje podczas pierwszej godziny kontaktu materiału z roztworem. Można również zauważyć, że uwalnianie Ca^{2+} zależy od składu materiału. Po 48-godzinnym kontakcie z roztworem soli fizjologicznej największe stężenie jonów wapnia występuje dla materiałów otrzymanych przy pH_0 równym 1,1, a najmniejsze dla materiałów otrzymanych przy pH_0 równym 12,4. W przypadku pozostałych próbek ilość jonów wapnia uwolnionych po 48 godzinach waha się od 300 do 400 $\mu\text{mol/L}$, przy czym stężenie jonów Ca^{2+} maleje wraz ze wzrostem początkowego pH. Nie jest to jednak zależność proporcjonalna. Zaobserwowane różnice są związane ze składem otrzymanych materiałów, zawierających różne ilości form fosforanów wapnia o różnej rozpuszczalności. Wiadomo, że rozpuszczalność fosforanu wapnia zmienia się w zależności od pH (Dorozhkin, 2016; V. Dorozhkin, 2021). Po umieszczeniu suchego materiału w roztworze wodnym zachodzi rozpuszczanie form o większej rozpuszczalności i wytrącanie bardziej stabilnych form. W badanym zakresie pH, tj. 6,8-7,4, występujące w otrzymanych materiałach formy fosforanów wapnia można uporządkować wraz ze wzrostem rozpuszczalności, zaczynając od najmniej rozpuszczalnego, w kolejności HA, β -TCP i OCP (Dorozhkin, 2016; V. Dorozhkin, 2021). Materiał otrzymany przy najbardziej kwaśnym pH_0 zawiera OCP

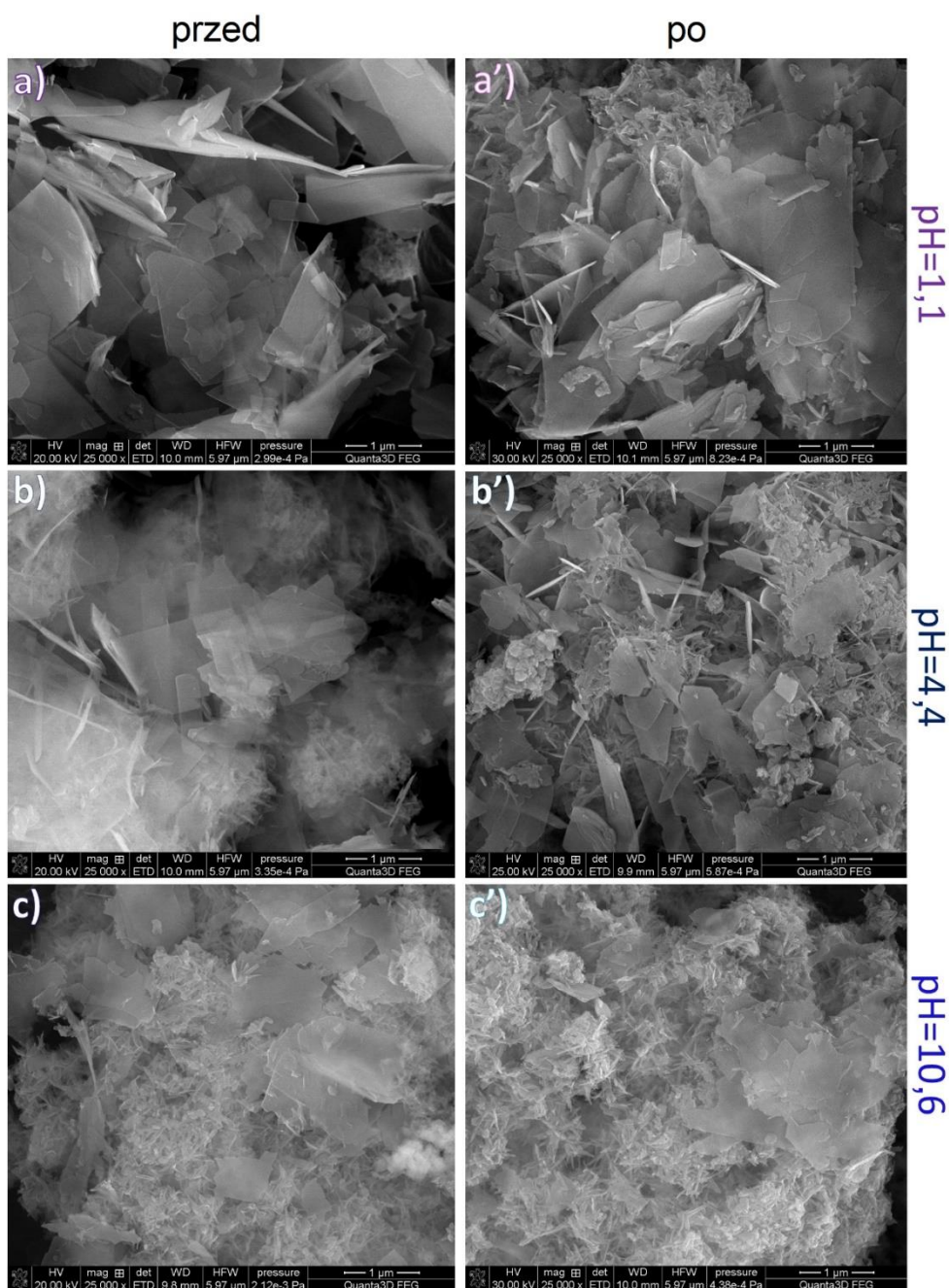
i DCPC, których rozpuszczalność jest duża (rys. 5.14b). Wraz ze wzrostem wartości początkowego pH syntezy (pH_0) wzrasta zawartość najmniej rozpuszczalnej formy, tj. HA, i jest ona najwyższa dla materiału otrzymanego w pH zasadowym (12,4), dla którego stężenie uwalnianych jonów wapnia jest najniższe.



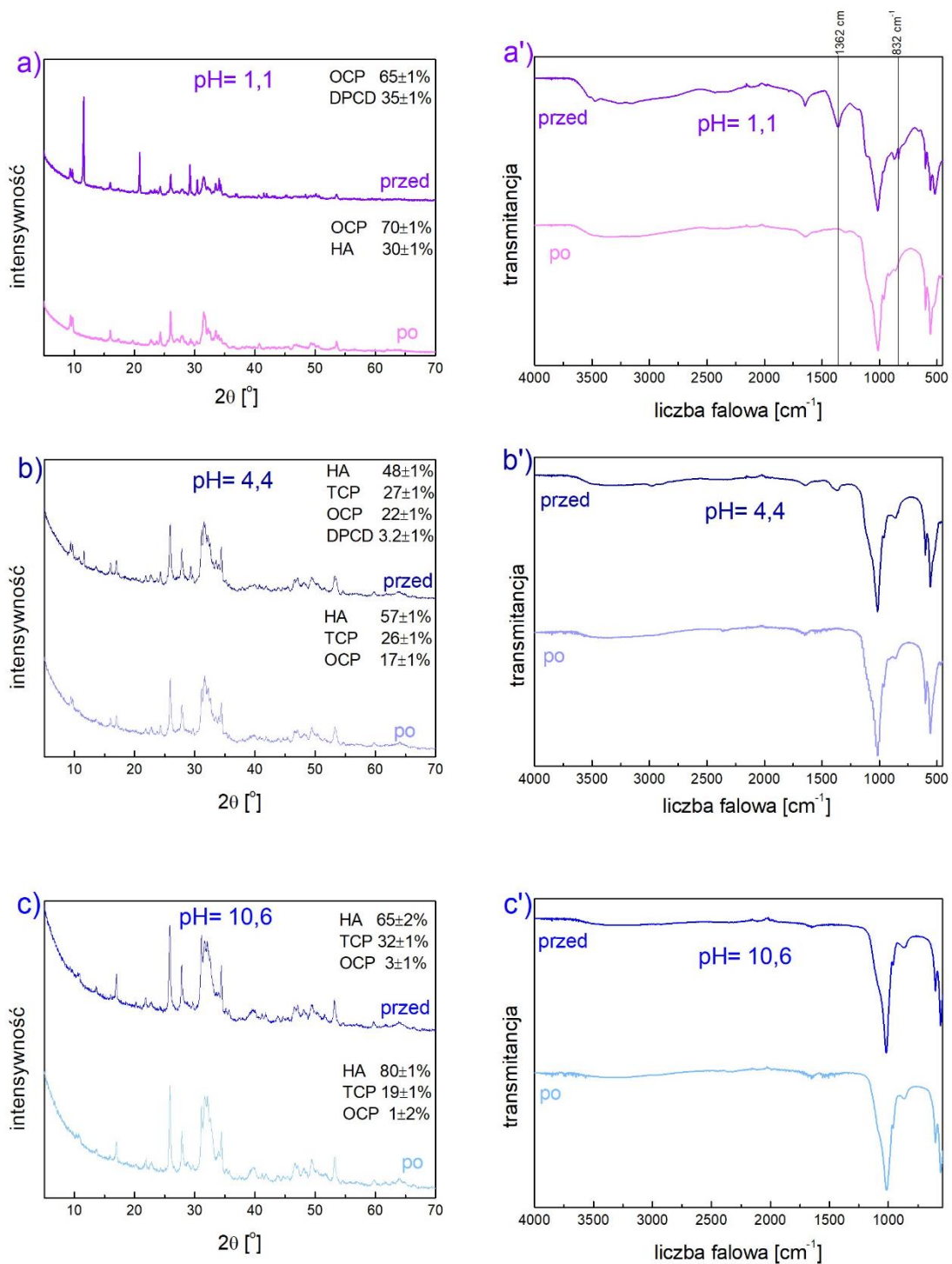
Rys. 5.16. Profile uwalniania jonów wapnia z otrzymanych materiałów w roztworze komercyjnie dostępnej soli fizjologicznej (a i b) oraz w roztworze sztucznej śliny (c i d).

Zmiany stężenia jonów wapnia podczas kontaktu materiałów z roztworem sztucznej śliny (rys. 5.16c i d) znacząco odbiegają od profili uwalniania otrzymanych podczas kontaktu z roztworem soli fizjologicznej (rys. 5.16a i b). Dla próbek otrzymanych przy najniższym początkowym pH, tj. 1,1 i 4,4 początkowo wyższe wartości stężenia jonów wapnia znacząco malały w czasie, natomiast dla próbek syntetyzowanych przy początkowym pH 5,4; 7,4; 10,6 i 12,4 już w początkowym etapie stężenie jonów wapnia było niewielkie i nieznacznie malało wraz z wydłużaniem czasu kontaktu materiałów z roztworem. Największy spadek obserwowany jest podczas pierwszej godziny kontaktu. Roztwór sztucznej śliny zawiera 6,6 mM jonów HPO_4^- i 1,5 mM jonów Ca^{2+} . Możliwe więc jest, że podczas uwalniania jonów wapnia z najbardziej rozpuszczalnego materiału stężenie jonów wapniowych i fosforanowych przekracza wartość iloczynu rozpuszczalności fosforanu wapnia i zaczynają się wytrącać nowe, mniej rozpuszczalne formy. Aby to

potwierdzić, wybrane osady po 48 godzinach kontaktu z roztworem sztucznej śliny przefiltrowano, wysuszone i poddano analizie. Jak widać na rys. 5.17a struktura minerałów po uwalnianiu jonów wapnia różni się, szczególnie w przypadku osadów uzyskanych przy kwaśnym początkowym pH syntezy. Dla próbki otrzymanej przy $\text{pH}_0=1,1$, obok mniejszych form arkuszowych pojawiają się formy igielkowe typowe dla HA. Podobne zmiany zaobserwować można w strukturze materiału otrzymanego w pH 4,4. W przypadku minerału syntetyzowanego w zasadowym pH (10,6) zmiany te są mniej widoczne.



Rys. 5.17. Zdjęcia SEM materiałów otrzymanych w początkowym pH_0 równym 1,1(a i a'), 4,4 (b i b') oraz 10,6 (c i c') przed (a-c) i po (a'-c') i uwalnianiu jonów wapnia w roztworze sztucznej śliny.



Rys. 5.18. Dyfraktogramy XRD (a-c) oraz widma FTIR (a'-c') materiałów otrzymanych w pH₀ równym 1,1 (a i a'), 4,4 (b i b') oraz 10,6 (c i c') przed (a-c) i po (a'-c') uwalnianiu jonów wapnia w roztworze sztucznej śliny.

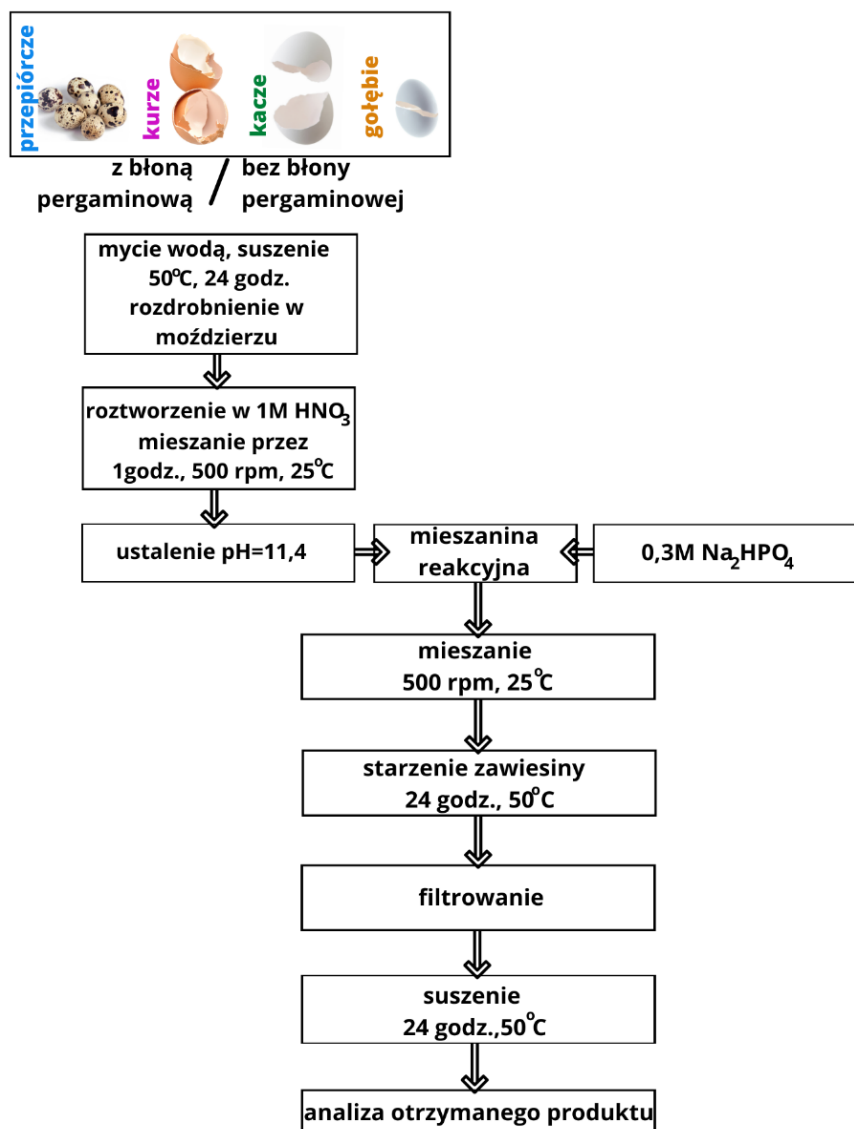
Różnice wstępujące na dyfraktogramach XRD i w widmach FTIR (rys. 5.18) potwierdzają zmiany w składzie próbek po kontakcie z roztworem sztucznej śliny. W przypadku materiału otrzymanego przy najniższym początkowym pH znika najbardziej rozpuszczalna forma, czyli DPCD, a pojawia się najmniej rozpuszczalny hydroksyapatyt (Rys. 5.18a i a'). W przypadku produktów otrzymanych przy pH 4,4 i 10,6 również wzrasta

zawartość HA, a maleje zawartość form bardziej rozpuszczalnych. Ponadto w widmie FTIR zniknęły pasma przy 1362 cm^{-1} i 832 cm^{-1} (rys. 5.18a' i b') wskazujące uwolnienie grup węglanowych podczas przemiany fazowej. Zmniejszenie intensywności szerokiego pasma w zakresie $4000\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ sugeruje natomiast mniejszą zawartość wody we wszystkich materiałach na skutek kontaktu z roztworem sztucznej śliny. Otrzymane wyniki potwierdziły możliwości aplikacyjne otrzymanych materiałów jako składnika produktów służących do higieny jamy ustnej, mogących zwiększyć remineralizację szkliwa, które składa się głównie z HA.

Skład fazowy fosforanów wapnia otrzymanych ze skorupki jaj kurzych przy różnej wartości pH początkowego był zróżnicowany i zależał od początkowej wartości od zastosowanego środowiska reakcji. Przy najbardziej kwaśnym pH wynoszącym 1,1 otrzymano dwufazowy materiał składający się z DCPD (bruszyt) i OCP. Wraz ze wzrostem pH w składzie otrzymanych materiałów pojawiły się inne formy fosforanu o mniejszej rozpuszczalności, a zawartość HA wzrosła do 68% przy pH 12,4. Początkowa wartość pH wpływa również na morfologię i kształt otrzymywanych minerałów. Profil uwalniania jonów wapnia w handlowym roztworze soli fizjologicznej oraz roztworze sztucznej śliny zależy od składu otrzymanych materiałów. Po kontakcie z roztworem sztucznej śliny zawartość HA wzrasta, podczas gdy zawartość bardziej rozpuszczalnych form fosforanów wapnia maleje. Wskazuje to na potencjalne wykorzystanie otrzymanych materiałów jako obiecujące bioresorbowalne składniki stosowane na przykład w pastach do zębów wzmacniające remineralizację szkliwa.

5.4. Wpływ skorupki jaj pochodzących od różnych gatunków ptaków oraz obecności błon pergaminowych w skorupkach

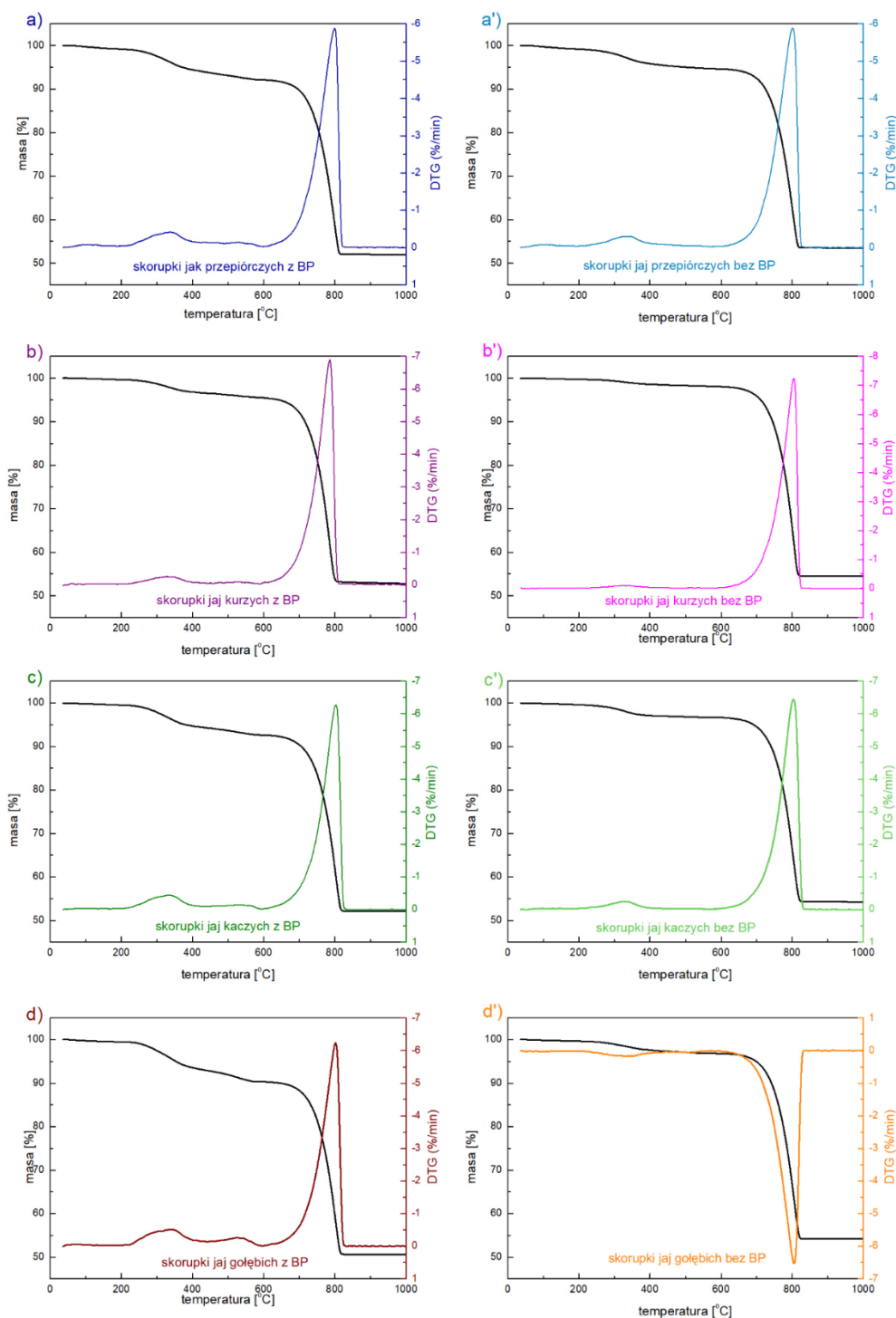
W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ wykorzystania jaj różnych gatunków ptaków powszechnie hodowanych w gospodarstwach rolniczych tj. kurzych, przepiórczych, kaczyc i gołębic, jak również wpływ obecności wewnętrznej organicznej błony pergaminowej jaj na skład i strukturę otrzymywanych materiałów (Kalbarczyk *et al.*, 2022). Schemat syntezy przedstawiono na rys. 5.19.



Rys. 5.19. Schemat syntezy fosforanów wapnia ze skorup jaj przepiórczych, kurzych, kaczych i gołębich z i bez wewnętrznej błony organicznej.

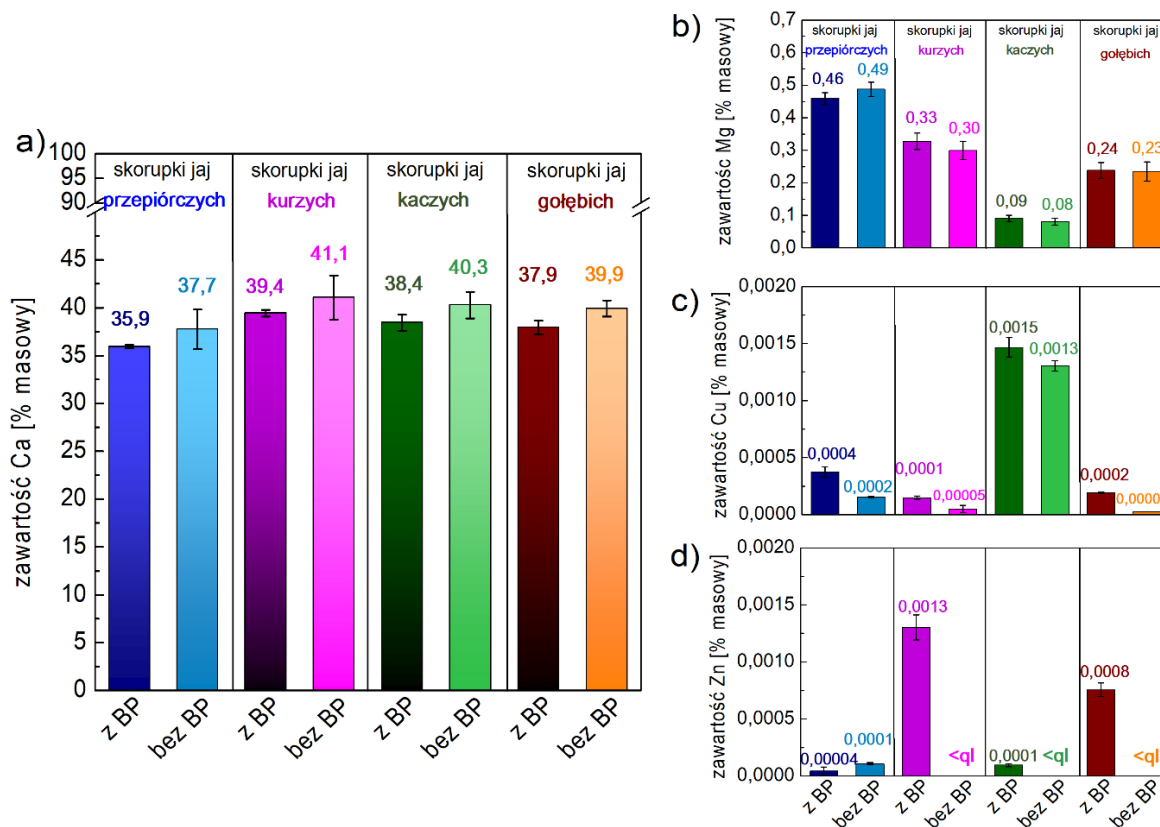
W pierwszym etapie badań skorupki jaj użyte do syntezy poddano analizie termogravimetrycznej (rys. 5.20). Na krzywych DTG otrzymanych dla wszystkich próbek występował pik przy temperaturze około 800°C, charakterystyczny dla rozkładu węgla wapnia. W porównaniu ze skorupkami jaj zawierającymi membranę (rys. 5.20a-d), dla wszystkich próbek bez membrany (rys. 5.20a'-d') pik ten jest przesunięty o kilka stopni w kierunku wyższych wartości. Spadek masy obserwowany w dwóch zakresach temperatur, tj. 200-450°C i 450-600°C może być przypisany uwalnianiu wody sieciowej i degradacji membran organicznych. Dla wszystkich skorupki jaj zawierających membranę pojawiają się dwa sygnały na krzywych DTG w temperaturze ~ 340°C i 540°C. Degradacja w wyższej temperaturze może być spowodowana rozkładem membran organicznych na drodze utleniania. Po usunięciu membran ze skorupki jaj pik przy 540°C zanika (rys. 5.20 a'-d'). Niewielkie piki w okolicach 100°C występujące na krzywych DTG otrzymanych dla

skorupek jaj przepiórczych z wewnętrzną membraną organiczną i bez niej (rys. 5.20a i a') oraz skorupki jaj gołębi z membraną (rys. 5.20d) związane są z utratą wody. Skorupki jaj zawierające błonę komórkową rozkładały się w zakresie temperatur od 200°C do 600°C z ubytkiem masy 4,65%, 7,38%, 7,88% i 9,76%, odpowiednio dla skorupki jaj kurzych, kaczych, przepiórczych i gołębi.



