

## مطالعه جذب سطحی آلبومین بر روی هیدروکسی آپاتیت: ایزوترم و تعادل

امید مرادی\*

گروه شیمی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرقدس، ایران

کریم زارع

گروه شیمی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

// :

// :

## چکیده

مقدمه: مطالعه تاثیر غلظت و حداقل زمان تماسی بر جذب سطحی پروتئین آلبومین سرم گاوی<sup>1</sup> (BSA) بر روی هیدروکسی آپاتیت (HA)<sup>2</sup> مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات در pH و دمای ثابت مورد بررسی قرار گرفته است.

هدف: مطالعه جذب سطحی با استفاده از ترسیم ایزوترمها در pH و دمای ثابت صورت گرفته است.

روش بررسی: مقادیر جذب سطحی BSA بر روی HA با استفاده از اسپکتروسکوپی UV-Vis در طول موج ۲۸۰ نانومتر مورد مطالعه شده است.

نتایج: حداکثر پروتئین جذب شده بر روی سطح HA (ثابت ایزوترم لانگمیر) در دمای ۲۲ درجه سانتی-گراد و pH=۷/۲، ۳/۳۴۷۸ میلی گرم بر گرم می باشد.

نتیجه گیری: مقدار بالای جذب BSA بر روی HA در pH=۷/۲، می توان به ساختار متخلخل HA و از دست دادن خواص BSA در دما و pH ثابت مرتبط دانست.

واژه های کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، پروتئین آلبومین، ایزوترم های جذبی، فاکتور جدا کننده

\* عهده دار مکاتبات: o.moradi@shahryaiu.ac.ir، تلفکس: ۰۲۱-۴۶۸۹۶۵۰۴

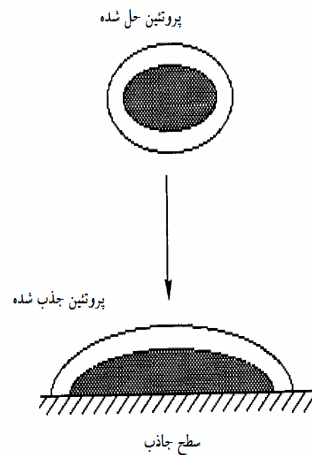
<sup>1</sup>Bovine Serum Albumin

<sup>2</sup> hydroxyl Apatite

هیدروکسی آپاتیت با فرمول شیمیایی  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$  یا HA از جمله بیو مواد سرامیکی می باشد که به دلیل برقراری پیوند محکم با استخوان و همچنین عدم بروز اثرات ناسازگار در بدن انسان، کاربردهای بالینی و ارتوپدی وسیعی را به منظور ترمیم بافت‌های استخوانی آسیب دیده ارائه می دهد. (۴-۱) بعلاوه، رفتار زیستی سرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت به عوامل زیادی نظیر ترکیب شیمیایی و فازی، ریز ساختار، اندازه و حجم تخلخل آن بستگی دارد. (۳) به طور کلی روش‌های تولید بیو سرامیک هیدروکسی آپاتیت را می توان به دو گروه فرآیندهای خشک و تر تقسیم بندی نمود. (۶، ۵) با استفاده از فرآیندهای خشک امکان تولید استوکیومتری هیدروکسی آپاتیت