Rys. 5.20. Krzywe TG i DTG otrzymane dla skorupki jaj: przepiórczych (a i a'), kurzych (b i b'), kaczych (c i c'), gołębi (d i d'), z błoną pergaminową (a, b, c, d) oraz bez błony (a', b', c', d').

Skład pierwiastkowy wszystkich skorupki jaj został określony przy użyciu techniki ICP-OES (rys. 5.21a). Wszystkie surowce składały się głównie z wapnia (około 40% wagowych), magnezu (poniżej 0,5% wagowych) oraz niewielkich ilości miedzi i cynku. Po usunięciu błony organicznej zawartość wapnia wzrosła o około 2%, co jest zgodne z wynikami analizy termicznej. Najmniejszą ilość tego pierwiastka wykryto w skorupkach jaj przepiórczych, natomiast największą w próbkach jaj kurzych.

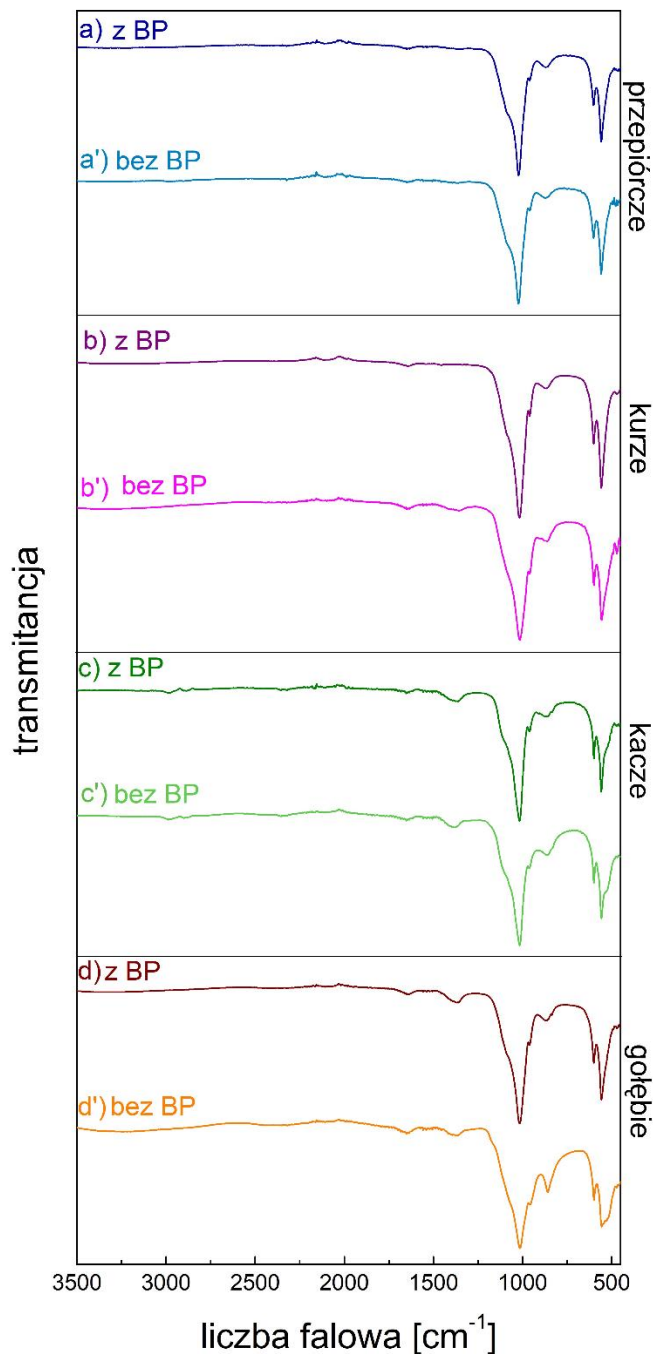


Rys. 5.21. Zawartość procentowa wapnia (a) magnezu (b) miedzi (c) i cynku (d) w skorupkach jaj ptasich wykorzystywanych jako źródło wapnia w prowadzonych badaniach.

Istotne zmiany w składzie zaobserwowano podczas analiz zawartości jonów innych metali (rys. 5.21b). Największą zawartość magnezu stwierdzono w skorupkach jaj przepiórczych (około 0,5%), a najmniejszą, poniżej 0,1%, w skorupkach jaj kaczyc. Warto też wspomnieć, że tylko w skorupkach jaj przepiórczych ilość magnezu wzrosła po usunięciu błony organicznej, sugerując tym samym obecność magnezy w strukturze nieorganicznej części skorupki jaj. W pozostałych skorupkach jaj obserwowano niewielki spadek zawartości magnezu po usunięciu błony. W próbkach wykryto również śladowe ilości miedzi i cynku, przy czym skorupki jaj kaczyc zawierały największą ilość miedzi (rys. 5.21c), natomiast skorupki jaj kurzych zawierały większą ilość cynku (rys. 5.21d) w porównaniu do pozostałych próbek. Wszystkie analizowane próbki wykazywały tendencję do spadku

zawartości jonów obu metali po usunięciu membrany, co wskazuje, że obecność tych metali jest silnie związana z organiczną częścią przytwierdzoną do skorup jaj.

Zmiany w składzie otrzymanych produktów zostały zauważone na podstawie widm FTIR przedstawionych na rys. 5.22.



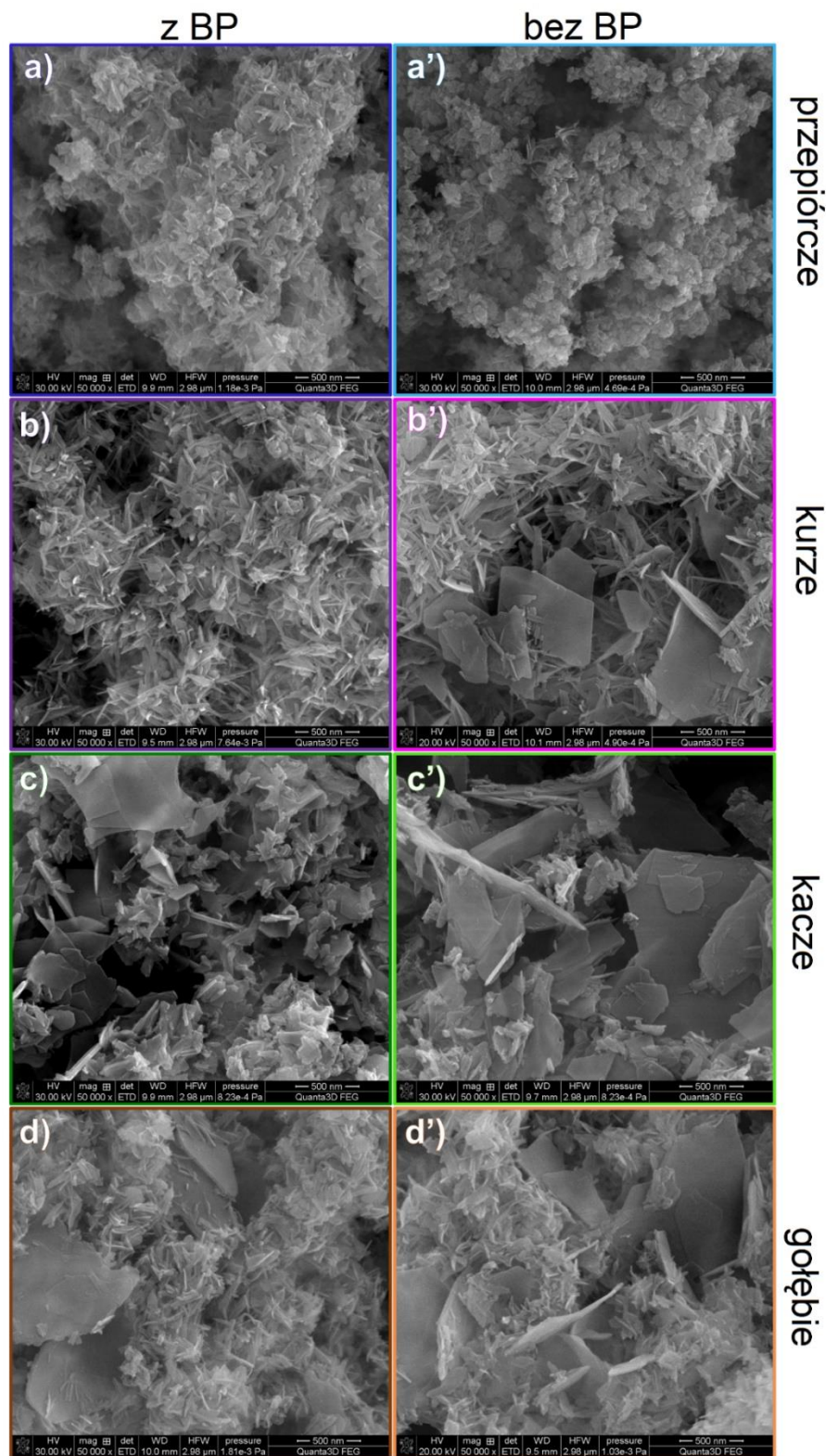
Rys. 5.22. Widma FTIR materiałów otrzymanych ze skorupek jaj ptasich: przepiórczych (a i a'), kurzych (b i b'), kaczych (c i c'), gołębich (d i d'), z wewnętrzną błoną pergaminową (BP) (a-d) i bez niej (a'-d').

Widma materiałów otrzymanych ze skorupki jaj ptasich zawierają pasma charakterystyczne dla grup fosforanowych w zakresie 600-500 cm^{-1} oraz 1100-1000 cm^{-1}

o kształcie charakterystycznym dla HA i β -TCP. Ponadto, otrzymane widma materiałów pochodzących od skorupki jaj kaczek i gołębic z błoną pergaminową oraz wszystkich skorupki pozbawionych błony pergaminowej (rys. 5.22c i d oraz a'-d') zawierają sygnały w zakresie liczb falowych $1500-1400\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od grup węglanowych (substytucja typu B). We wszystkich przypadkach, gdy do syntezy użyto skorupki jaj bez błony pergaminowej zaobserwowano wzrost intensywności pasma pochodzącego od grup węglanowych w podanym zakresie. Ponadto, w przypadku obu materiałów pochodzących ze skorupki jaj kaczek widoczny jest odmienny kształt pasma w zakresie $700-600\text{ cm}^{-1}$ wskazujący na brak β -TCP w strukturze, natomiast kształt widm produktów otrzymanych w wykorzystaniu jaj gołębic (rys. 5.22d i d') oraz kurzych bez błony pergaminowej (rys. 5.22b') wskazuje na obecność więcej niż dwóch faz.

Obrazy SEM przedstawione na rys. 5.23 pokazują, że morfologia kryształów i wielkość otrzymanych materiałów zależą od rodzaju skorupki jaj. Materiał otrzymany ze skorupki jaj przepiórczych składał się z krótkich kryształów w kształcie igieł, a także małych sześciokątnych płatków o wielkości kilku nanometrów (rys. 5.23a). W przypadku produktów pochodzących ze skorupki jaj kurzych zaobserwowano struktury w kształcie igiełek skupione w agregaty (rys. 5.23b), pomiędzy którymi rozproszone były małe sześciokątne płatki. Zastosowanie skorupki jaj kaczek i gołębic jako bioźródła wapnia pozwoliło uzyskać bardziej zróżnicowane struktury (rys. 5.23c i d). Wszystkie te próbki składały się z krótkich nano-igieł, jak również form w postaci blaszek, sporadycznie przeplatanych sześciokątnymi płatkami. Gdy do syntezy użyto skorupki jaj gołębic, obserwowano głównie kryształy w kształcie igieł i miały one mniejsze rozmiary (rys. 5.23d) w porównaniu z produktami otrzymanymi ze skorupki jaj kurzych, natomiast na zdjęciach produktu otrzymanego z jaj kaczek występowały wszystkie 3 formy kryształów: igiełkowe, arkuszkowe oraz heksagonalne płatki, jednak żadna z nich nie była dominująca (rys. 5.23c). Usunięcie organicznej membrany miało wpływ na kształt i wielkość otrzymanych kryształów niezależnie od rodzaju użytych skorupki jaj. Produkty ze skorupki jaj przepiórczych wykazywały strukturę agregatów przypominających kalafior, ale złożonych z małych sześciokątnych nanopłatków (rys. 5.23a'). W przypadku produktów otrzymanych ze skorupki jaj kurzych bez błony organicznej obserwowano dwa rodzaje kształtów: blaszki o szerokości i długości około 500 nm oraz znacznie mniejsze nano-igielki. Gdy do syntezy użyto skorupki jaj gołębic i kaczek pozbawionych membrany, struktury w kształcie arkuszy stały się bardziej rozpowszechnione (rys. 5.23c' i d') w porównaniu z produktami, gdy przetwarzano skorupki jaj z pozostałościami organicznymi. Można również zauważyć, że blaszkowate formy były większe, gdy użyto skorupki jaj bez pozostałości organicznych.

Wnioskować można, że materiał organiczny zwiększał szybkość zarodkowania i wzrost kryształów w określonym kierunku. Dlatego obecność wewnętrznej organicznej błony skutkowała tendencją do tworzenia się mniejszych kryształów o wydłużonych kształtach.



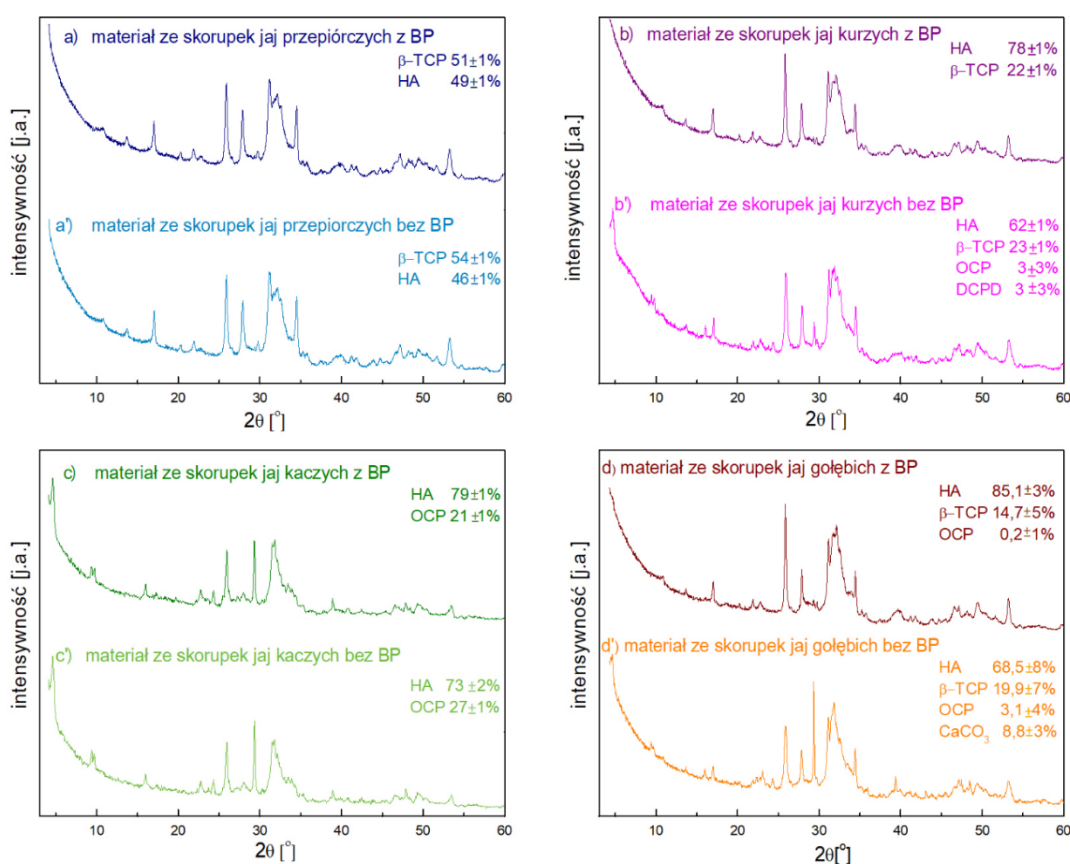
Rys. 5.23. Zdjęcia SEM materiałów otrzymanych ze skorupki jaj ptasich: przepiórczych (a i a'), kurzych (b i b'), kaczyc (c i c'), gołębic (d i d'), z wewnętrzną błoną pergaminową (BP) (a-d) i bez niej (a'-d').

Skład otrzymanych materiałów określono stosując techniką XRD oraz metodę Rietvelda do obliczenia składu procentowego materiału (Rietveld, 1969; Scrivener *et al.*, 2004) (rys. 5.24). Wszystkie próbki uzyskane ze skorupki jaj zawierających błonę organiczną składały się z dwóch form krystalograficznych fosforanów wapnia: HA i drugiej, zależnej od rodzaju jaj. HA był głównym składnikiem, a jego procentowa zawartość malała od 85,1% do 49% stosując kolejno skorupki jaj gołębic, kaczych, kurzych i przepiórczych. Warto zauważyć, że w przypadku materiałów ze skorupki jaj kaczych i kurzych z błoną pergaminową, zawartość HA była prawie taka sama. Odpowiada to różnicom w zawartości substancji organicznych oznaczonych za pomocą analizy termogravimetrycznej (rys. 5.20). Próbki otrzymane z wykorzystaniem skorupki jaj różnych gatunków ptaków z błoną wewnętrzną były zróżnicowane pod względem zawartości drugiej fazy. Z wyjątkiem materiału uzyskanego ze skorupki jaj kaczych, który zawierał OCP, dla wszystkich pozostałych materiałów drugą fazą był β -TCP. Może to wynikać z najniższej zawartości magnezu w skorupkach jaj kaczych. W przypadku materiału pochodzącego ze skorupki jaj gołębi pojawiła się niewielka ilość OCP, jednak w granicach błędów obliczeniowych (charakterystyczny pik przy 4° nie był widoczny).

Jedynie niewielki wpływ pozostałości organicznych zaobserwowano w przypadku materiałów dwufazowych uzyskanych ze skorupki jaj przepiórczych i kaczych. W porównaniu z materiałami otrzymanymi ze skorupki z membraną, zawartość HA zmniejszyła się o 3% w pierwszym z nich i o 6% w drugim. Materiały otrzymane ze skorupki jaj kurzych z błoną pergaminową składały się w 78% z HA i 22% z β -TCP, natomiast zastosowanie skorupki bez błon pergaminowych spowodowało pojawienie się dwóch mniej stabilnych form: OCP i DCPD przy znacznie obniżonej zawartości HA i takiej samej zawartości β -TCP. W przypadku materiału uzyskanego ze skorupki jaj gołębi z pozostałościami organicznymi zaobserwowano największą zawartość HA (rys. 5.24d), a fazą drugą był β -TCP (14,7%), wykryto również niewielkie ilości OCP (0,2%). Po zastosowaniu obranych skorupki jaj gołębi jako źródła wapnia, zawartość HA i β -TCP zmniejszyła się, natomiast zawartość OCP wzrosła z 0,2% do 3,1%. Ponadto obecność węglanu wapnia w analizowanej próbce wskazuje, że skorupki jaj nie zostały całkowicie rozpuszczone w kwasie podczas syntezy.

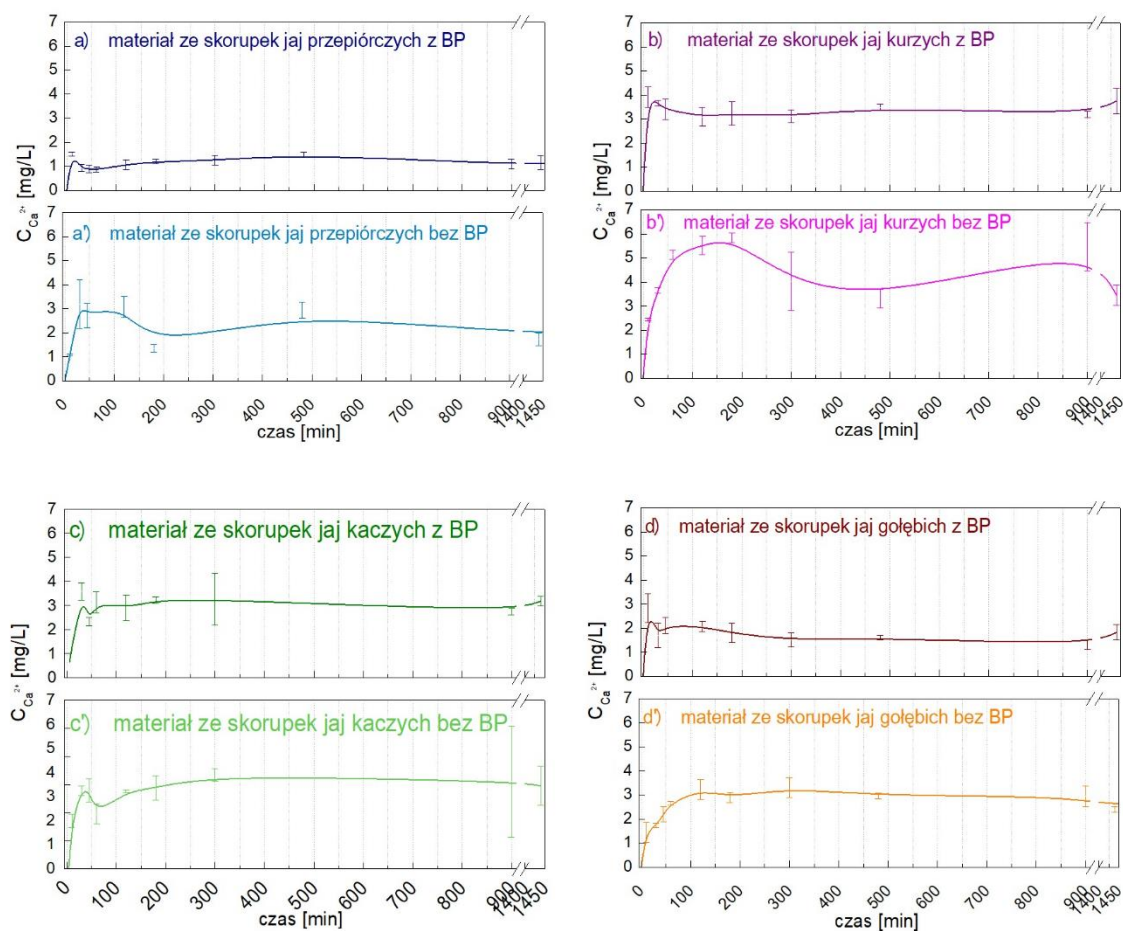
Na podstawie przedstawionych wyników udowodniono, że stosując różnego rodzaju skorupki jaj z wewnętrzną błoną organiczną, można otrzymać dwufazowe materiały fosforanu wapnia o różnym składzie. Skład ten wyraźnie zależy od rodzaju użytych jaj. Ze skorupki jaj przepiórczych, kurzych i gołębic otrzymano materiał składający się z β -TCP i HA w przybliżonym stosunku odpowiednio 1:1; 1:3,5 i 1:6. W przypadku

skorupek jaj kaczych uzyskany materiał składał się z OCP i HA w stosunku 1:4. Dwufazowe mieszaniny fosforanów wapnia zawierające HA i β -TCP lub DCPD otrzymano wcześniej stosując skorupy jaj bez błon pergaminowych lub kalcynowane (Wu *et al.*, 2017; Ganesan *et al.*, 2019; Mohd Pu'ad *et al.*, 2021) i spiekano w wysokiej temperaturze. Natomiast w przedstawionych badaniach znacznie zmniejszone zostało zużycie energii. Mechaniczne usunięcie błonek ze skorupki jaj spowodowało zmniejszenie zawartości najbardziej stabilnej fazy (HA) fosforanu wapnia przy pH=11,4, a zwiększenie zawartości form bardziej rozpuszczalnych, tj. β -TCP, OCP i DCPD. Można przypuszczać, że organiczne błony pergaminowe zawierające grupy funkcyjne pochodzące od aminokwasów mogły zwiększać lokalne stężenie jonów i przyspieszać przemianę mniej stabilnych form fosforanu wapnia w bardziej stabilne HA. Jest to spójne z obserwacją, że zwiększenie szybkości zarodkowania prowadziło do powstania większej liczby mniejszych kryształów.



Rys. 5.24. Dyfraktogramy XRD otrzymane dla materiałów otrzymanych ze skorupki jaj ptasich: przepiórczych (a i a'), kurzych (b i b'), kaczych (c i c'), gołębic (d i d'), z wewnętrzną błoną pergaminową (BP) (a-d) i bez niej (a'-d').

W celu wykazania potencjalnego zastosowania biomedycznego otrzymanych materiałów fosforanu wapnia, określono profil uwalniania jonów wapnia w buforze PBS przy pH wynoszącym 7,4 w temperaturze pokojowej (rys. 5.25).



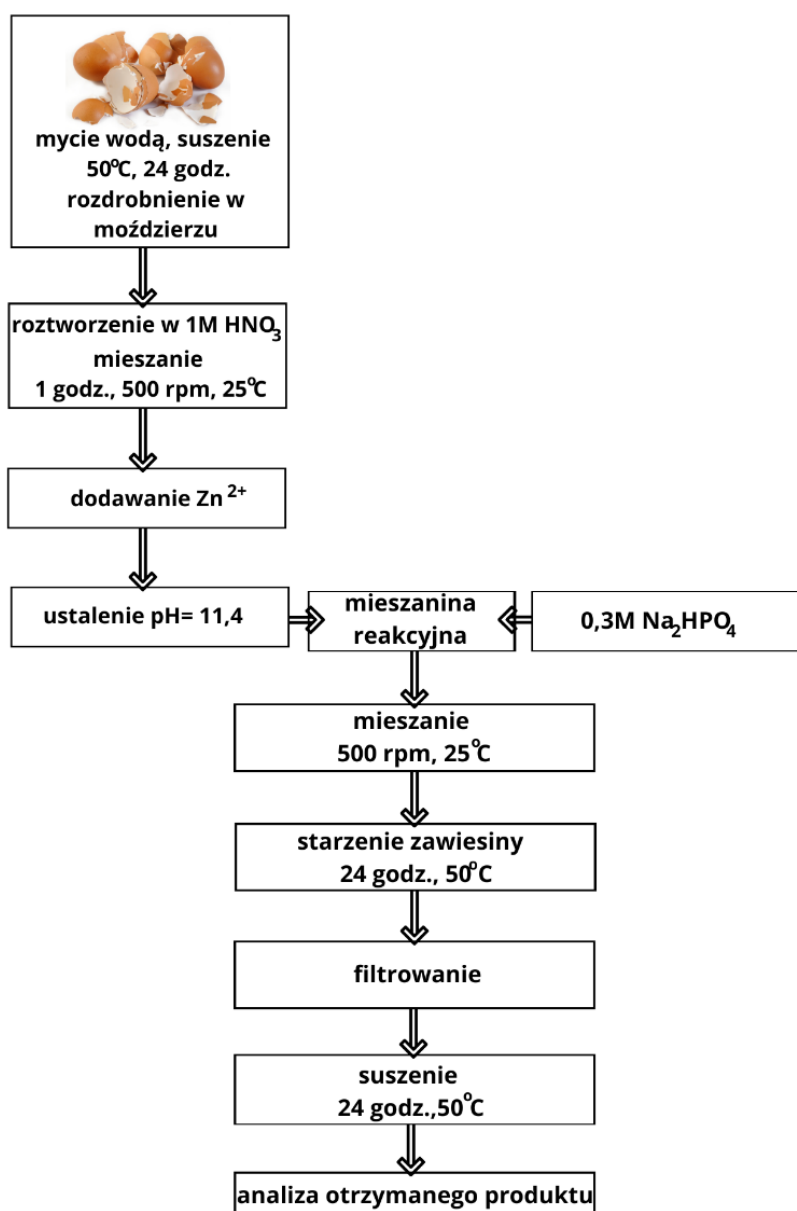
Rys. 5.25. Profil uwalniania jonów wapnia z otrzymanych materiałów otrzymanych z użyciem skorupki jaj ptasich: bez (a–d) i z (a'–d') błoną pergaminową (BP), pochodzących od różnych gatunków paktów.

Jak pokazano na rys. 5.25, większość jonów wapnia została uwolniona w ciągu pierwszej godziny. Analizując profil uwalniania z materiałów otrzymanych ze skorupki jaj zawierających błonę pergaminową, stężenie uwolnionych jonów wapnia w roztworze maleje w kolejności kura > kaczka > gołąb > przepiórka. Natomiast stężenia jonów Ca^{2+} uwolnionych z materiałów otrzymanych z użyciem skorupki jaj kurzych i kaczek różniły się tylko nieznacznie. W przypadku fosforanów wapnia otrzymanych w wyniku syntezy z użyciem skorupki jaj bez błony pergaminowej, stężenie uwolnionych jonów wapnia wzrosło. Ponadto, profil stężenia zmieniał się w czasie, wskazując, że proces uwalniania tych jonów był wolniejszy. Było to najmniej zauważalne w przypadku materiału otrzymanego ze skorupki jaj kaczek. Im wyższa zawartość najmniej rozpuszczalnej formy, czyli HA, tym mniejsze uwalnianie jonów wapnia. Profile uwalniania są zgodne z danymi XRD (rys. 5.24), pokazując mniejszą zawartość najbardziej stabilnych HA w materiałach otrzymanych ze skorupki jaj bez błon pergaminowych. Obecność drugiej, bardziej rozpuszczalnej fazy w produkcie może zapewnić uwalnianie do środowiska jonów

kluczowych dla procesu biomineralizacji (tj. wapnia i fosforu), podczas gdy stabilny HA może pełnić rolę rusztowania dla materiału zastępującego tkanki twarde.

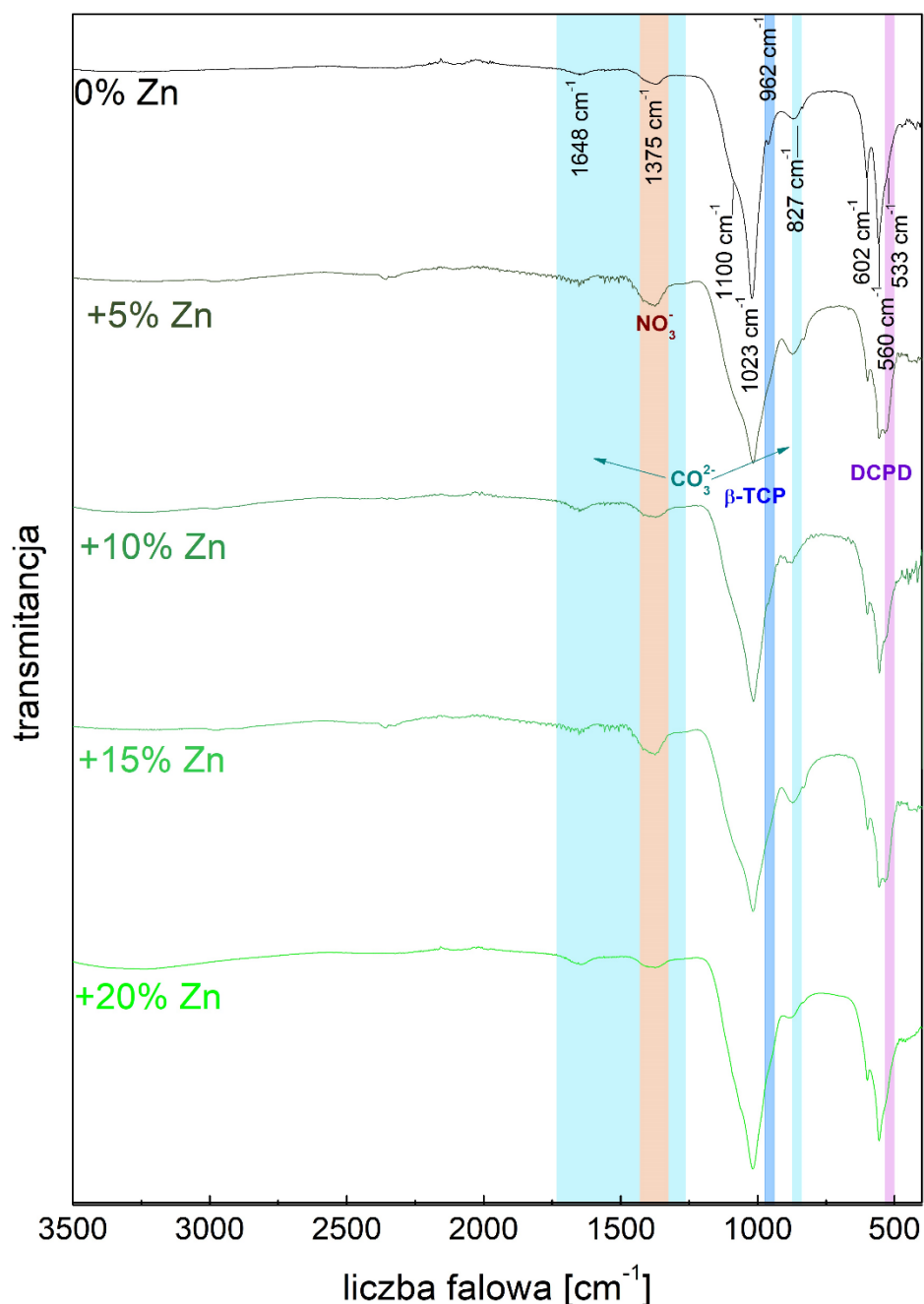
5.5. Wpływ domieszkowania jonami cynku na właściwości otrzymywanych fosforanów wapnia

W celu zbadania wpływu obecności cynku na skład i morfologię otrzymanych materiałów zmodyfikowano procedurę syntezy tak, aby stosunek molowy cynku do wapnia wynosił odpowiednio 5, 10, 15 i 20%. Po rozтворzeniu skorupki jaj kurzych w kwasie, do powstałego roztworu dodawano odpowiednie objętości roztworu azotanu(V) cynku. Kolejne etapy syntezy były analogiczne do poprzednio opisanych procedur i są schematycznie przedstawione na rys. 5.26 (Kalbarczyk *et al.*, 2023).



Rys. 5.26. Schemat syntezy fosforanów wapnia domieszkowanych cynkiem.

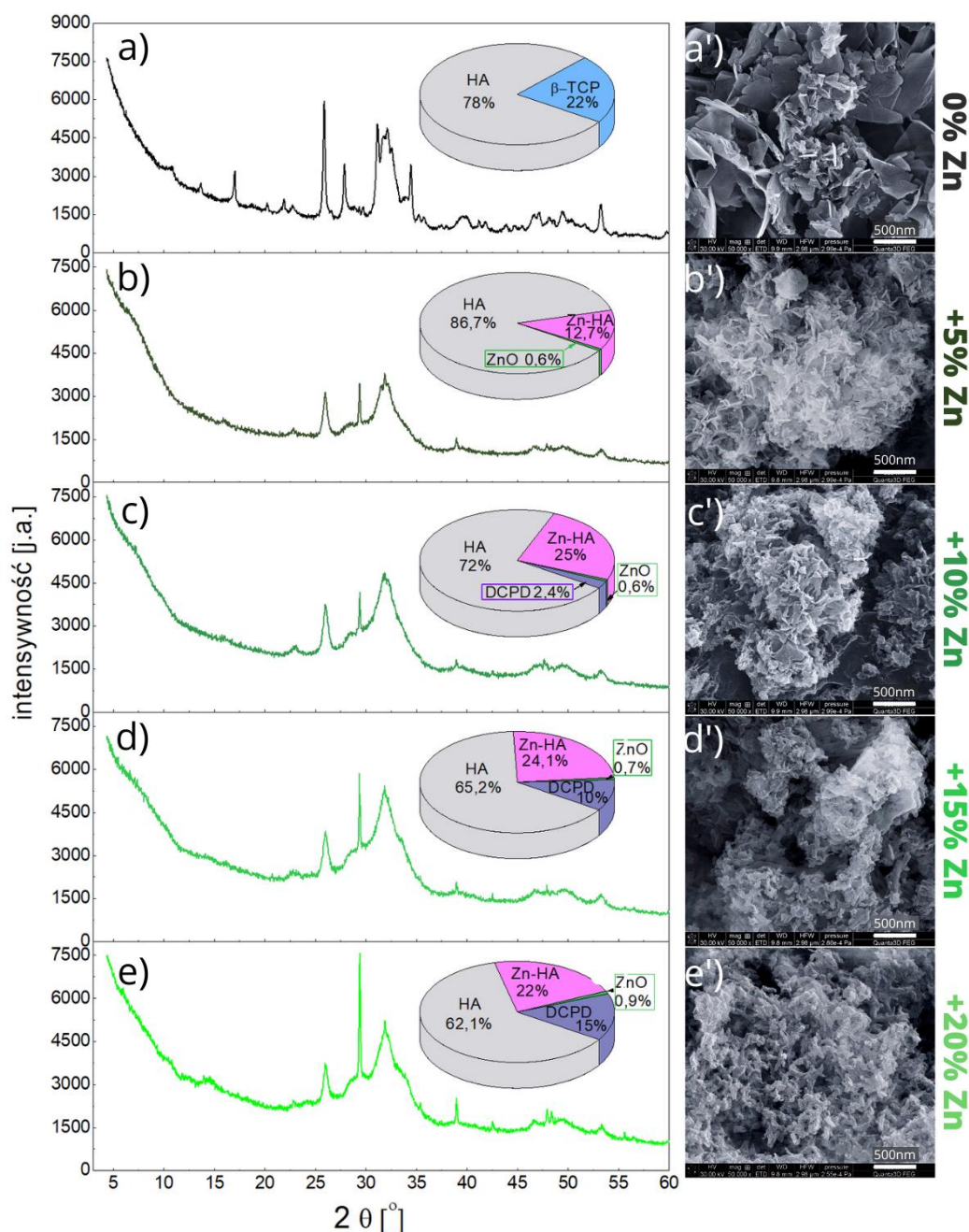
Analiza składu otrzymanych proszków była przeprowadzona metodą FTIR. Materiał o największej zawartości cynku (20% Zn) był bardzo twardy i zbity co uniemożliwiało wykonanie analizy. Widma FTIR wszystkich otrzymanych materiałów (rys. 5.27) wykazały obecność pasm charakterystycznych dla fosforanów wapnia: pasmo drgań rozciągających P-O przy 1100, 1032 i 962 cm^{-1} oraz piki przy 602 i 560 cm^{-1} przypisane do drgań O-P-O w grupie fosforanowej (Kaygili i Tatar, 2012; Thian *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2017). Obecność pasma przy 827 cm^{-1} może być związana z substytucją grup hydroksylowych przez grupy węglanowe na powierzchni podczas wzrostu kryształu (apatyt typu A), natomiast pasma w zakresie od 1650 do 1300 cm^{-1} można przypisać drganiom grup CO_3^{2-} związanych z substytucją PO_4^{3-} (apatyt typu A). Reakcja substytucji przez grupy węglanowe mogła być spowodowana reakcją pomiędzy HA a dwutlenkiem węgla z powietrza, jak również prekursorami syntezy (Rehman i Bonfield, 1997; Thian *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2017). Słaby sygnał w pozycji pasma 2363 cm^{-1} odpowiada grupom CO_3^{2-} zaadsorbowanym na powierzchni materiałów (Berzina-Cimdina i Borodajenko, 2012). Szerokie pasmo o małej intensywności ulokowane przy 1375 cm^{-1} może być również związane z pozostałościami grup NO_3^- z mieszaniny reakcyjnej (Kaygili i Tatar, 2012). Kształt widm wskazuje na wielofazowy skład wszystkich próbek. Pasma przy liczbie falowej 533 cm^{-1} wskazuje na obecność bruszytu, natomiast sygnał przy 962 cm^{-1} występujący tylko dla próbki niedomieszkowanej jonami cynku pochodzi od β -TCP. Można zauważyć, że wraz ze wzrostem zawartości cynku w mieszaninie reakcyjnej następuje wzmocnienie sygnału charakterystycznego dla bruszytu, natomiast pasmo pochodzące od β -TCP zanika. Ostry sygnał w zakresie liczb falowych od 1150 cm^{-1} do 950 cm^{-1} wskazuje na wysoki stopień krystaliczności struktur otrzymanych materiałów.



Rys. 5.27. Widma FTIR otrzymanych materiałów.

W celu potwierdzenia wniosków pochodzących z analizy FTIR wykonano badania XRD, a dyfraktogramy przedstawiono na rys. 5.28a-e. Do wykresów dołączone zostały także procentowe składy produktów obliczone metodą Rietvelda (Rietveld, 1969). Produkt otrzymany bez dodatku cynku składa się w 78% z HA, a w 22% z β-TCP. Obecność Zn w dużym stopniu wpływa na skład produktu. Wbudowanie jonów cynku powoduje zanik β-TCP i pojawienie się w próbkach HA domieszkowanego cynkiem. Ponadto, produkty zawierały niewielką ilość ZnO, poniżej 1%. Można zauważyć, że próbka oznaczona jako 5% Zn składa się z 86,7% HA, 12,7% Zn-HA i 0,6% ZnO. Dalsze zwiększanie ilości Zn spowodowało pojawienie się bruszytu i wzrost jego zawartości w produktach od 2,4% dla

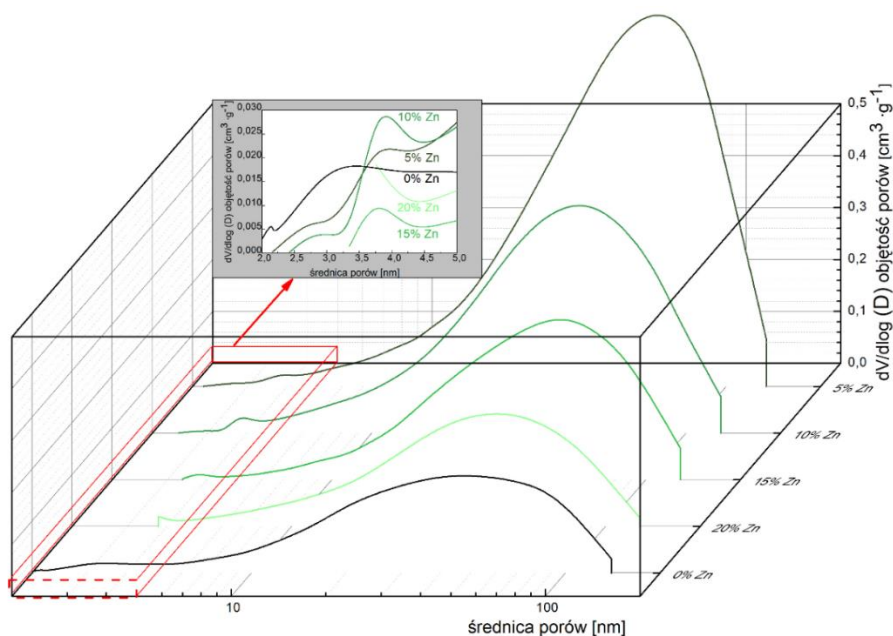
próbki 10% Zn do 15% dla najwyższej zawartości Zn. Wzrostowi zawartości DCPD towarzyszy stopniowy spadek zawartości HA przy nieznacznie zmieniającej się zawartości Zn-HA. Na podstawie wyników można wnioskować, że niewielka ilość Zn może przyspieszać transformację mniej stabilne formy fosforanu wapnia w HA i Zn-HA, natomiast zwiększenie zawartości jonów cynku sprzyja tworzeniu bruszytu. Jest to zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na zdolność cynku do hamowania tworzenia HA i zmniejszania wielkości krystalitów (Marques *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017).



Rys. 5.28. Dyfraktogramy XRD wraz z procentowym składem obliczonym metodą Rietvelda (a-e) oraz zdjęcia SEM (a'-e') otrzymanych produktów.

Zmiany morfologiczne próbek widoczne są na rys. 5.28a'-e'. Można zauważyć, że próbka bez dodatku Zn składa się z dużych, płatkowych, zagregowanych struktur. Nawet najmniejsza zawartość jonów cynku silnie wpływała na kształt i wielkość kryształów. W strukturze produktu o 5% początkowej zawartości Zn zauważalne są drobne, nieregularne, połączone ze sobą płatki o mniejszych rozmiarach. Dalszy wzrost zawartości Zn powoduje tworzenie się agregatów o kształcie podobnym do kalafiora. W przypadku próbek o początkowej zawartości cynku powyżej 10%, struktura materiału staje się bardziej zwarta.

Zmiany w morfologii otrzymanych materiałów znajdują odzwierciedlenie w wartościach powierzchni właściwej oraz wielkości i objętości porów przedstawionych w tabeli 5.2. i na rys. 5.29.



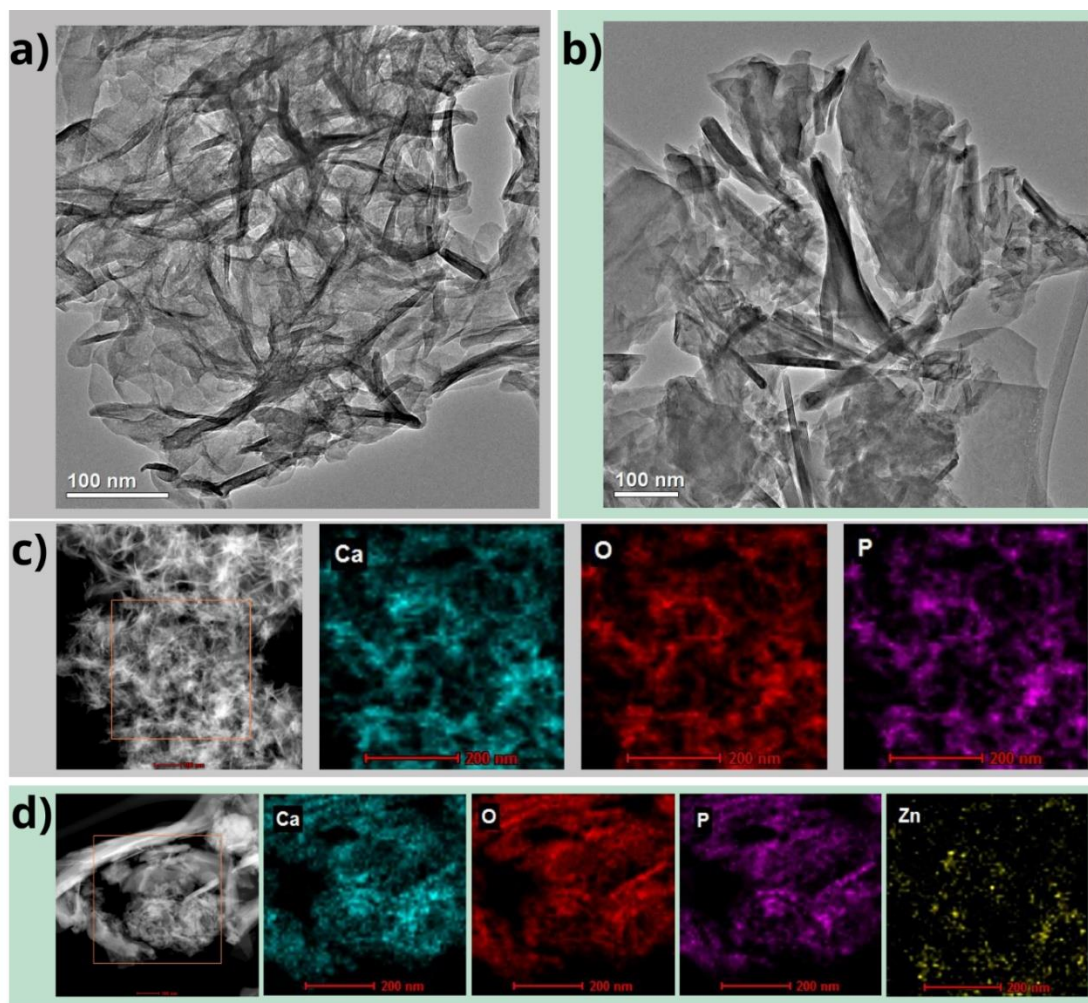
Rys. 5.29. Rozkład wielkości porów otrzymanych produktów.

Tabela 5.2. Parametry porozymetryczne otrzymanych materiałów.

	0% Zn	5% Zn	10% Zn	15% Zn	20% Zn
Powierzchnia właściwa BET [m ² /g]	36,3	80,1	56,0	30,0	25,2
Całkowita objętość porów [cm ³ /g]	0,187	0,553	0,352	0,242	0,179
Objętość mikroporów [cm ³ /g]	0,005	19,719	0,005	0,004	0,002
Średnia średnica porów wyznaczona z izoterm adsorpcji BET [nm]	25,4	34,6	29,4	38,0	32,2

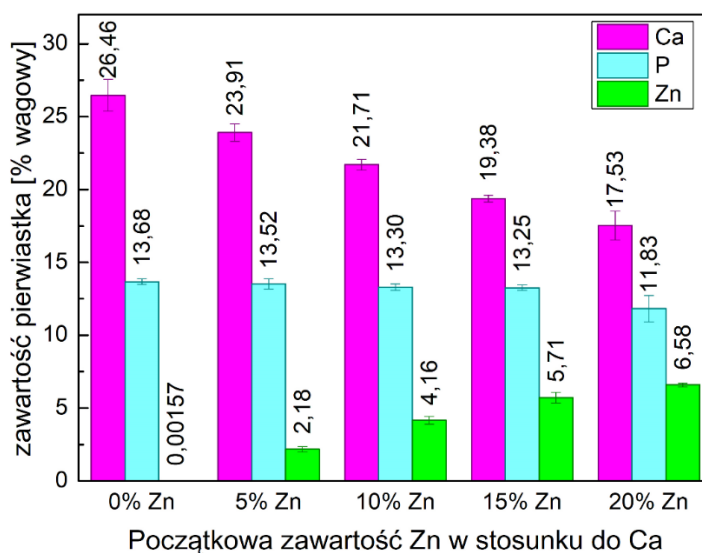
Zastąpienie 5% molowych Ca jonami cynku powoduje wzrost powierzchni BET z 36,3 m²/g do 80,1 m²/g. Wraz z dalszym wzrostem zawartości Zn powierzchnia maleje do 25,2 m²/g przy początkowej zawartości Zn wynoszącej 20%. Podobnym zmianom ulega całkowita objętość porów, objętość mikroporów, średnica porów i rozkład wielkości porów.

Morfologię i skład materiału niedomieszkowanego cynkiem oraz materiału zawierającego 10% Zn scharakteryzowano również metodą TEM. W przypadku braku cynku (0% Zn) potwierdza ona powstawanie agregatów składających się głównie z kryształów o kształtach blaszkowatych i nielicznie widocznych igłopodobnych kryształów (rys. 5.30a). Z rys. 5.30b widać wyraźnie, że obecność cynku powoduje, iż w strukturze materiału przeważają mniejsze kryształy o wymiarach około 100 nm, głównie w kształcie igieł, i tylko nieliczne kryształy blaszkowate. Profil EDX potwierdza równomierne rozmieszczenie atomów Ca, O i P (rys. 5.30c i d), jak również w przypadku domieszkowania jonami cynku obecność atomów Zn.



Rys. 5.30 Zdjęcia TEM materiałów bez cynku (a) i z 10% zawartością cynku (b) oraz profile TEM-EDX dla próbki bez Zn (c) i 10% Zn (d).

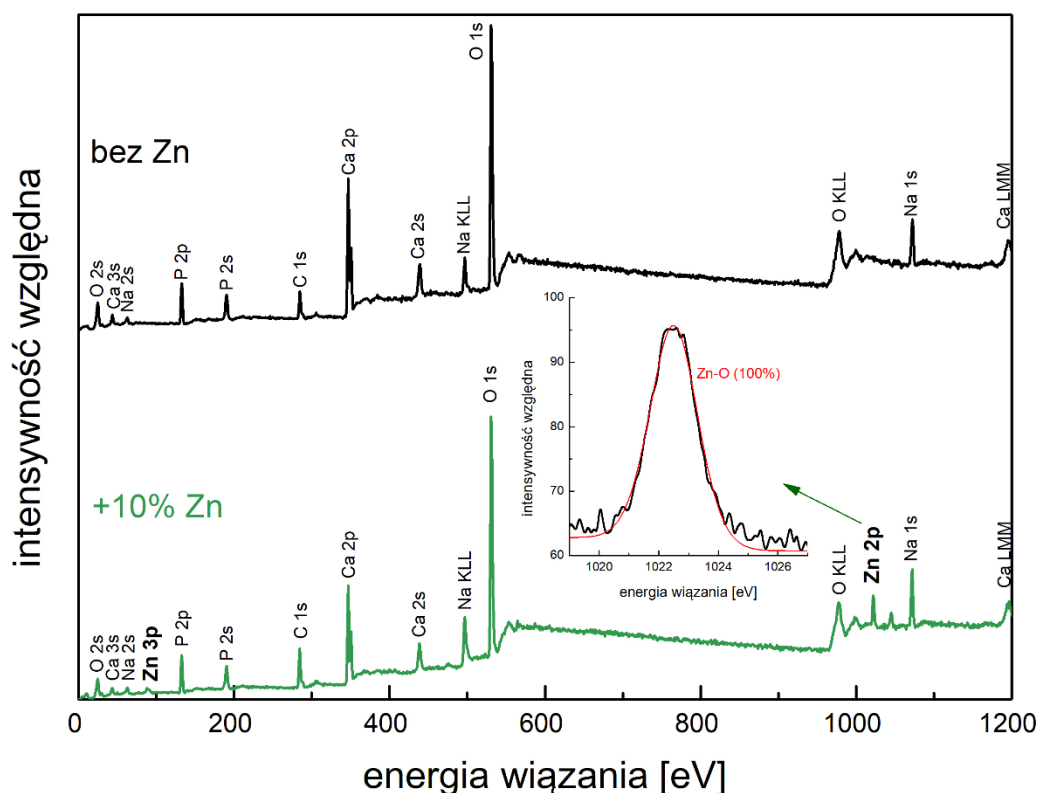
Zawartość cynku w otrzymanych materiałach oznaczona została techniką ICP-OES i jest przedstawiona na rys. 5.31. Widać, że zawartość Zn w próbkach rośnie wraz ze wzrostem początkowej ilości jonów cynku. Obliczona molowa % zawartość cynku w próbkach ($\pm 1\%$) wynosi odpowiednio: 5,4%, 10,8%, 15,6% i 18,6% i wskazuje, że zastępują one równoważną ilość jonów Ca potwierdzając dobre dopasowanie wartości planowanych i doświadczalnych.



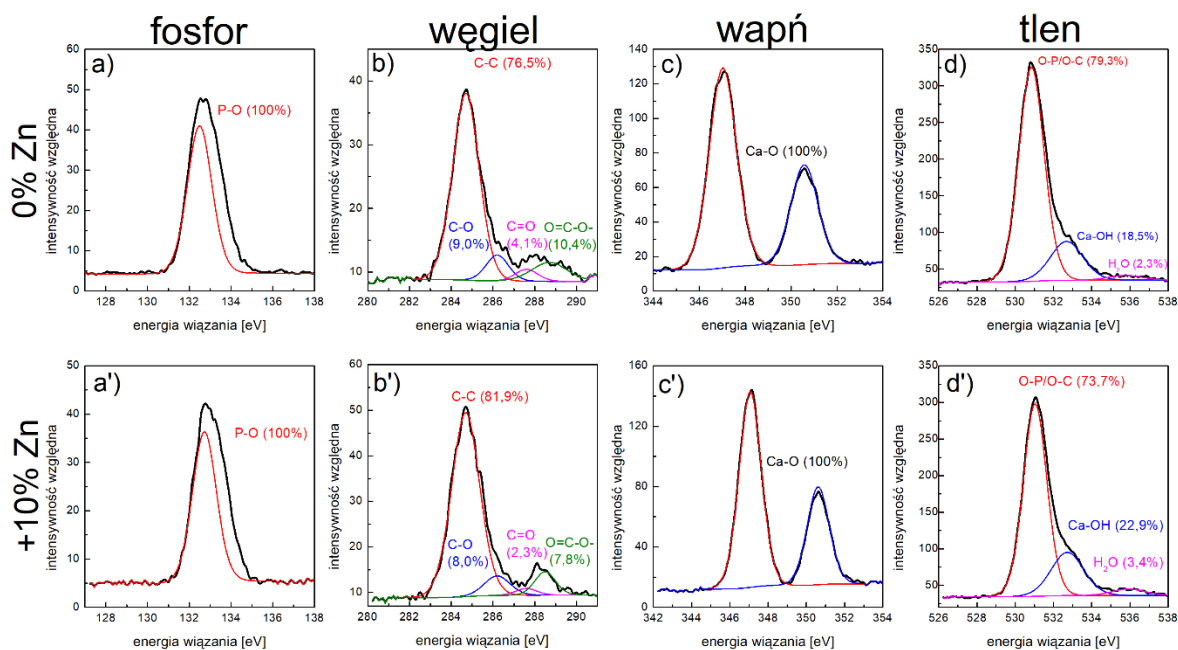
Rys. 5.31. Procentowa zawartość cynku w badanych materiałach obliczona na podstawie wyników ICP-OES.

Wykonano również analizę XPS materiału bez dodatku cynku oraz materiału zawierającego 10% Zn (rys. 5.32). W widmach XPS obu proszków zauważono pozycje pików przy energiach wiązania (BEs) charakterystycznych dla takich pierwiastków jak O, Ca, Na, P, C. Ponadto, w próbce domieszkowanej 10% molowym Zn obecny był pik wskazujący na istnienie wiązania Zn-O potwierdzający efektywne wbudowanie Zn w strukturę HA. Wszystkie wartości energii wiązań są zgodne z danymi literaturowymi. Sygnały pochodzące od P 2p, C 1s, Ca 2p i O 1s zostały przeanalizowane z w wysokiej rozdzielczości w celu określenia charakteru występujących wiązań (rys. 5.33). Można stwierdzić, że dla obu badanych próbek fosfor na powierzchni materiału jest całkowicie przyłączony do atomów tlenu, co znajduje również potwierdzenie w widmie O 1s przy 531,0eV (Negriła *et al.*, 2018). Wiązanie to pochodzi od grup fosforanowych. Piki w zakresie od 282-290eV, jak również 526-538eV mają charakter złożony. Pierwsze z nich można uznać za wynik nałożenia się 4 pików C 1s: dla maksimów przy 284,7; 286,2; 287,6 i 288,5 eV odpowiadających odpowiednio grupom C-C, C-O, C=O i O=C-O- (Battistoni *et al.*, 2000; Negriła *et al.*, 2018; Ofudje *et al.*, 2019), co świadczy o obecności grup

węglanowych na powierzchni materiałów. Natomiast wiązanie C-C wskazuje na zanieczyszczenia organiczne będące najprawdopodobniej pozostałością błon pergaminowych skorupki jaj. Drugi sygnał kompleksowy pochodzi od O 1s i łączy 3 składowe przy maksimach dla 531,0; 532,7 i 535,9eV odpowiadające odpowiednio O-P/O-C, Ca-O i H₂O (Battistoni *et al.*, 2000; Negrila *et al.*, 2018). Potwierdza to obecność zarówno grup fosforanowych, węglanowych, wiązań pomiędzy tlenem i wapniem w strukturze fosforanu wapnia, jak również wiązań hydroksylowych na powierzchni materiału, co jest silnie związane ze strukturą fosforanu wapnia. Wskazuje to bezpośrednio na otrzymanie HA i innych form fosforanów wapnia, potwierdzając wyniki analizy XRD. Jednoskładnikowy sygnał od Zn 2p może wskazywać na podstawienie kationów wapnia w strukturze. Sygnał pochodzący od Ca 2p występuje w postaci dubletu przy maksimach 346,8 i 350,4eV przypisanych Ca 2p_{3/2} i Ca 2p_{1/2}. Oba sygnały pochodzą od wiązania Ca-O.



Rys. 5.32. Przeglądowe widma XPS otrzymane dla materiału niedomieszkowanego cynkiem oraz domieszkowanego 10 molowymi % cynku (10%Zn).



Rys. 5.33. Szczegółowe widma XPS: P (a i a'), C (b i b'), Ca (c i c') i O (d i d') otrzymane dla materiału bez cynku oraz domieszkowanego cynkiem (10%Zn).

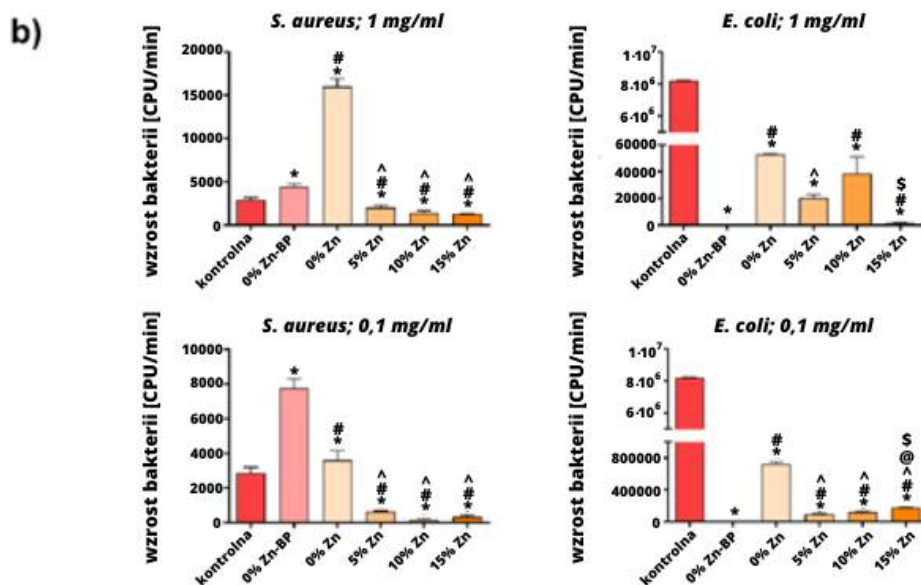
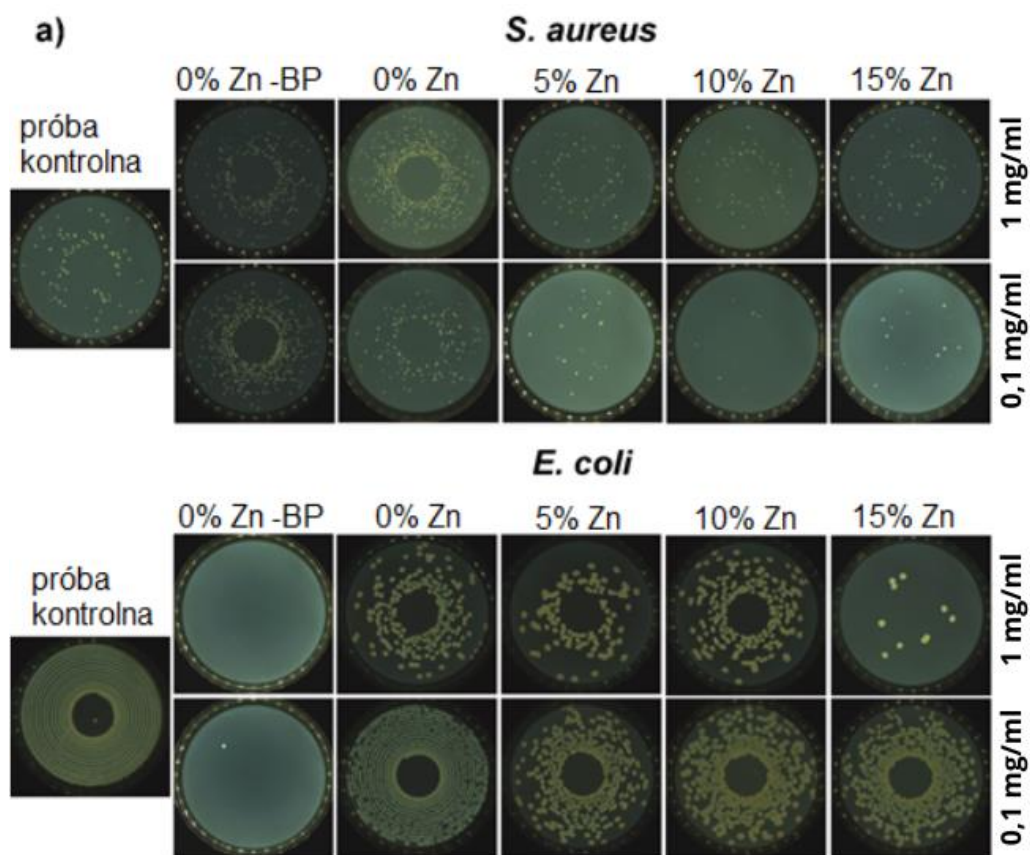
Powyższe wyniki pokazują, że za pomocą zaproponowanej procedury syntezy fosforanów wapnia domieszkowanych cynkiem z wykorzystaniem skorupki kurzych jako prekursora jonów wapnia, otrzymano mono- i dwufazowe materiały, składającymi się z hydroksyapatytu i bruszytu, z wbudowanymi jonami cynku w strukturę HA. Zawartość bruszytu zależy od ilości cynku i wzrasta od 0% dla zawartości Zn wynoszącej 5% do 15% dla próbek zawierających 20% Zn.

Z uwagi na udowodnione w literaturze (Thian *et al.*, 2013; Bhattacharjee *et al.*, 2019; Fadeeva *et al.*, 2021; Nenen *et al.*, 2022) antybakteryjne właściwości cynku oraz biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie biomedyczne otrzymanych materiałów poddano je dalszej analizie pod kątem właściwości antybakteryjnych i cytotoksyczności. Dla porównania przeprowadzono również ocenę aktywności przeciwbakteryjnej materiałów otrzymanych przy wykorzystaniu skorupki jaj kurzych z błoną (0% Zn) i bez błony pergaminowej (oznaczone dalej jako 0% Zn-BP).

Badania zostały przeprowadzone wobec dwóch szczepów bakteryjnych powodujących najczęściej infekcje u ludzi *E. coli* (Gram ujemny) i *S. aureus* (Gram dodatni) (Casillas-Santana *et al.*, 2023; Predoi *et al.*, 2023; Weiss *et al.*, 2023). W bezpośrednim kontakcie z badanymi proszkami bakterie użyte w badaniach reagowały w różny sposób, w zależności od poszczególnych próbek (rys. 5.34). W porównaniu z próbką kontrolą żywotność bakterii *S. aureus* była stymulowana przez kontakt z próbką niedomieszkowaną Zn o stężeniu 1 mg/ml 0% Zn (rys. 5.34). Zjawisko to może być związane z obfitym uwalnianiem jonów wapniowych i fosforanowych z dwu- i wielofazowych fosforanów

wapnia oraz z pozostałościami związków organicznych w materiale. Wiadomo, że jony wapniowe i fosforanowe są niezbędne do metabolizmu i wzrostu żywych komórek, w tym bakterii. Hipotezę tę zdaje się potwierdzać efekt działania materiału otrzymanego ze skorupki nie zawierających błony pergaminowej (0% Zn–BP), który stymulował żywotność bakterii *S. aureus* w mniejszym stopniu (3,6-krotnie). Brak aktywności antybakteryjnej HA wobec *S. aureus* został opisany w literaturze również przez inne grupy badawcze (Thian *et al.*, 2013). Hidalgo-Robatto i współ. (Hidalgo-Robatto *et al.*, 2018) wykazali również stymulację wzrostu bakterii *E. coli* i *S. aureus* w kontakcie z hydroksyapatytem. Wszystkie materiały zawierające Zn zmniejszały liczbę żywych bakterii, zarówno w porównaniu z materiałem niedomieszkowanym jonami cynku (0% Zn), jak i z próbą kontrolą. W niższym stężeniu (0,1 mg/ml) wszystkie proszki zawierające Zn również wykazywały znaczące działanie bakteriobójcze, natomiast próbka referencyjna (0% Zn) również wywierała efekt stymulujący wzrost bakterii. Wśród proszków z domieszką Zn, 10% Zn i 15% Zn były bardziej skuteczne jako środki antybakteryjne niż proszek zawierający 5% Zn.

Porównując wyniki otrzymane dla zawieszin proszków o stężeniu 1 mg/ml żywotność bakterii *E. coli* zmniejszyła się w obecności materiału niedomieszkowanego cynkiem (0% Zn) w porównaniu z kontrolą (rys. 5.34). Obecność cynku (5-15%) wzmocniła działanie antybakteryjne proszków, przy czym efekt ten był najbardziej znaczący dla próbki 15% Zn. W przypadku proszków w stężeniach 0,1 mg/ml efekt obniżenia żywotności bakterii *E. coli* był mniej wyraźny w przypadku wszystkich próbek, chociaż produkty zawierające Zn były bardziej skuteczne niż te nie domieszkowane cynkiem. Również w przypadku tego szczepu bakterii inkubacja z materiałem otrzymanym ze skorupki jaj bez błony pergaminowej (0% Zn–BP) spowodowała obniżenie żywotności komórek. Redukcja ta była bardzo skuteczna, powodując całkowitą redukcję żywotnych komórek *E. coli* stosując stężenie proszku 1 mg/ml i prawie całkowitą przy stężeniu 0,1 mg/ml. W wielu publikacjach wykazano, że hydroksyapatyt jest nietoksyczny dla bakterii (Thian *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2017; Hidalgo-Robatto *et al.*, 2018), jak również sugerowano aktywność przeciwbakteryjną nanohydroksyapatytu otrzymywanego z odczynników chemicznych metodą mokrego strącania lub metodą wspomaganą mikrofalami (2014; Lamkhao *et al.*, 2019), jak i pochodzącego ze źródeł naturalnych (Jahangir *et al.*, 2021). Wyniki otrzymane w prezentowanych badaniach potwierdzają zatem wcześniejsze doniesienia, w odniesieniu do szczepu *E. coli*.



Rys. 5.34. Wyniki wzrostu bakterii w bezpośrednim kontakcie z badanymi proszkami przedstawione jako **(a)** obrazy płytek oraz **(b)** wykresy. (*) symbol oznacza statystycznie istotne różnice pomiędzy kontrolą wzrostu (CTRL) a pozostałymi próbkami, (#) symbol oznacza statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 0% Zn-BP a pozostałymi próbkami, (^) symbol oznacza statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 0% Zn a pozostałymi próbkami, (@) symbol wskazuje na statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 5% Zn a pozostałymi próbkami, (\$) symbol wskazuje na statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 10% Zn a pozostałymi próbkami, według testu ANOVA ($p < 0.05$).

Ocena cytotoksyczności otrzymanych proszków wykazała, że badane produkty znacząco obniżyły żywotność preosteoblastów MC3T3-E1 w porównaniu z podłożem kontrolnym (tabela 5.3). Warto zauważyć, że zgodnie z normą ISO 10993-5 obniżenie żywotności komórek poniżej 70% spowodowane przez 100% ekstrakt biomateriału należy uznać za efekt cytotoksyczny.

Tabela 5.3. Ocena cytotoksyczności 24-godzinnych próbek ekstraktów wobec mysich preosteoblastów (MC3T3-E1 Subclone 4) za pomocą testu MTT i ocena stężenia jonów Ca^{2+} i HPO_4^{2-} w ekstraktach (kontrola PS - medium hodowlane inkubowane w polistyrenie bez próbek).

	Kontrola PS	0%Zn (-BP)	0% Zn	5% Zn	10% Zn	15% Zn
Przeżywalność [% kontroli PS]	100± 7,0	35,5± 3,9*	6,4± 1,9*,#	47,6± 8,2*,#,^	32,7± 7,7*,#,^,@	7,3± 2,1*,#,@,\$
Stężenie Ca^{2+} ekstrakcie [µg/mL]	68,5± 4,8	57,0± 3,9	33,7± 5,3*,#	52,0± 1,2*^	58,9± 1,7^	55,6± 8,1^
Stężenie HPO_4^{2-} w ekstrakcie [µg/mL]	43,1± 2,8	145,1± 1,1*	179,2± 4,2*,#	166,8± 2,6*,#,^	163,2± 4,6*,#,^	170,7± 0,6*,#,^

(*) symbol oznacza statystycznie istotne różnice pomiędzy kontrolą PS a pozostałymi próbkami, (#) symbol oznacza statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 0% Zn-BP a pozostałymi próbkami, (^) symbol oznacza statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 0% Zn a pozostałymi próbkami, (@) symbol wskazuje na statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 5% Zn a pozostałymi próbkami, (\$) symbol wskazuje na statystycznie istotne wyniki pomiędzy próbką 10% Zn a pozostałymi próbkami, według testu ANOVA ($p < 0.05$).

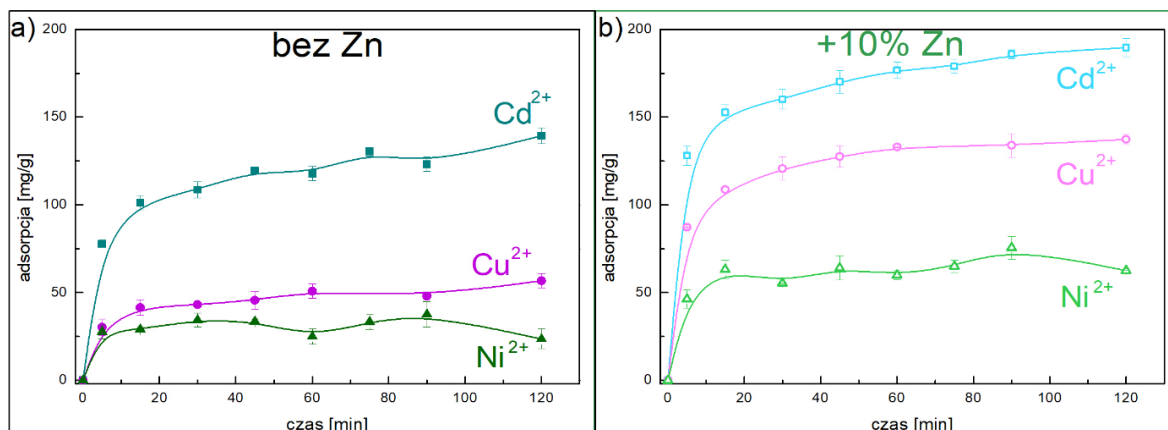
Co ciekawe, ekstrakt materiału oznaczonego jako 0% Zn wykazywał najwyższy efekt toksyczny. Z kolei ekstrakt o zawartości 5% Zn obniżył żywotność komórek do 47% w porównaniu z próbą kontrolną. Można więc wnioskować, że cytotoksyczność wytworzonych proszków nie była spowodowana jedynie znaczącą zawartością cynku. Ponadto wiadomo, że ceramika składająca się z fosforanów wapnia może wykazywać wysoką reaktywność jonową, co powoduje zmianę stężenia jonów w otaczającym ją mikro środowisku i tym samym wywiera efekt cytotoksyczny. Dlatego też oceniono stężenie jonów Ca^{2+} i HPO_4^{2-} w ekstraktach (tabela 5.3). Proszek 0% Zn wykazywał najwyższy pobór jonów Ca^{2+} w porównaniu do pozostałych próbek. Z kolei wszystkie próbki uwalniały duże ilości jonów wodorofosforanowych do podłoża hodowlanego. Obserwowana wysoka reaktywność jonowa badanych materiałów, która może wynikać z poboru jonów, substytucji jonowych lub ich rozpuszczania, wywiera efekt cytotoksyczny na komórki (Gustavsson *et al.*, 2011; Klimek *et al.*, 2016). Porównanie danych z literaturą wykazało, że kalcynowane skorupki jaj

obniżały żywotność komórek do 5%, a za wysoką toksyczność odpowiedzialny był tlenek wapnia (Jahangir *et al.*, 2021).

Podsumowując, wszystkie materiały z domieszowane cynkiem wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec E. coli i S. aureus, która wzrasta wraz ze wzrostem zawartości Zn. Również materiał niezawierający cynku w strukturze wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec E. coli, natomiast sprzyja wzrostowi S. aureus niezależnie od zastosowanego stężenia. Niemniej jednak, wytworzone materiały znacząco obniżają żywotność komórek in vitro, co prawdopodobnie wynika z ich wysokiej reaktywności jonowej. W przyszłości warto skupić się na modyfikacji opracowanej metody syntezy dwu- i wielofazowych fosforanów wapnia, aby przewyciężyć tę nieoczekiwaną cytotoksyczność, zwiększając szansę na ich biomedyczne zastosowanie.

Otrzymane fosforany wapnia domieszkowane jonami cynku wykazały dobre właściwości antybakteryjne, ale cytotoksyczność na poziomie wymagającym poprawy dla ich zastosowań biomedycznych. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę ich właściwości powierzchniowe, porowatości i dużą powierzchnię właściwą można zakładać możliwość wykorzystania ich jako adsorbentów do usuwania kationów metali ciężkich z wód. Dlatego w ostatnim etapie badań stanowiących niniejszą rozprawę doktorską określono właściwości adsorpcyjne wybranych materiałów, tj. otrzymanego z wykorzystaniem skorupki jaj kurzych z organiczną błoną pergaminową niedomieszkowanego Zn i materiału domieszkowanego 10% molowymi jonów cynku. Do badań zastosowano jony Cu^{2+} , Ni^{2+} i Cd^{2+} , które są najczęściej występującymi zanieczyszczeniami wody. Badano wpływ czasu kontaktu, początkowego stężenia jonów metali oraz pH roztworu na proces adsorpcji, a także efektywność desorpcji zaadsorbowanych cząstek w roztworze buforu octanowego.

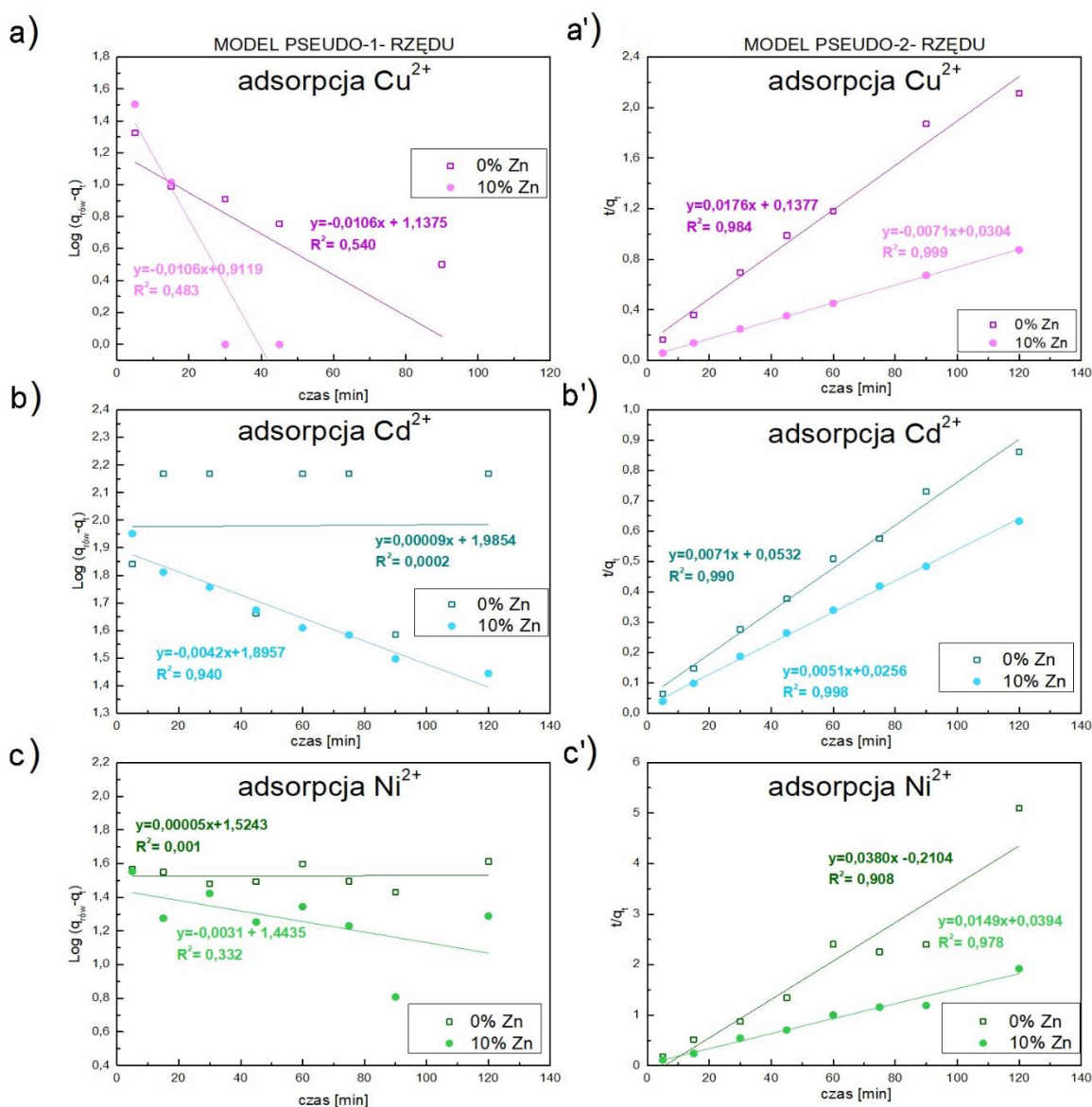
Kinetykę adsorpcji z roztworów wodnych kationów wybranych metali ciężkich przedstawiono na rys. 5.35. Można zauważyć, że proces adsorpcji był szybki dla wszystkich adsorbatów przy zastosowaniu obu badanych adsorbentów (0% Zn i 10% Zn). We wszystkich przypadkach równowaga została osiągnięta po około 30 minutach. Analiza wykresów wskazuje, że efektywność adsorpcji przekroczyła 50% całkowitej wartości adsorpcji w pierwszych 5 minutach eksperymentu. Dla adsorbentu niedomieszkowanego cynkiem molowa pojemność adsorpcyjna wzrasta w szeregu $\text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$ i wynosi odpowiednio 0,5 mM/g, 0,8 mM/g, 1,1 mM/g. Dla adsorbentu z 10% domieszką Zn molowa pojemność adsorpcyjna wzrasta w szeregu $\text{Ni}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$ i wynosi odpowiednio 1 mM/g, 1,6 mM/g, 2,1 mM/g.



Rys. 5.35. Zależność ilości zaadsorbowanych jonów Cd²⁺, Cu²⁺ oraz Ni²⁺ na materiale nie zawierającym cynku (a) oraz otrzymanym z 10%Zn (b).

Widoczna jest różnica w ilości zaadsorbowanych jonów Ni(II), Cu(II) i Cd na adsorbencie bez Zn i z domieszką 10% Zn. Znacznie większa ilość jonów metali jest adsorbowana na powierzchni materiału z domieszkowanym cynkiem. Może to być związane z formami krystalicznymi fosforanu wapnia zastosowanych adsorbentów, tj. HA i β -TCP w produkcie oznaczonym jako 0% Zn oraz HA, HA-Zn i DCPD w próbce 10% Zn. Przekształcanie β -TCP w Zn-HA, spowodowane obecnością cynku podczas syntezy (rys. 5.28 a-e) i związana z tym substytucja jonów Ca²⁺ przez Zn²⁺ powoduje, że tworzenie się hydroksyapatytu jest efektywniejsze i poprzez zwiększenie liczby zarodków krystalizacji powstają kryształy o mniejszych rozmiarach (de Lima *et al.*, 2021). Ma to odzwierciedlenie w większej wartości powierzchni właściwej (tabela 5.2). Dodatkowo materiał domieszkowany Zn charakteryzuje się większą całkowitą objętością porów przy jednoczesnym mniejszym udziale mikroporów (tabela 5.2).

Kinetykę procesów adsorpcyjnych badano według modelu pseudo-pierwszego i pseudo-drugiego (równania 5 i 6) rzędu (rys. 5.36 i tabela 5.4). Zgodnie z wartościami współczynnika R² lepsze dopasowanie uzyskano dla kinetyki pseudo-drugiego rzędu. Potwierdza to chemiczny charakter sorpcji na obu badanych materiałach w odniesieniu do zanieczyszczeń wybranymi metalami ciężkimi.

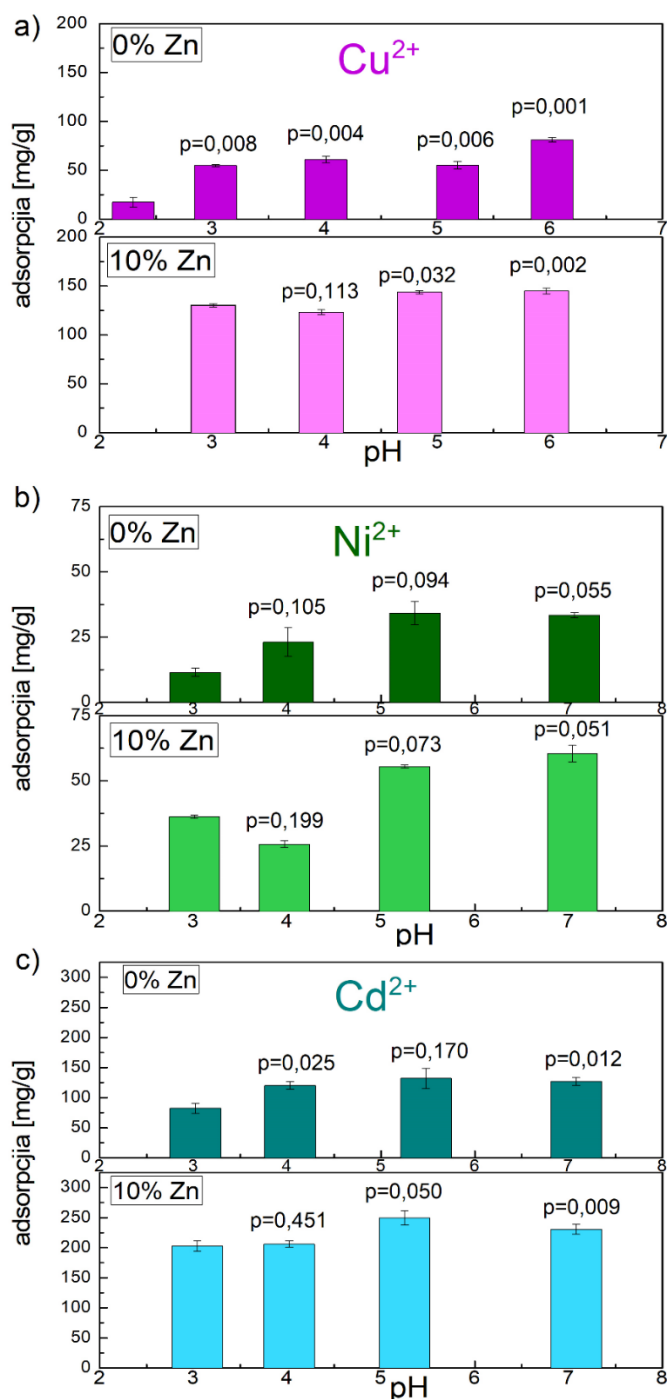


Rys. 5.36. Dopasowanie modeli kinetyki pseudo pierwszego (a-c) i pseudo drugiego rzędu (a'-c') do otrzymanych wyników dla adsorpcji jonów Cu²⁺ (a i a'), Cd²⁺ (b i b') i Ni²⁺ (c i c') na materiale bez cynku i domieszkowanego cynkiem.

Tabela 5.4. Wartości parametrów otrzymanych z dopasowania modeli kinetyki pseudo-pierwszego i pseudo drugiego rzędu dla badanych układów oraz ich porównanie z wartościami otrzymanymi doświadczalnie.

Jon metalu	0% Zn		10% Zn	
	k ₂ (g*mg ⁻¹ *min ⁻¹)	R ²	k ₂ (g*mg ⁻¹ *min ⁻¹)	R ²
Cd ²⁺	0,001	0,990	0,001	0,998
Cu ²⁺	0,002	0,984	0,002	0,999
Ni ²⁺	0,007	0,917	0,006	0,978

Odczyn roztworu jest jednym z parametrów silnie wpływających na proces adsorpcji. Stężenie H^+/OH^- w roztworze decyduje o efektywności procesu w dwojaki sposób: z jednej strony wpływa na postać jonów metali ciężkich, z drugiej zaś na ładunek powierzchniowy oraz dysocjację centrów aktywnych sorpcyjnie. Wpływ pH na ilość adsorbowanych jonów metali ciężkich przedstawiono na rys. 5.37.

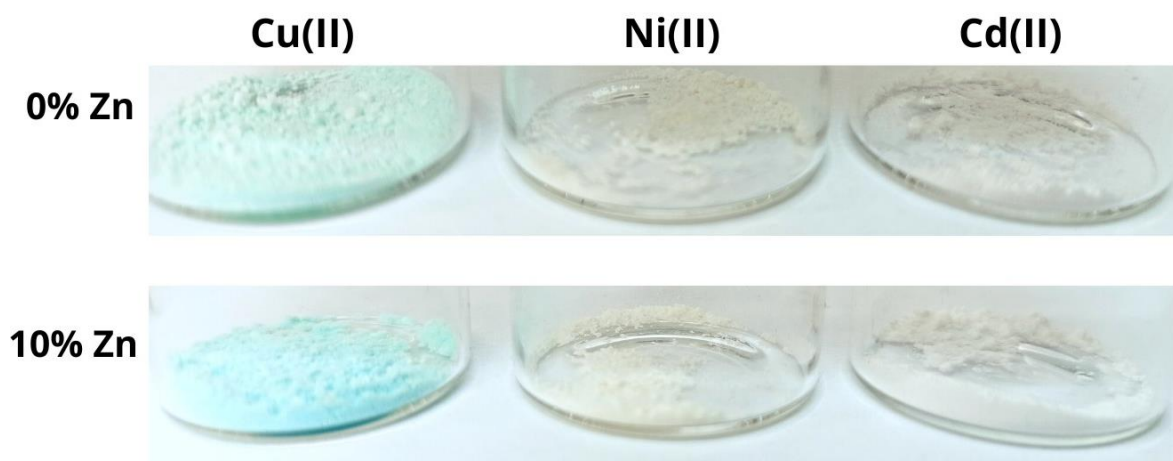


Rys. 5.37. Wpływ pH roztworu na ilość zaadsorbowanych jonów Cu^{2+} (a), Ni^{2+} (b) i Cd^{2+} (c) na obu materiałach bez Zn w strukturze i z 10% Zn.

Można zauważyć, że adsorpcja Cu^{2+} , Ni^{2+} i Cd^{2+} na obu badanych adsorbentach nieznacznie wzrasta wraz ze wzrostem pH. Do walidacji danych zastosowano niesparowany test t-Studenta, a wartości parametru p przedstawiono nad kolumnami wykresu. W przypadku adsorpcji jonów niklu różnice uznano za nieistotne według wartości parametru $p > 0,05$.

Wzrost adsorpcji wraz ze wzrostem pH związany jest z rosnącym ładunkiem ujemnym na powierzchni badanych adsorbentów (rys. 5.16c i d), co zwiększa elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy kationami metali ciężkich a ujemnie naładowanymi grupami funkcyjnymi na powierzchni adsorbentu.

Po adsorpcji jonów miedzi(II), niklu(II) i kadmu osad przefiltrowano i wysuszono (rys. 5.38). Jak widać adsorbenty zmieniły barwę na białoniebieską i zielonkawą, jednak barwy te są bardziej intensywne dla adsorbentu domieszkowanego jonami Zn.

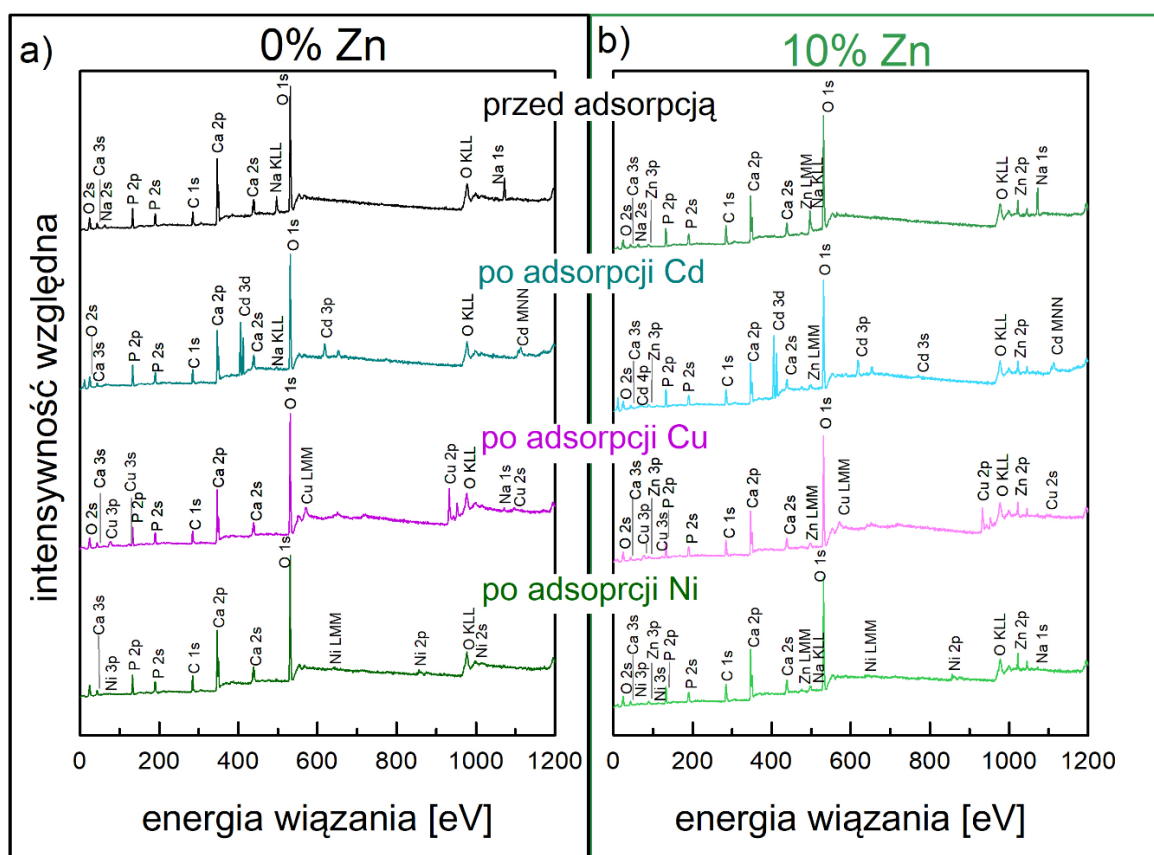


Rys. 5.38. Zdjęcia przefiltrowanych i osuszonych adsorbentów po adsorpcji jonów Cu^{2+} , Ni^{2+} i Cd^{2+} .

Widma XPS obu badanych materiałów przed i po adsorpcji poszczególnych jonów metali ciężkich przedstawiono na rys. 5.39. Analiza położenia pików pozwala na wyróżnienie sygnałów pochodzących od następujących pierwiastków: O, Ca, P, C wskazując na ich obecność na powierzchniach wszystkich analizowanych próbek. Szczegółowe widma w rejonie energii wiązania od 1019-1026 eV charakterystyczne dla Zn 2p, potwierdzają obecność wiązania Zn-O w próbce domieszkowanej Zn (Negrila *et al.*, 2018). Po procesach adsorpcji w widmach otrzymanych dla obu adsorbentów (niedomieszkowanym i domieszkowanym Zn) pojawiły się dodatkowe sygnały wskazujące na chemiczny charakter oddziaływań jonów metali ciężkich z powierzchniami adsorbentów. Sygnał Cd 3d składa się z dwóch pików: przy 405,5 i 412,3eV pochodzących od Cd 3d_{5/2} i Cd 3d_{3/2} charakterystycznych dla Cd(OH)₂. Sygnał Cu 2p jest złożony z nakładających się

pików przy energii wiązań: 932,9; 934,7; 940,2; 941,5 i 943,6eV, jednakże wszystkie te sygnały są charakterystyczne dla wiązań $\text{Cu}(\text{OH})_2$. W zakresie energii wiązania od 853 do 867eV po adsorpcji niklu na obu badanych materiałach wykryto pięć interferujących pików stanowiących sygnał Ni 2p. Ponieważ wszystkie jony metali ciężkich okazały się wiązać z tlenem, może to wskazywać na chemiczny charakter procesu adsorpcji. Ayodele i współp. (Ayodele *et al.*, 2021) porównując eksperymentalne i teoretyczne badania adsorpcji miedzi i niklu na hydroksyapatycie pochodzącym ze skorupki jaj stwierdzili, że $\text{Ca}(\text{II})$ jest preferowanym miejscem adsorpcji dla tych dwóch jonów metali, a grupa OH^- pełniła funkcję grupy pomostowej pomiędzy jonami a miejscami adsorpcji.

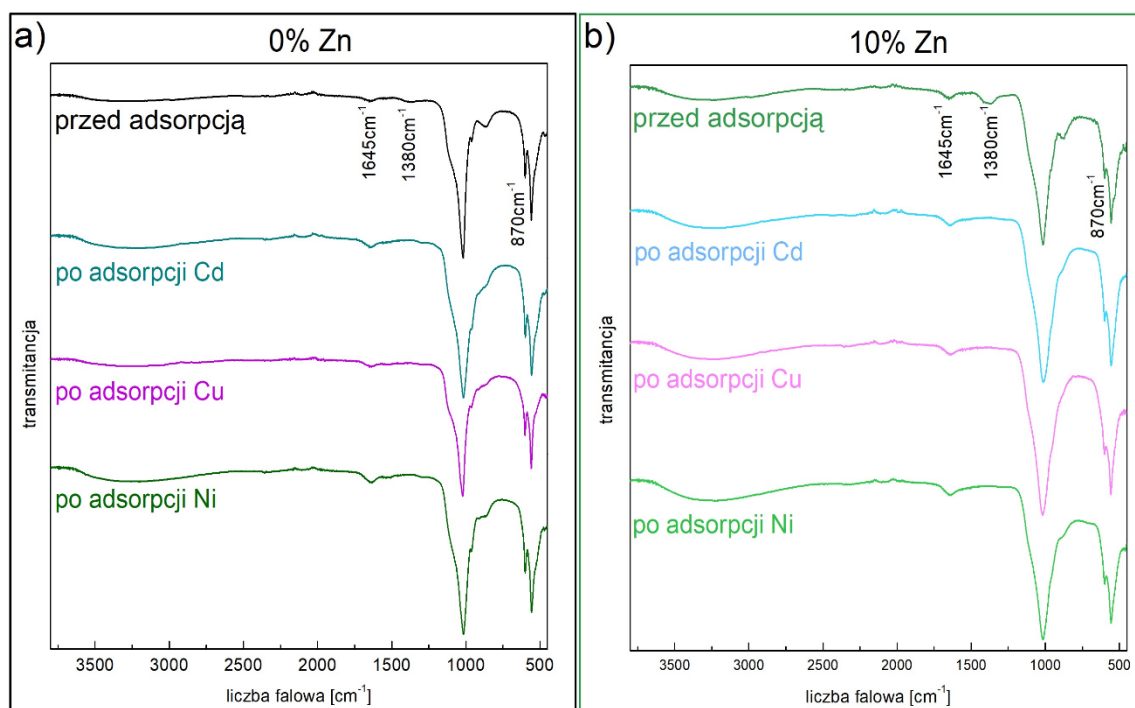
Ponadto, dla materiału z domieszką Zn po adsorpcji nadal obecny był sygnał Zn pochodzący od Zn-O.



Rys. 5.39. Widma XPS materiału bez domieszki Zn (a) oraz z 10% Zn (b) przed i po procesie adsorpcji jonów Cd^{2+} , Cu^{2+} i Ni^{2+} .

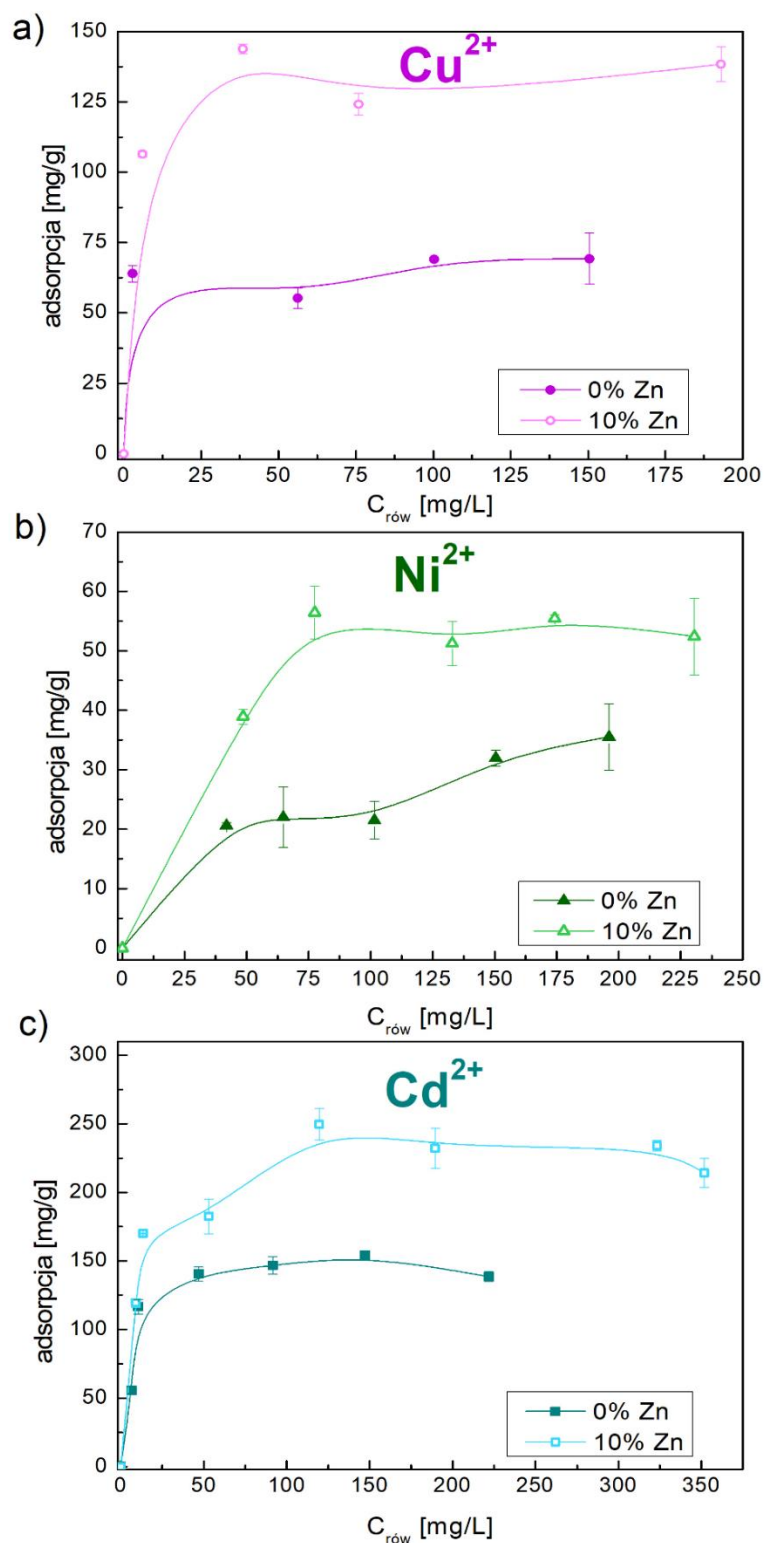
Widma FTIR obu materiałów po adsorpcji jonów metali ciężkich przedstawiono na rys. 5.40. Dla porównania zamieszczone zostały również widma materiałów przed adsorpcją. Pozycje pasm w zakresie długości fal od 1200 do 450 cm^{-1} to sygnały charakterystyczne dla drgania grupy fosforanowej. Ponadto sygnały umieszczone przy 1645 (typ A), 1380 (typ B) i 870 cm^{-1} (typ A i B) odpowiadają grupie węglanowej zastępującej

grupy fosforanowe (apatyt typu B) lub hydroksylowe (apatyt typu A) w strukturze fosforanu wapnia (Rehman i Bonfield, 1997; Berzina-Cimdina i Borodajenko, 2012). Widmo adsorbentu bez domieszki Zn przed, jak i po adsorpcji jonów metali ciężkich zawiera dodatkowe pasmo zlokalizowane przy 962 cm^{-1} pochodzący od fazy β -TCP. Po procesie adsorpcji na obu badanych adsorbentach intensywność pików charakterystycznych dla grup CO_3^{2-} przy 870 cm^{-1} znacznie maleje, natomiast pasmo przy 1380 cm^{-1} zanika. Prowadzi to do wniosku, że zaadsorbowane jony metali hamują substytucję typu B. Szerokie pasmo obecne na każdym z badanych widm próbek, zarejestrowane w zakresie $3600\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ pochodzi od zaadsorbowanej wody.



Rys. 5.40. Widma FTIR materiału bez domieszek Zn (a) oraz z 10% Zn (b) przed i po procesie adsorpcji jonów Cd^{2+} , Cu^{2+} i Ni^{2+} .

Otrzymane izotermy adsorpcji przedstawiono na rys. 5.41. Porównanie przebiegu izoterm wskazuje na podobieństwo mechanizmów procesu adsorpcji dla jonów $\text{Cd}(\text{II})$ i $\text{Cu}(\text{II})$. Już dla niskich stężeń adsorpcja tych metali wykazuje wysoką efektywność przy zadowalających pojemnościach sorpcyjnych. Kształt izoterm uzyskanych dla $\text{Ni}(\text{II})$ na obu materiałach jest zróżnicowany, z łagodniejszym nachyleniem dla niższych stężeń. Wszystkie wyniki świadczą o większej adsorpcji na materiale z domieszką Zn. Ponadto, w tym przypadku adsorbentu domieszkowanego cynkiem, równowaga adsorpcyjna osiągnięta jest przy niższych stężeniach równowagowych niż w przypadku materiałów bez cynku.



Rys. 5.41. Izotermy adsorpcji jonów Cu²⁺ (a), Ni²⁺ (b) i Cd²⁺ (c) na obu badanych materiałach.

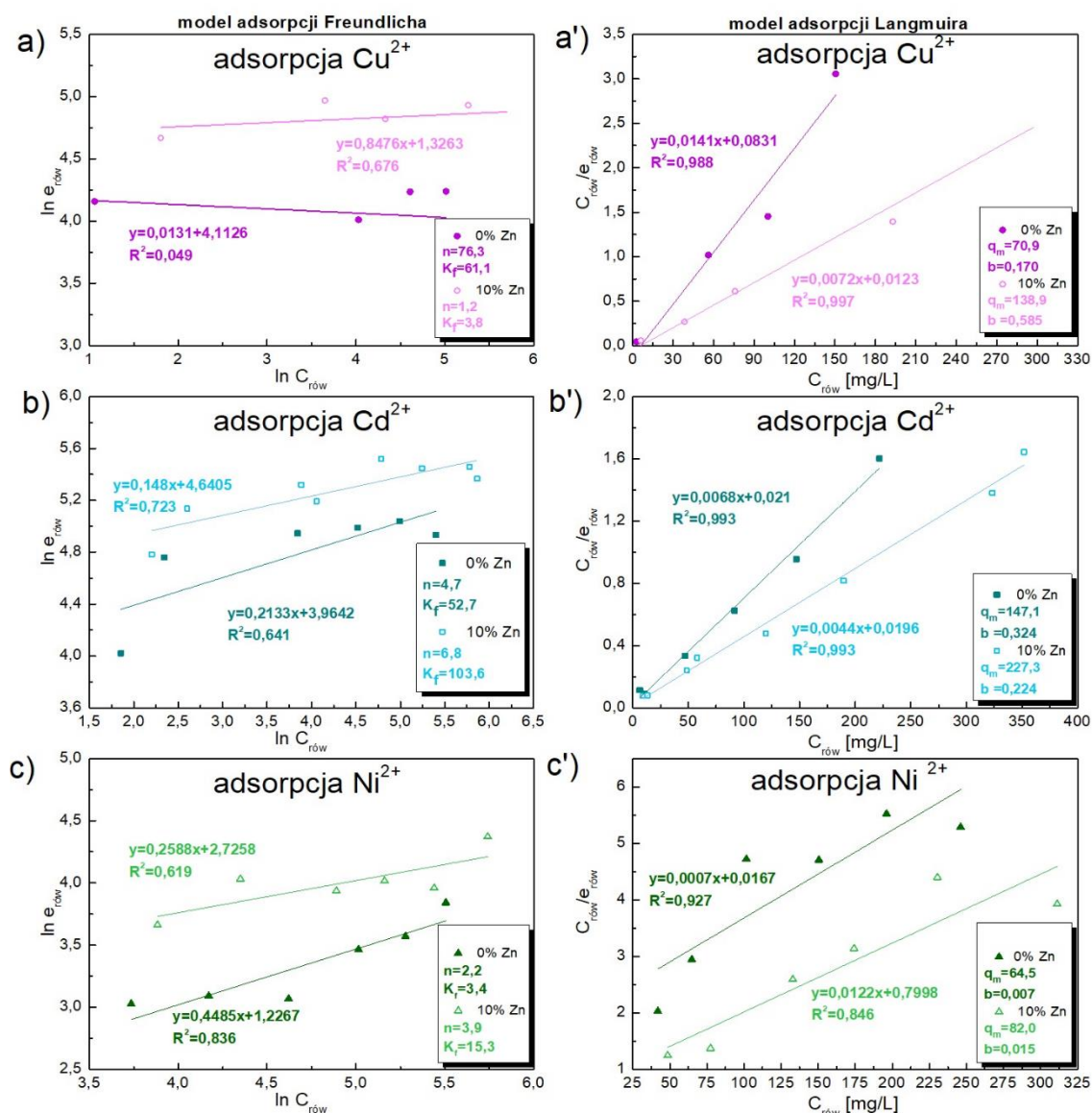
Mechanizmy adsorpcji analizowano w oparciu o dwa modele: Langmuira i Freundlicha (rys. 5.42). Równanie Langmuira zawiera dwa parametry tj. całkowite pokrycie monowarstwy q_m oraz stałą Langmuira o wartości K_L i odpowiada chemisorpcji, w której cząsteczki tworzą monowarstwę na powierzchni adsorbentu aż do jej nasycenia.

Natomiast założenia modelu Freundlicha związane są z fizysozorcją, występującą w układach heterogenicznych, podczas której na powierzchni adsorbentu tworzona jest wielocząsteczkowa warstwa adsorpcyjna i wprowadza on współczynnik heterogeniczności n oraz stałą Freundlicha K_F odpisującą pojemnością adsorpcyjną (Lima, Adebayo i Machado, 2015). Obliczone wartości stałych dla obu modeli przedstawione zostały w tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Parametry otrzymane w wyniku dopasowania modeli Langmuira i Freundlicha dla badanych układów.

	Adsorbowany jon metalu	0% Zn			+10% Zn		
		q_m [mg/g]	b [L/mg]	R^2	q_m [mg/g]	b [L/mg]	R^2
Langmuir	Cd ²⁺	147,1	0,324	0,993	227,3	0,224	0,993
	Cu ²⁺	70,9	0,170	0,988	138,9	0,585	0,997
	Ni ²⁺	64,5	0,007	0,927	82,0	0,015	0,846
Freundlich		n	K_F	R^2	n	K_F	R^2
	Cd ²⁺	4,7	52,7	0,641	6,8	103,6	0,723
	Cu ²⁺	76,3	61,1	0,049	1,2	3,8	0,676
	Ni ²⁺	2,2	3,4	0,836	3,9	15,3	0,619

Wykazano, że lepsze dopasowanie dla obu materiałów uzyskano dla modelu Langmuira, dla którego współczynniki korelacji prezentują wartości powyżej 0,9 dla wszystkich badanych układów z wyjątkiem adsorpcji Ni(II) na adsorbencie z domieszką Zn. Może to wskazywać na chemiczny charakter procesu adsorpcji. Dla adsorbentu niedomieszkowanego cynkiem molowa pojemność adsorpcyjna wzrasta w szeregu Ni²⁺ = Cu²⁺ < Cd²⁺ i wynosi odpowiednio 1,1 mM/g, 1,1 mM/g i 1,3 mM/g. Dla adsorbentu z domieszką 10% Zn pojemność adsorpcyjna wzrasta w szeregu Ni²⁺ < Cu²⁺ < Cd²⁺ i wynosi kolejno 1,4 mM/g, 2,2 mM/g, 2,6 mM/g.

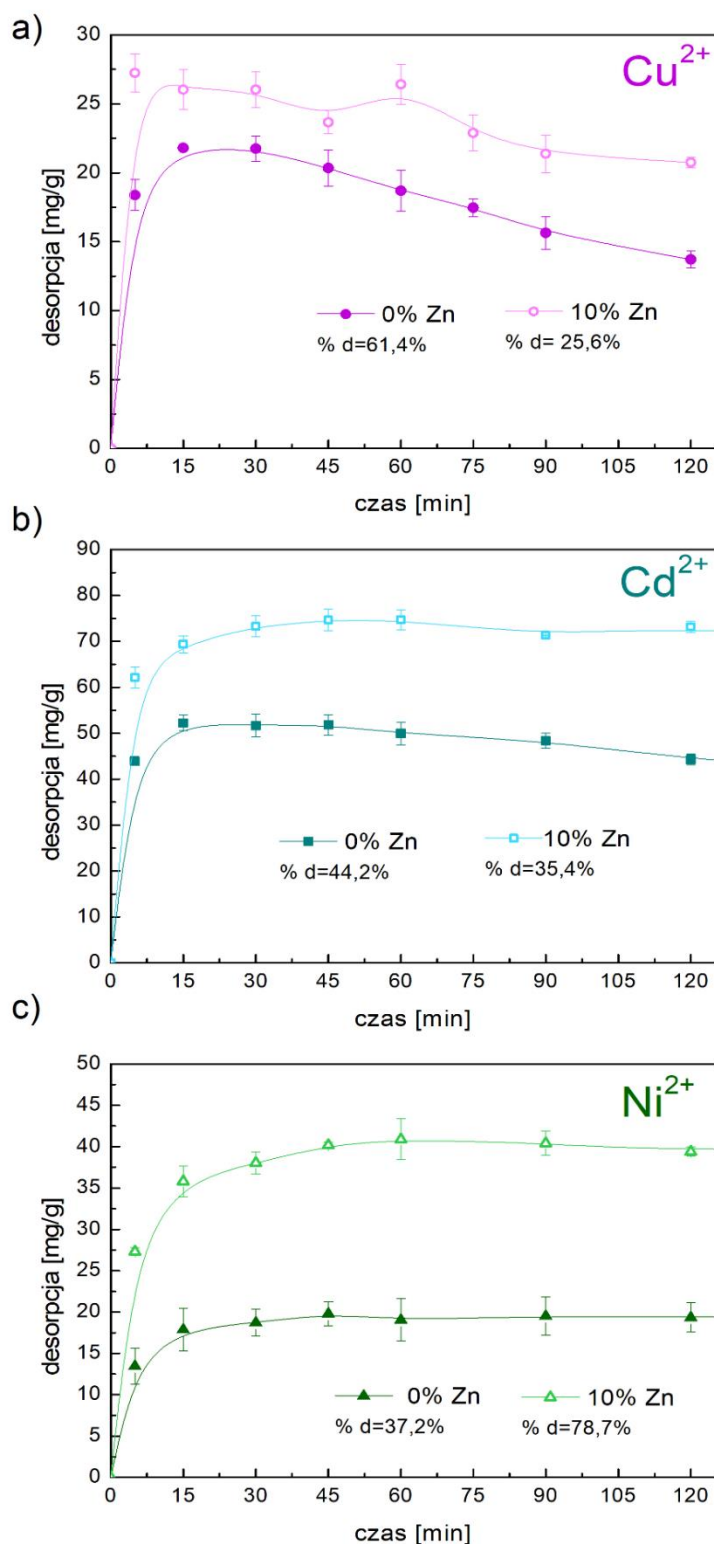


Rys. 5.42. Dopasowanie modeli do otrzymanych izoterm adsorpcji jonów Cu²⁺ (a i a'), Cd²⁺ (b i b') i Ni²⁺ (c i c') na materiale bez cynku (a-c) i z cynkiem (a'-c').

Wyniki otrzymane w efekcie badań procesu desorpcji Ci(II), Cd(II) i Ni(II) przedstawiono jako zależność ilości zdesorbowanych jonów metali ciężkich od czasu w buforze octanowym o pH=5,6 (rys. 5.43). Dla wszystkich badanych układów krzywa desorpcji osiąga maksimum po około 15 minutach. Jedynie w przypadku desorpcji Ni z adsorbentu z domieszką 10% Zn proces ten trwa nieco dłużej. W układzie z zaadsorbowanymi jonami miedzi zdesorbowana ilość miedzi po osiągnięciu maksimum maleje wraz ze wzrostem czasu kontaktu.

Należy zauważyć, że dla wszystkich układów proces desorpcji jest szybki i ponad 50% zaadsorbowanych jonów zostało uwolnionych po 5 minutach kontaktu z roztworem

buforowym. Dla materiału z domieszką Zn efektywność procesu desorpcji wynosi 25,6%, 35,4% i 78,7% odpowiednio dla miedzi(II), niklu(II) i kadmu.



Rys. 5.43. Zależność ilości zdesorbowanych jonów Cu²⁺ (a), Cd²⁺ (b) i Ni²⁺ (c) od czasu na obu badanych adsorbentach.

Desorpcja miedzi(II) i kadmu z adsorbentu bez domieszki Zn jest bardziej efektywna, natomiast w przypadku jonów niklu(II) większą efektywność uzyskuje się dla adsorbentu

z domieszką Zn. Wskazuje to na silniejsze wiązanie jonów niklu(II) do powierzchni adsorbentu otrzymanego ze skorupki jaj i domieszkowanego 10% Zn. Ponadto, wyniki te są zgodne z wyznaczoną pojemnością adsorpcyjną, która była mniejsza dla jonów Cu^{2+} i Cd^{2+} na adsorbencie bez domieszki Zn, a większa dla jonów Ni^{2+} na materiale z domieszką Zn. Pomiary adsorpcji wykonano w środowisku lekko kwaśnym mając na uwadze możliwość potencjalnego wykorzystania adsorbentów z jonami np. Cu^{2+} w rolnictwie, jako źródło nie tylko jonów wapnia i fosforu, ale również makroelementu w postaci jonów miedzi.

Otrzymane materiały wykazują dobre właściwości adsorpcyjne względem kationów metali ciężkich i mogą być stosowane do ich usuwania ze ścieków. Lepsze dopasowanie danych doświadczalnych do modelu adsorpcji Langmuira oraz kinetyki adsorpcji pseudo-drugiego rzędu wskazuje na chemiczny charakter procesu adsorpcji.

6. WNIOSKI

Celem przedstawionych badań było otrzymanie materiałów będących fosforanami wapnia z wykorzystaniem skorupek jaj ptasich jako prekursora jonów wapnia i opracowanie procedury syntezy zgodnej z celami określonymi w Agendzie Zrównoważonego Rozwoju oraz z założeniami „Zielonej Chemii”. Zastosowana procedura wyklucza etap kalcynacji skorupki oraz wykorzystania promieniowania mikrofalowego, jak również wypalania produktu w wysokiej temperaturze, co pozwala na znaczące ograniczenie nakładów energetycznych wymaganych do transformacji bioodpadów rolniczych w postaci skorupki w fosforany wapnia o różnym składzie i właściwościach. Dowiedziono, że na skutek zaproponowanej procedury przy zastosowaniu temperatury suszenia produktu równej 100°C istnieje możliwość otrzymania porowatego, dwufazowego materiału składającego się z hydroksyapatytu (76%) oraz β -TCP (24%) o dużej powierzchni właściwej (66,1 m²/g), mającego wysoki potencjał aplikacyjny jako adsorbent do usuwania zanieczyszczeń metalami ciężkimi w wodach i ściekach.

Zastąpienie etapu starzenia ekspozycją na promieniowanie mikrofalowe spowodowało pojawienie się mniej odpornej termicznie i lepiej rozpuszczalnej fazy bruszytu zamiast β -TCP, którego zawartość malała wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe lub ze zwiększeniem temperatury w piecu w trakcie ekspozycji. Porównując właściwości powierzchniowe materiału otrzymanego bez ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe z tym, otrzymanym działając promieniowaniem przez 15 minut w temperaturze 60°C przy zasadowym pH, można zauważyć, że korzystniejsze parametry z punktu widzenia adsorpcji, tj. większą powierzchnię właściwą oraz całkowity udział porów otrzymano dla materiału bez użycia mikrofal. Dodatkowo warto wspomnieć, iż obniżenie wartości pH mieszaniny reakcyjnej do wartości 6 spowodowało utworzenie materiału wielofazowego o znacznie większej zawartości bruszytu.

Analiza wpływu początkowej wartości pH mieszaniny reakcyjnej wskazuje na silny wpływ odczynu środowiska na skład otrzymanego materiału. Silne zakwaszenie mieszaniny skutkowało otrzymaniem dwufazowego materiału składającego się z DCPD oraz OCP, natomiast wzrost pH powodował zanikanie OCP oraz zmniejszanie zawartości bruszytu, i powstawanie HA i β -TCP. Przy czym przy najwyższej wartości pH=12,4 ponownie wykazano obecność bruszytu. Na skutek kontaktu otrzymanych materiałów z komercyjnie dostępnym roztworem soli fizjologicznej zaobserwowano, że największą tendencję do uwalniania jonów wapnia miały produkty otrzymane w kwaśnym pH, natomiast mniejszy

wzrost stężenia jonów wapnia zaobserwowano dla materiałów otrzymanych z roztworów alkalicznych. Analiza profilu uwalniania jonów wapnia w wyniku kontaktu otrzymanych materiałów z roztworem sztucznej śliny, pokazała, że stężenie jonów Ca^{2+} malało wraz z wydłużeniem czasu kontaktu z roztworem, przy czym można zaobserwować, że najmniejsze stężenia jonów wapnia uzyskano dla próbek otrzymanych w wyniku syntezy przy początkowym $\text{pH} > 7$. Analiza SEM, FTIR oraz XRD wybranych osuszonych próbek, wykazała, że w materiałach otrzymanych w wyniku syntezy przy początkowym pH równych 1,1 oraz 4,4, na skutek kontaktu z roztworem sztucznej śliny nastąpiło przekształcanie bruszytu w bardziej stabilny hydroksyapatyt.

Wykorzystanie skorupki jak różnych gatunków ptaków pokazało, że istnieją znaczne różnice w morfologii otrzymanych produktów mogące wynikać z różnic w składzie pierwiastkowym skorupki. Dodatkowo istotny wpływ na otrzymane struktury miała obecność błon pergaminowych. Materiały otrzymane ze skorupki jaj z błoną pergaminową były dwufazowe, składające się głównie z HA, natomiast drugą fazę stanowiły OCP lub β -TCP. Jedynie w przypadku użycia skorupki przepiórczych z błoną nie można wyróżnić głównej fazy, gdyż zawartość zarówno HA i β -TCP wynosiła ok. 50%. Porównując widma otrzymane dla materiałów otrzymanych ze skorupki z błoną organiczną i bez, wykazano, że usuwanie membrany powodowało powstawanie większej liczby lepiej rozpuszczalnych faz w produkcie, tj. bruszytu i OCP. Wnioskować więc można, że obecność błony pergaminowej sprzyjała tworzeniu się bardziej stabilnych form fosforanów wapnia. Profile uwalniania jonów wapnia w roztworze PBS o $\text{pH}=7,4$ wskazują, iż z materiałów otrzymanych ze skorupki jaj z błoną pergaminową jony wapnia są uwalniane w mniejszym stopniu niż w przypadku materiałów otrzymanych ze skorupki bez błon. Ponadto, zauważyć można także, że w przypadku produktów zawierających bardziej rozpuszczalne formy fosforanów wapnia początkowo stężenie jonów wapnia wzrastało w roztworze, natomiast wraz z upływem czasu zaczynało maleć, co w odniesieniu do poprzednich wyników było najprawdopodobniej spowodowane transformacją rozpuszczalnego bruszytu w bardziej stabilne formy, w których zawartość jonów wapnia w stosunku do fosforu jest większa.

Porównując skład produktów otrzymanych ze skorupki jaj kurzych z błoną pergaminową wykazano, że obniżenie temperatury suszenia końcowego produktu ze 100°C do 50°C powoduje niewielki wzrost zawartości HA w stosunku do β -TCP, tj. z 74% (rozdział 5.1) do 78% (rozdział 5.4).

Częściowe zastąpienie jonów Ca jonami Zn w czasie syntezy, tj. 5, 10, 15 lub 20% molowych spowodowało otrzymanie materiałów składających się głównie z HA lub HA-Zn. Drugą fazę stanowił DCPD (bruszyt), którego zawartość wrosła wraz ze wzrostem

ilości domieszkowanego Zn. W przypadku najmniejszej użytej ilości cynku (5% molowych) otrzymany materiał składał się wyłącznie z HA i HA z wbudowanymi jonami Zn (Zn-HA). Badania porozymetryczne otrzymanych produktów modyfikowanych cynkiem wskazały, że najkorzystniejsze właściwości pod kątem adsorpcyjnym, tzn. powierzchnię właściwą równą $56 \text{ m}^2/\text{g}$ z jednoczesnym dużo niższym udziałem mikroporów, wykazuje materiał domieszkowany 10% molowymi Zn. Obecność Zn w strukturze HA pozwoliła na zwiększenie właściwości antybakteryjnych proszków w stosunku do bakterii szczepu *E. coli* i *S. aureus*. Niestety wszystkie otrzymane produkty wykazywały działanie cytotoksyczne w odniesieniu do mysich preosteoblastów, co może być spowodowane ich rozpuszczalnością. Najmniej cytotoksyczny efekt prezentował materiał otrzymany ze skorupki jaj kurzych bez błony pergaminowej, który, w odniesieniu do składu pozostałych analizowanych materiałów wykazywał najniższą procentową zawartość HA. Potwierdzono również dobrą pojemność sorpcyjną względem jonów miedzi(II), kadmu i cynku zarówno materiału otrzymanego ze skorupki z jaj kurzych z błoną pergaminową, jak również domieszkowanego 10% molowymi cynku, lepszą w przypadku drugiego materiału. Lepsze dopasowanie do modelu Langmuira i kinetyki pseudo-drugiego rzędu wskazuje na chemiczny proces sorpcji.

Pomimo zastosowania stosunku molowego Ca/P równego 0,6 dominującą formą fosforanu wapnia otrzymaną w wyniku przeprowadzonych syntez był hydroksyapatyt, dla którego stosunek Ca/P=1,67. Współistnienie lepiej rozpuszczalnych form, o mniejszym stosunku molowym Ca/P, np. β -TCP, DCPD i OCP może wskazywać, że w pierwszym etapie powstawały właśnie te formy, z których najbliższa stosunkowi 0,6 jest DCPD. Należy jednak zwrócić uwagę, że w wybranym alkalicznym pH syntezy stabilną formą jest hydroksyapatyt. Można więc przypuszczać, że w wyniku procesu starzenia osadu następowało przekształcanie bardziej rozpuszczalnych form fosforanu wapnia w bardziej stabilny w tym środowisku HA. Potwierdzają to wyniki składu materiałów otrzymywanych w różnym pH pokazujące, że wraz ze wzrostem początkowego pH syntezy wzrasta zawartość HA, maleje natomiast zawartość bardziej rozpuszczalnych form. Jedynie w przypadku syntezy z domieszką jonów Zn w ilości 5% molowych otrzymano czysty HA. Można więc wnioskować, że jony te promują otrzymywanie HA lub przyspieszają transformację bardziej rozpuszczalnego DCPD w HA.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- ✓ Zaproponowana procedura jest skuteczną metodą otrzymywania dwu i wielofazowych fosforanów wapnia z wykorzystaniem skorupki jaj ptasich jako źródła wapnia,

pozwalającą jednocześnie na znaczące zredukowanie nakładów energetycznych w trakcie prowadzonej syntezy.

- ✓ Takie parametry jak ekspozycja na promieniowanie mikrofalowe, początkowe pH układu, stosowanie skorupek jaj różnych gatunków ptaków, obecność wewnętrznej membrany pergaminowej, temperatura determinują skład i morfologię otrzymywanych produktów.
- ✓ Wprowadzenie jonów cynku do struktury otrzymywanego produktu ma znaczący wpływ na skład i morfologię próbki. Produkty domieszkowane cynkiem wykazują właściwości przeciwbakteryjne, ale także obniżają żywotność komórek preosteoblastów MC3T3-E1 badaną metodą *in vitro*.
- ✓ Badania pod kątem aplikacyjnym otrzymanych produktów wykazały możliwość ich potencjalnego zastosowania jako składników produktów do higieny jamy ustnej wspomagających remineralizację szkliwa oraz adsorbentów do oczyszczania wód zanieczyszczonych metalami ciężkimi.
- ✓ Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań, przede wszystkim opartych na kolejnych modyfikacjach składu produktów w celu zwiększenia pojemności sorpcyjnej oraz uzyskania satysfakcjonujących wyników analizy cytotoksyczności.

7. LITERATURA

Abbas, J. (2018) 'In vitro antimalarial activity of *Calophyllum bicolor* and hemozoin crystals observed by Transmission Electron Microscope (TEM)', *MATEC Web of Conferences*, 154, p. 04004. DOI: <https://doi.org/10.1051/mateconf/201815404004>.

Abdullah, A. and Mohammed, A. (2019) 'Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review', in: Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX

Adegbenjo, A., Liu, L. and Ngadi, M. (2020) 'Non-Destructive Assessment of Chicken Egg Fertility', *Sensors*, 20, p. 5546. DOI: <https://doi.org/10.3390/s20195546>.

Adeogun, A.I. *et al.* (2018) 'Facile Development of Nano Size Calcium Hydroxyapatite Based Ceramic from Eggshells: Synthesis and Characterization', *Waste and Biomass Valorization*, 9(8), pp. 1469–1473. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9891-3>.

Ahmed, S. and Ahsan, M. (2008) 'Synthesis of Ca-hydroxyapatite Bioceramic from Egg Shell and its Characterization', *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 43(4), pp. 501–512. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjsir.v43i4.2240>.

Ain, Q. *et al.* (2020) 'Antibacterial potential of biomaterial derived nanoparticles for drug delivery application', *Materials Research Express*, 6(12), p. 125426. DOI: <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab715d>.

Akram, M. *et al.* (2014) 'Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources', *Journal of Materials Science*, 49(4), pp. 1461–1475. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7864-x>.

Alobeedallah, H. *et al.* (2011) 'Preparation of Nanostructured Hydroxyapatite in Organic Solvents for Clinical Applications', *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 25(1), pp. 12–19.

Ansari, A. *et al.* (2019) 'Novel Fe₃O₄/hydroxyapatite/ β -cyclodextrin nanocomposite adsorbent: Synthesis and application in heavy metal removal from aqueous solution', *Applied Organometallic Chemistry*, 33(1), p. e4634. DOI: <https://doi.org/10.1002/aoc.4634>.

Apalangya, V. *et al.* (2018) 'Rapid microwave synthesis of needle-like hydroxyapatite nanoparticles via template directing ball-milled spindle-shaped eggshell particles', *Ceramics International*, 44(6), pp. 7165–7171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.01.161>.

Ayodele, O. *et al.* (2021) 'Experimental and theoretical studies of the adsorption of Cu and Ni ions from wastewater by hydroxyapatite derived from eggshells', *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, p. 100439. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100439>.

Azis, Y. *et al.* (2018) 'Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles from egg shells by sol-gel method', *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 345, p. 012040. DOI: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/345/1/012040>.

- Bag, S., Ganguly, K. and Biswas, B.K. (2016) 'Structural Characterization of Nanocrystalline Hydroxyapatite produced from Waste Egg Shell', *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 30(1), pp. 41–45.
- Bagus, P.S., Ilton, E. and Nelin, C.J. (2018) 'Extracting Chemical Information from XPS Spectra: A Perspective', *Catalysis Letters*, 148(7), pp. 1785–1802. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10562-018-2417-1>.
- Barakat, M.A. (2011) 'New trends in removing heavy metals from industrial wastewater', *Arabian Journal of Chemistry*, 4(4), pp. 361–377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.07.019>.
- Basu, S. and Basu, B. (2019) 'Unravelling Doped Biphasic Calcium Phosphate: Synthesis to Application', *ACS Applied Bio Materials*, 2(12), pp. 5263–5297. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00488>.
- Battistoni, C. *et al.* (2000) 'Surface characterization of biocompatible hydroxyapatite coatings†', *Surface and Interface Analysis*, 29(11), pp. 773–781. DOI: [https://doi.org/10.1002/1096-9918\(200011\)29](https://doi.org/10.1002/1096-9918(200011)29).
- Berzina-Cimdina, L. and Borodajenko, N. (2012) 'Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy', *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, pp. 123–148. DOI: <https://doi.org/10.5772/36942>.
- Bhattacharjee, A. *et al.* (2019) 'Site-specific antibacterial efficacy and cyto/hemo-compatibility of zinc substituted hydroxyapatite', *Ceramics International*, 45(9), pp. 12225–12233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.03.132>.
- Binitha, M.P. and Pradyumnan, P.P. (2013) 'Dielectric Property Studies of Biologically Compatible Brushite Single Crystals Used as Bone Graft Substitute', 2013. DOI: <https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.42016>.
- Bouler, J.M. *et al.* (2017) 'Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response', *Acta Biomaterialia*, 53, pp. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.076>.
- Carella, F. *et al.* (2021) 'Thermal conversion of fish bones into fertilizers and biostimulants for plant growth – A low tech valorization process for the development of circular economy in least developed countries', *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), p. 104815. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104815>.
- Carrodegua, R.G. and De Aza, S. (2011) 'α-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications', *Acta Biomaterialia*, 7(10), pp. 3536–3546. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.019>.
- Casillas-Santana, M.A. *et al.* (2023) 'Osteoregeneration of Critical-Size Defects Using Hydroxyapatite–Chitosan and Silver–Chitosan Nanocomposites', *Nanomaterials*, 13(2), p. 321. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano13020321>.
- Chauhan, A. and Bhatt, A.D. (2022) 'A review on design of scaffold for osteoinduction: Toward the unification of independent design variables', *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* [Preprint]. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10237-022-01635-9>.

- Chen, J. *et al.* (2020) 'Regulatory synthesis and characterization of hydroxyapatite nanocrystals by a microwave-assisted hydrothermal method', *Ceramics International*, 46(2), pp. 2185–2193. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.203>.
- Chen, K. *et al.* (2019) 'Biological Response of and Blood Plasma Protein Adsorption on Silver-Doped Hydroxyapatite', *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(2), pp. 561–571. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00996>.
- Choi, D. and Kumta, P.N. (2007) 'Mechano-chemical synthesis and characterization of nanostructured β -TCP powder', *Materials Science and Engineering: C*, 27(3), pp. 377–381. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.035>.
- Daculsi, G. *et al.* (1989) 'Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: Ultrastructural and physicochemical characterization', *Journal of Biomedical Materials Research*, 23(8), pp. 883–894. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.820230806>.
- De Angelis, G. *et al.* (2017) 'Recycling of eggshell waste into low-cost adsorbent for Ni removal from wastewater', *Journal of Cleaner Production*, 164, pp. 1497–1506. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.085>.
- Derkus, B. *et al.* (2016) 'Enhancement of aptamer immobilization using egg shell-derived nano-sized spherical hydroxyapatite for thrombin detection in neuroclinic', *Talanta*, 158, pp. 100–109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.045>.
- Destainville, A. *et al.* (2003) 'Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate', *Materials Chemistry and Physics*, 80(1), pp. 269–277. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00466-2](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00466-2).
- Díaz, M. *et al.* (2009) 'Synthesis and Antimicrobial Activity of a Silver-Hydroxyapatite Nanocomposite', *Journal of Nanomaterials*, 2009, p. e498505. DOI: <https://doi.org/10.1155/2009/498505>.
- Dorozhkin, S.V. (2016) 'Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical applications', *Ceramics International*, 42(6), pp. 6529–6554. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.01.062>.
- Dubnika, A. *et al.* (2017) 'Functionalized silver doped hydroxyapatite scaffolds for controlled simultaneous silver ion and drug delivery', *Ceramics International*, 43(4), pp. 3698–3705. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.11.214>.
- Eliaz, N. and Metoki, N. (2017) 'Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications', *Materials*, 10(4), p. 334. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma10040334>.
- Epp, J. (2016) '4 - X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization', in G. Hübschen *et al.* (eds) *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. Woodhead Publishing, pp. 81–124. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3>.
- Esmailkhanian, A. *et al.* (2019) 'Synthesis and Characterization of Natural Nano-hydroxyapatite Derived from Turkey Femur-Bone Waste', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(3), pp. 919–932. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03046-6>.

- Ewald, A. *et al.* (2011) ‘Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity’, *Acta Biomaterialia*, 7(11), pp. 4064–4070. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.049>.
- Fadeeva, I.V. *et al.* (2021) ‘Improved cytocompatibility and antibacterial properties of zinc-substituted brushite bone cement based on β -tricalcium phosphate’, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 32(9), p. 99. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06575-x>.
- Fazel-Rezai, R. (2011) *Biomedical Engineering: Frontiers and Challenges*. InTech, Croatia
- Feng Chen *et al.* (2012) ‘Nanostructured Calcium Phosphates: Preparation and Their Application in Biomedicine’, *Nano Biomedicine & Engineering*, 4(1), pp. 41–49. DOI: <https://doi.org/10.5101/nbe.v4i1.p41-49>.
- Ferraz, M.P., Monteiro, F.J. and Manuel, C.M. (2004) ‘Hydroxyapatite Nanoparticles: A Review of Preparation Methodologies’, *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 2(2), pp. 74–80. DOI: <https://doi.org/10.1177/228080000400200202>.
- Gallinetti, S., Canal, C. and Ginebra, M.-P. (2014) ‘Development and Characterization of Biphasic Hydroxyapatite/ β -TCP Cements’, *Journal of the American Ceramic Society*, 97(4), pp. 1065–1073. DOI: <https://doi.org/10.1111/jace.12861>.
- Ganesan, V. *et al.* (2019) ‘Eggshell derived mesoporous biphasic calcium phosphate for biomedical applications using rapid thermal processing’, *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 16(5), pp. 1932–1943. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijac.13270>.
- George, S.M. *et al.* (2022) ‘Multifunctional Hydroxyapatite Composites for Orthopedic Applications: A Review’, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(8), pp. 3162–3186. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00140>.
- Gergely, G. *et al.* (2010) ‘Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell’, *Ceramics International*, 36(2), pp. 803–806. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2009.09.020>.
- Ghiasi, B., Sefidbakht, Y. and Rezaei, M. (2019) ‘Hydroxyapatite for Biomedicine and Drug Delivery’, in M. Rahmandoust and M.R. Ayatollahi (eds) *Nanomaterials for Advanced Biological Applications*. Cham: Springer International Publishing (Advanced Structured Materials), pp. 85–120. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-10834-2_4.
- Goloshchapov, D.L. *et al.* (2013) ‘Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen’s eggshell’, *Ceramics International*, 39(4), pp. 4539–4549. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.050>.
- Grdadolnik, J. (2002) ‘ATR-FTIR spectroscopy: Its advantages and limitations’, *Acta Chimica Slovenica*, 49, pp. 631–642.
- Gu, S.-Y. *et al.* (2019) ‘Functionalization of activated carbons with magnetic Iron oxide nanoparticles for removal of copper ions from aqueous solution’, *Journal of Molecular Liquids*, 277, pp. 499–505. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.018>.
- Gustavsson, J. *et al.* (2011) ‘Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media’, *Acta Biomaterialia*, 7(12), pp. 4242–4252. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.016>.

- Gypser, S. and Freese, D. (2020) 'Phosphorus release from vivianite and hydroxyapatite by organic and inorganic compounds', *Pedosphere*, 30(2), pp. 190–200. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60004-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60004-2).
- Habraken, W. *et al.* (2016) 'Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?', *Materials Today*, 19(2), pp. 69–87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>.
- Hamilton, R. (1986) 'The Microstructure of the Hen's Egg Shell - A Short Review', *Food Structure*, 5(1). DOI: <https://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/vol5/iss1/13>.
- Hassan, M.N. *et al.* (2015) 'Microwave rapid conversion of sol–gel-derived hydroxyapatite into β -tricalcium phosphate', *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 76(1), pp. 74–81. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3753-x>.
- Hegazi, H.A. (2013) 'Removal of heavy metals from wastewater using agricultural and industrial wastes as adsorbents', *HBRC Journal*, 9(3), pp. 276–282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hbrcj.2013.08.004>.
- Heidari, F. *et al.* (2015) 'In situ preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application', *Ceramics International*, 41(2, Part B), pp. 3094–3100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.10.153>.
- Hernández-Cocoletzi, H. *et al.* (2020) 'Natural hydroxyapatite from fishbone waste for the rapid adsorption of heavy metals of aqueous effluent', *Environmental Technology & Innovation*, 20, p. 101109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101109>.
- Hidalgo-Robatto, B.M. *et al.* (2018) 'Pulsed laser deposition of copper and zinc doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications', *Surface and Coatings Technology*, 333, pp. 168–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.11.006>.
- Hincke, M.T. *et al.* (2012) 'The eggshell: structure, composition and mineralization', *Frontiers in Bioscience*, 17, pp. 1266–1280. DOI: <https://doi.org/10.2741/3985>.
- Hirsch, A. *et al.* (2014) 'Infrared Absorption Spectrum of Brushite from First Principles', *Chemistry of Materials*, 26(9), pp. 2934–2942. DOI: <https://doi.org/10.1021/cm500650t>.
- Hsu, C.-K. (2003) 'The preparation of biphasic porous calcium phosphate by the mixture of $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and CaCO_3 ', *Materials Chemistry and Physics*, 80(2), pp. 409–420. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00166-9](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00166-9).
- Ibrahim, A.-R. *et al.* (2013) 'Conversion of waste eggshells to mesoporous hydroxyapatite nanoparticles with high surface area', *Materials Letters*, 110, pp. 195–197. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.08.014>.
- Ibrahim, A.-R. *et al.* (2015) 'Synthesis of rod-like hydroxyapatite with high surface area and pore volume from eggshells for effective adsorption of aqueous Pb(II)', *Materials Research Bulletin*, 62, pp. 132–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.11.023>.
- Iqbal, N. *et al.* (2012) 'Rapid microwave assisted synthesis and characterization of nanosized silver-doped hydroxyapatite with antibacterial properties', *Materials Letters*, 89, pp. 118–122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.08.057>.

- Jahangir, M.U. *et al.* (2021) ‘Comparative analysis and antibacterial properties of thermally sintered apatites with varied processing conditions’, *Journal of the American Ceramic Society*, 104(2), pp. 1023–1039. DOI: <https://doi.org/10.1111/jace.17525>.
- Jakus, A.E., Rutz, A.L. and Shah, R.N. (2016) ‘Advancing the field of 3D biomaterial printing’, *Biomedical Materials*, 11(1), p. 014102. DOI: <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/014102>.
- Jeong, J. *et al.* (2019) ‘Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration’, *Biomaterials Research*, 23(1), p. 4. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>.
- Jokanović, V. *et al.* (2006) ‘Hydrothermal synthesis and nanostructure of carbonated calcium hydroxyapatite’, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 17(6), pp. 539–546. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-006-8937-z>.
- Jumasheva, K. *et al.* (2023) ‘Study the Composition and Environmental Impact of Sewage Sludge’, *Journal of Ecological Engineering*, 24(3), pp. 315–322. DOI: <https://doi.org/10.12911/22998993/158544>.
- Kalbarczyk, M. *et al.* (2022) ‘Synthesis and Characterization of Calcium Phosphate Materials Derived from Eggshells from Different Poultry with and without the Eggshell Membrane’, *Materials*, 15(3), p. 934. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15030934>.
- Kalbarczyk, M., Szcześ, A. (2020) ‘Microwave assistant synthesis of calcium phosphate minerals using hen’s eggshells as a calcium source’, *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, Vol. 56, iss. 6. DOI: <https://doi.org/10.37190/ppmp/127930>.
- Kalbarczyk, M., Szcześ, A. (2021) ‘Potential biomedical application of calcium phosphates obtained using eggshells as a biosource of calcium at different initial pH values’, *Ceramics International*, 47(23), pp. 33687–33696. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.08.278>.
- Kalbarczyk, M., Szcześ, A. and Sternik, D. (2021) ‘The preparation of calcium phosphate adsorbent from natural calcium resource and its application for copper ion removal’, *Environmental Science and Pollution Research*, 28(2), pp. 1725–1733. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10585-7>.
- Kalbarczyk M., Szcześ A., Belcarz A., Kazimierczak P. and May Z. (2023) ‘Zn doped mono and biphasic calcium phosphate materials de-rived from agriculture waste and its potential biomedical applications. Part I’ *Material-* Major revision
- Karampas, I.A. and Kontoyannis, C.G. (2013) ‘Characterization of calcium phosphates mixtures’, *Vibrational Spectroscopy*, 64, pp. 126–133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.11.003>.
- Kaygili, O. and Tatar, C. (2012) ‘The investigation of some physical properties and microstructure of Zn-doped hydroxyapatite bioceramics prepared by sol–gel method’, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 61(2), pp. 296–309. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10971-011-2627-0>.
- Khajuria, D.K. *et al.* (2016) ‘Risedronate/zinc-hydroxyapatite based nanomedicine for osteoporosis’, *Materials Science and Engineering: C*, 63, pp. 78–87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.062>.

- Klimek, K. *et al.* (2016) “False” cytotoxicity of ions-adsorbing hydroxyapatite — Corrected method of cytotoxicity evaluation for ceramics of high specific surface area’, *Materials Science and Engineering: C*, 65, pp. 70–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.105>.
- Kolanthai, E. *et al.* (2016) ‘Synthesis of nanosized hydroxyapatite/agarose powders for bone filler and drug delivery application’, *Materials Today Communications*, 8, pp. 31–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2016.03.008>.
- Kolmas, J., Groszyk, E. and Kwiatkowska-Różycka, D. (2014) ‘Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties’, *BioMed Research International*, 2014, p. e178123. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/178123>.
- Kong, L. *et al.* (2016) ‘Polyethyleneimine-stabilized hydroxyapatite nanoparticles modified with hyaluronic acid for targeted drug delivery’, *RSC Advances*, 6(104), pp. 101790–101799. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6RA19351J>.
- Kumar, G.S., Thamizhavel, A. and Girija, E.K. (2012) ‘Microwave conversion of eggshells into flower-like hydroxyapatite nanostructure for biomedical applications’, *Materials Letters*, 76, pp. 198–200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.02.106>.
- Kumar, R. and Mohanty, S. (2022) ‘Hydroxyapatite: A Versatile Bioceramic for Tissue Engineering Application’, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* [Preprint]. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10904-022-02454-2>.
- Kumta, P.N. *et al.* (2005) ‘Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization’, *Acta Biomaterialia*, 1(1), pp. 65–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2004.09.008>.
- Kuśnieruk, S. *et al.* (2016) ‘Influence of hydrothermal synthesis parameters on the properties of hydroxyapatite nanoparticles’, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7(1), pp. 1586–1601. DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.153>.
- Lai, W. *et al.* (2016) ‘Hydrothermal fabrication of porous hollow hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system’, *Materials Science and Engineering: C*, 62, pp. 166–172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.055>.
- Lamkhao, S. *et al.* (2019) ‘Synthesis of Hydroxyapatite with Antibacterial Properties Using a Microwave-Assisted Combustion Method’, *Scientific Reports*, 9(1), p. 4015. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40488-8>.
- Leali, P.T. and Merolli, A. (2009) ‘Fundamentals of Biomaterials’, in Antonio Merolli and T.J. Joyce (eds) *Biomaterials in Hand Surgery*. Milano: Springer Milan, pp. 1–11. DOI: https://doi.org/10.1007/978-88-470-1195-3_1.
- Lee, D. and Kumta, P.N. (2010) ‘Chemical synthesis and stabilization of magnesium substituted brushite’, *Materials Science and Engineering: C*, 30(7), pp. 934–943. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.04.007>.
- LeGeros, R.Z. *et al.* (2003) ‘Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications’, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(3), pp. 201–209. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022872421333>.

- Li, D. *et al.* (2016) 'Preparation of pH-responsive mesoporous hydroxyapatite nanoparticles for intracellular controlled release of an anticancer drug', *Biomaterials Science*, 4(2), pp. 272–280. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5BM00228A>.
- de Lima, C.O. *et al.* (2021) 'Zn-doped mesoporous hydroxyapatites and their antimicrobial properties', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 198, p. 111471. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111471>.
- Lima, É.C., Adebayo, M.A. and Machado, F.M. (2015) 'Kinetic and Equilibrium Models of Adsorption', in C.P. Bergmann and F.M. Machado (eds) *Carbon Nanomaterials as Adsorbents for Environmental and Biological Applications*. Cham: Springer International Publishing (Carbon Nanostructures), pp. 33–69. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-18875-1_3.
- Litak, Jakub *et al.* (2022) 'Hydroxyapatite Use in Spine Surgery—Molecular and Clinical Aspect', *Materials*, 15(8), p. 2906. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15082906>.
- Liu, A. *et al.* (2016) '3D Printing Surgical Implants at the clinic: A Experimental Study on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction', *Scientific Reports*, 6(1), p. 21704. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep21704>.
- Maathuis, F.J. (2009) 'Physiological functions of mineral macronutrients', *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), pp. 250–258. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.003>.
- Maghsoodi, M.R. *et al.* (2020) 'Hydroxyapatite nanorods, hydrochar, biochar, and zeolite for controlled-release urea fertilizers', *Geoderma*, 379, p. 114644. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114644>.
- Maghsoodi, M.R., Ghodszad, L. and Asgari Lajayer, B. (2020) 'Dilemma of hydroxyapatite nanoparticles as phosphorus fertilizer: Potentials, challenges and effects on plants', *Environmental Technology & Innovation*, 19, p. 100869. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100869>.
- Maleki-Ghaleh, H. *et al.* (2016) 'Influence of Fe₃O₄ Nanoparticles in Hydroxyapatite Scaffolds on Proliferation of Primary Human Fibroblast Cells', *Journal of Materials Engineering and Performance*, 25(6), pp. 2331–2339. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11665-016-2086-4>.
- de Marco, B.A. *et al.* (2019) 'Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review', *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1), pp. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>.
- Marques, C.F. *et al.* (2017) 'Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine', *Ceramics International*, 43(17), pp. 15719–15728. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.133>.
- Milovac, D. *et al.* (2014) 'PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity', *Materials Science and Engineering: C*, 34, pp. 437–445. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.036>.
- Mohamed, M.A. *et al.* (2017) 'Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy', in N. Hilal *et al.* (eds) *Membrane Characterization*. Elsevier, pp. 3–29. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>.

Mohd Pu'ad, N.A.S. *et al.* (2021) 'Synthesis of eggshell derived hydroxyapatite via chemical precipitation and calcination method', *Materials Today: Proceedings*, 42, pp. 172–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.276>.

Momma, K. and Izumi, F. (2011) 'VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data', *Journal of Applied Crystallography*, 44(6), pp. 1272–1276. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0021889811038970>.

Munir, M.U. *et al.* (2022) 'Synthesis, Characterization, Functionalization and Bio-Applications of Hydroxyapatite Nanomaterials: An Overview', *International Journal of Nanomedicine*, 17, pp. 1903–1925. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S360670>.

Narayanan, R. *et al.* (2008) 'Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys', *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 85B(1), pp. 279–299. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30932>.

Nayak, A. and Bhushan, B. (2021) 'Hydroxyapatite as an advanced adsorbent for removal of heavy metal ions from water: Focus on its applications and limitations', *Materials Today: Proceedings* [Preprint]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.149>.

Negrila, C.C. *et al.* (2018) 'Development of Zinc-Doped Hydroxyapatite by Sol-Gel Method for Medical Applications', *Molecules*, 23(11), p. 2986. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23112986>.

Nenen, A. *et al.* (2022) 'Synthesis of antibacterial silver and zinc doped nano-hydroxyapatite with potential in bone tissue engineering applications', *Ceramics International*, 48(23A), pp. 34750–34759. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.08.064>.

Núñez, D. *et al.* (2019) 'Heavy metal removal from aqueous systems using hydroxyapatite nanocrystals derived from clam shells', *RSC Advances*, 9(40), pp. 22883–22890. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9RA04198B>.

Nzihou, A. and Sharrock, P. (2010) 'Role of Phosphate in the Remediation and Reuse of Heavy Metal Polluted Wastes and Sites', *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), pp. 163–174. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9006-x>.

Ofudje, E.A. *et al.* (2019) 'Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies', *Heliyon*, 5(5), p. e01716. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01716>.

Öner, M. *et al.* (2011) 'Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets', *Ceramics International*, 37(7), pp. 2117–2125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.02.021>.

Öner, M. and Doğan, Ö. (2005) 'Inhibitory effect of polyelectrolytes on crystallization kinetics of hydroxyapatite', *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 50(1), pp. 39–51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2005.08.002>.

Orlova, M.A. *et al.* (2019) 'Specific properties of hydroxyapatite as a potential transporter of copper ions and its complexes', *Russian Chemical Bulletin*, 68(5), pp. 1102–1108. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2526-z>.

Padmanabhan, S.K. *et al.* (2015) 'Synthesis and Characterization of Collagen Scaffolds Reinforced by Eggshell Derived Hydroxyapatite for Tissue Engineering', *Journal of*

Nanoscience and Nanotechnology, 15(1), pp. 504–509. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9489>.

Pal, A. *et al.* (2017) ‘Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from Mercenaria clam shells and phosphoric acid’, *Biomedical Physics & Engineering Express*, 3(1), p. 015010. DOI: <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aa54f5>.

Pani, R., Ranjan Behera, R. and Roy, S. (2022) ‘Electrophoretic deposition of hydroxyapatite Coating: A state of art’, *Materials Today: Proceedings*, 62, pp. 4086–4093. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.632>.

Prabakaran, K. and Rajeswari, S. (2009) ‘Spectroscopic investigations on the synthesis of nano-hydroxyapatite from calcined eggshell by hydrothermal method using cationic surfactant as template’, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74(5), pp. 1127–1134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.09.021>.

Predoi, D. *et al.* (2023) ‘Development of Novel Tetracycline and Ciprofloxacin Loaded Silver Doped Hydroxyapatite Suspensions for Biomedical Applications’, *Antibiotics*, 12(1), p. 74. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010074>.

Production of eggs worldwide, 2020 (2022) *Statista*. DOI: <https://www.statista.com/statistics/263972/egg-production-worldwide-since-1990/> (Accessed: 12 May 2022).

Radovanović, Ž. *et al.* (2012) ‘Biocompatibility and antimicrobial activity of zinc(II) doped hydroxyapatite, synthesized by hydrothermal method’, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(12), pp. 1787–1798.

Ramírez-Rodríguez, G.B. *et al.* (2020) ‘Engineering Biomimetic Calcium Phosphate Nanoparticles: A Green Synthesis of Slow-Release Multinutrient (NPK) Nanofertilizers’, *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), pp. 1344–1353. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00937>.

Raynaud, S. *et al.* (2002) ‘Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders’, *Biomaterials*, 23(4), pp. 1065–1072. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00218-6).

Rehman, I. and Bonfield, W. (1997) ‘Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy’, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(1), pp. 1–4. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1018570213546>.

Richardson, J.C. *et al.* (2004) ‘Oesophageal bioadhesion of sodium alginate suspensions: particle swelling and mucosal retention’, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), pp. 49–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.05.001>.

Rietveld, H.M. (1969) ‘A profile refinement method for nuclear and magnetic structures’, *Journal of Applied Crystallography*, 2(2), pp. 65–71. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0021889869006558>.

Sadat-Shojai, M. *et al.* (2013) ‘Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures’, *Acta Biomaterialia*, 9(8), pp. 7591–7621. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.

- Sajahan, N.A. and Wan Ibrahim, W.M.A. (2014) *Microwave Irradiation of Nanohydroxyapatite from Chicken Eggshells and Duck Eggshells*, *The Scientific World Journal*. Hindawi. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/275984>.
- Salimi, E., Javadpour, J. and Anbia, M. (2012) 'Template-Based Synthesis of Nanoporous Hydroxyapatite', *ISRN Ceramics*, 2012, pp. 1–6. DOI: <https://doi.org/10.5402/2012/960915>.
- Scrivener, K.L. *et al.* (2004) 'Quantitative study of Portland cement hydration by X-ray diffraction/Rietveld analysis and independent methods', *Cement and Concrete Research*, 34(9), pp. 1541–1547. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2004.04.014>.
- Shi, Z. *et al.* (2009) 'Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells', *Acta Biomaterialia*, 5(1), pp. 338–345. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.023>.
- Simon, P., Baldovino-Medrano, V.G. and Wojcieszak, R. (2022) 'X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS): Principles and Application for the Analysis of Photoactive Materials', in D. Bahnemann and A.O.T. Patrocínio (eds) *Springer Handbook of Inorganic Photochemistry*. Cham: Springer International Publishing (Springer Handbooks), pp. 249–271. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-63713-2_10.
- Siva Rama Krishna, D. *et al.* (2007) 'A novel route for synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from eggshell waste.', *Journal of Materials science. Materials in Medicine*, 18(9), pp. 1735–1743. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3069-7>.
- S. L. Wijesinghe, W.P. *et al.* (2017) 'Urea-assisted synthesis of hydroxyapatite nanorods from naturally occurring impure apatite rocks for biomedical applications', *RSC Advances*, 7(40), pp. 24806–24812. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7RA02166F>.
- Sneddon, J. and Vincent, M.D. (2008) 'ICP-OES and ICP-MS for the Determination of Metals: Application to Oysters', *Analytical Letters*, 41(8), pp. 1291–1303. DOI: <https://doi.org/10.1080/00032710802013991>.
- Sunil, B.R. and Jagannatham, M. (2016) 'Producing hydroxyapatite from fish bones by heat treatment', *Materials Letters*, 185, pp. 411–414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.09.039>.
- Suresh Kumar, G. *et al.* (2015) 'Utilization of snail shells to synthesise hydroxyapatite nanorods for orthopedic applications', *RSC Advances*, 5(49), pp. 39544–39548. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5RA04402B>.
- Szczęś, A., Hołysz, L. and Chibowski, E. (2017) 'Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications', *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, pp. 321–330. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>.
- Tadic, D., Peters, F. and Epple, M. (2002) 'Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites', *Biomaterials*, 23(12), pp. 2553–2559. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00390-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00390-8).
- Tadjiev, T.R., Chun, S.S. and Kim, S.Y. (2007) 'Mechano-Chemical Synthesis of Biphasic Calcium Phosphates with the Various Ratio of HA and β -TCP', *Key Engineering Materials*, 330–332, pp. 7–10. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.330-332.7>.

Tanimoto, Y., Hayakawa, T. and Nemoto, K. (2005) 'Tape-casting technique can prepare β -TCP sheets with uniform thickness and flexibility', *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73B(1), pp. 157–163. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30185>.

Tathe, A., Ghodke, M. and Nikalje, A. (2010) 'A brief review: Biomaterials and their application', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 2, pp. 19–23.

The United Nations website (2023) *Sustainable Development Goals*. DOI: <https://sdgs.un.org/goals> (Accessed: 24 November 2022).

Thian, E.S. *et al.* (2013) 'Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(2), pp. 437–445. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4817-x>.

Thomas, R. (2008) *Practical guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Second Edition*. 2nd edn. Boca Raton: CRC Press. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420067873>.

Torres, F.G., Troncoso, O.P. and Montes, M.R. (2013) 'The effect of temperature on the mechanical properties of a protein-based biopolymer network', *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111(3), pp. 1921–1925. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2915-0>.

UNIC (2023) [//www.unic.un.org.pl/](http://www.unic.un.org.pl/), www.unic.un.org.pl. DOI: [//www.unic.un.org.pl/](http://www.unic.un.org.pl/) (Accessed: 25 January 2023).

Uskoković, V. and Desai, T.A. (2014) 'In Vitro Analysis of Nanoparticulate Hydroxyapatite/Chitosan Composites as Potential Drug Delivery Platforms for the Sustained Release of Antibiotics in the Treatment of Osteomyelitis', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(2), pp. 567–579. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.23824>.

V. Dorozhkin, S. (2021) 'Synthetic amorphous calcium phosphates (ACPs): preparation, structure, properties, and biomedical applications', *Biomaterials Science*, 9(23), pp. 7748–7798. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1BM01239H>.

Veljovic, D. *et al.* (2019) 'Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite – Biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity', *Ceramics International*, 45(17, Part A), pp. 22029–22039. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.219>.

Vernon-Parry, K.D. (2000) 'Scanning electron microscopy: an introduction', *III-Vs Review*, 13(4), pp. 40–44. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0961-1290\(00\)80006-X](https://doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X).

Wei, J. *et al.* (2015) 'Hollow hydroxyapatite/polyelectrolyte hybrid microparticles with controllable size, wall thickness and drug delivery properties', *Journal of Materials Chemistry B*, 3(41), pp. 8162–8169. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5TB01268F>.

Weiss, K.M. *et al.* (2023) 'Investigating the structure, solubility, and antibacterial properties of silver- and copper-doped hydroxyapatite', *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 111(2), pp. 295–313. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35151>.

Welna, M., Szymczycha-Madeja, A. and Pohl, P. (2017) 'Improvement in the single and simultaneous generation of As, Bi, Sb and Se hydrides using a vapor generation accessory (VGA) coupled to axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometry

(ICP OES)', *Analytical Methods*, 9(5), pp. 871–880. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6AY02932A>.

Wu, S.-C. *et al.* (2013) 'A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite', *Ceramics International*, 39(7), pp. 8183–8188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.03.094>.

Wu, S.-C. *et al.* (2017) 'Preparation and characterization of hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders', *Advanced Powder Technology*, 28(4), pp. 1154–1158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.appt.2017.02.001>.

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) | West Campus Materials Characterization Core (2023). DOI: <https://ywcmatsci.yale.edu/xps> (Accessed: 31 January 2023).

Xue, W. *et al.* (2008) 'Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(7), pp. 2669–2677.

Yazdani, N. *et al.* (2019) 'Hydrothermal Synthesis of Cobalt- Doped Hydroxyapatite Nanoparticles: Structure, Magnetic Behaviour, Bioactivity and Antibacterial Activity', *Iranian Journal of Materials Science and Engineering*, 16(1), pp. 39–48. DOI: <https://doi.org/10.22068/ijmse.16.1.39>.

Yuan, Q. *et al.* (2017) 'One-pot synthesis and characterization of Zn-doped hydroxyapatite nanocomposites', *Materials Chemistry and Physics*, 199, pp. 122–130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.06.047>.

Yudin, A. *et al.* (2019) 'Microwave treatment and pH influence on hydroxyapatite morphology and structure', *Journal of Physics: Conference Series*, 1145, p. 012003. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1145/1/012003>.

Zanelato, C. *et al.* (2020) 'Development of biphasic bone cement obtained from chicken eggshell', *Journal of Materials Research and Technology*, 9(4), pp. 7297–7304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.05.053>.

Zhang, C. *et al.* (2010) 'Self-activated luminescent and mesoporous strontium hydroxyapatite nanorods for drug delivery', *Biomaterials*, 31(12), pp. 3374–3383. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.044>.

Zhang, E. *et al.* (2021) 'Antibacterial metals and alloys for potential biomedical implants', *Bioactive Materials*, 6(8), pp. 2569–2612. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.030>.

Zhao, Q. *et al.* (2019) 'Adsorption behavior of drugs on hydroxyapatite with different morphologies: A combined experimental and molecular dynamics simulation study', *Ceramics International*, 45(15), pp. 19522–19527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.06.068>.

Zyman, Z.Z., Tkachenko, M.V. and Polevodin, D.V. (2008) 'Preparation and characterization of biphasic calcium phosphate ceramics of desired composition', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(8), pp. 2819–2825. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3402-9>.

8. Wykaz dorobku naukowego

Publikacje dotyczące wyników zamieszczonych w pracy:

1. M. Kalbarczyk, A. Szcześ. Microwave assistant synthesis of calcium phosphate minerals using hen's eggshells as a calcium source. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 2020, 56(6): 167-177. <https://doi.org/10.37190/ppmp/127930>.
IF₂₀₂₀=1,213
2. M. Kalbarczyk, A. Szcześ and D. Sternik, The preparation of calcium phosphate adsorbent from natural calcium resource and its application for copper ion removal. *Environmental Science and Pollution Research* 2021, 28(2): 1725–1733. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10585-7>
IF₂₀₂₁=5,190
3. M. Kalbarczyk, A. Szcześ, Potential biomedical application of calcium phosphates obtained using eggshells as a biosource of calcium at different initial pH values. *Ceramics International* 2021, 47(23):33687–33696. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.08.278>
IF₂₀₂₁=5,532
4. M. Kalbarczyk, A. Szcześ, I. Kantor, Z. May and D. Sternik, Synthesis and Characterization of Calcium Phosphate Materials Derived from Eggshells from Different Poultry with and without the Eggshell Membrane. *Materials* 2022, 15(3)934. <https://doi.org/10.3390/ma15030934>
IF₂₀₂₁=3,748
5. M. Kalbarczyk, A. Szcześ, A. Belcarz, P. Kazimierczak and Z. May, Zn doped mono and biphasic calcium phosphate materials de-rived from agriculture waste and its potential biomedical applications. Part I. *Materials* 2023.- Major revision
IF₂₀₂₁=3,748

Pozostałe publikacje:

1. M. Kosmulski, M. Kalbarczyk, Zeta potential of Nanosilica in 50% Aqueous Ethylene Glycol and in 50% Aqueous Propylene Glycol. *Molecules* 2023, 28(3), 1335. <https://doi.org/10.3390/molecules28031335>
IF₂₀₂₁=4,927

Wystąpienia konferencyjne, na których ogłoszono komunikaty:

- 1) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *The synthesis of calcium phosphate-based materials using eggshells for environmental purposes.*, **XLIV. Chemistry Lectures and international conference for young professionals**, Szeged, Węgry, 26-27 października 2021.
- 2) M.Kalbarczyk, A.Szcześ, *Biphasic calcium phosphate (BCP) material originated from avian eggshells: the synthesis and adsorption studies* **18th Conference of the European Student Colloid Conference**, Szeged, Węgry, 26- 30 czerwca 2022
- 3) M.Kalbarczyk, A.Szcześ, *The synthesis of calcium phosphate based materials using agricultural waste as a calcium donor for environmental applications* **International Summer school for PhD Students**, Lublin, Polska, 8-10 maja 2022.
- 4) A. Szcześ, M. Kalbarczyk, *Potencjalne biomedyczne zastosowanie dwufazowych fosforanów wapnia otrzymanych z odpadów rolniczych.* **64 Zjazd naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, Lublin, Polska 11-16 września 2022.

Wystąpienia konferencyjne, na których zaprezentowano plakaty:

- 1) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *Removal of heavy metal pollution with low-cost adsorbent recieved from agricultural waste* **7th International Conference „Nanotechnologies and Nanomaterials NANO 2019**, Lwów, Ukraina, 27-30 sierpnia 2019.
- 2) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *Synteza adsorbentów na bazie odpadów rolniczych oraz ich zastosowanie do usuwania metali ciężkich*, **62. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, Warszawa, Polska, 2-6 września 2019.
- 3) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *The synthesis of calcium phosphate - based adsorbent using natural calcium resource and its application for copper ions removal* **Geneva Colloids 2021**, Genewa, Szwajcaria, , 8-9 kwietnia 2021.
- 4) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *The impact of the initial pH value on the calcium phosphate ceramics derived from eggshells* **Advanced Materials and Technologies 2021**, Palanga, Litwa, 23-27 sierpnia 2021.

- 5) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *The initial pH value impact on the properties of calcium phosphate materials derived from eggshells* **35th Conference of the European Colloid& Interface Society**, Ateny, Grecja, 5-10 września 2021.
- 6) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *The properties of calcium phosphate bioceramics derived from different avian eggshells* **35th Conference of the European Colloid& Interface Society**, Ateny, Grecja, 5-10 września 2021.
- 7) M.Kalbarczyk, A.Szcześ *The synthesis of calcium phosphate-based materials using eggshells for environmental purposes* **XLIV. Chemistry Lectures and international conference for young professionals**, Szeged, Węgry, 26-27 października 2021.
- 8) M.Kalbarczyk, A.Szcześ, *The initial pH value influence on the calcium phosphate ceramics originated from eggshells* **International Summer school for PhD Students**, Lublin, Polska, 8-10 maja 2022.
- 9) M. Kalbarczyk, A. Szcześ, Z. May, *The synthesis of zinc-doped multiphasic calcium phosphate* **36th European Colloid and Interface Society Conference**, Kreta, Grecja, 4-9 września 2022.
- 10) M. Kalbarczyk, A. Szcześ, *The synthesis and adsorption studies of biphasic calcium phosphate material originated from avian eggshells* **36th European Colloid and Interface Society Conference**, Kreta, Grecja, 4-9 września 2022.

Stáže naukowe:

- 4.03 – 1.04.2020** Institute of Materials and Environmental Chemistry, Research Center for Natural Science, Budapeszt, Węgry.
- 1.07 – 10.12.2021** Institute of Materials and Environmental Chemistry, Research Center for Natural Science, Budapeszt, Węgry.

Aktywność dodatkowa

- 1) Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego V Ogólnopolskiego Turnieju All-chemicznego.
- 2) Organizatorka warsztatów w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki 2019, projekt „Oszukać czas – kawa versus wolne rodniki”.
- 3) Przewodnicząca Wydziałowej Rady Samorządu Doktorantów Wydziału Chemii UMCS Lublin.
- 4) Prowadząca zajęcia w ramach programu „Korepetycje koleżeńskie” organizowanego przez Urząd Miasta Lublina.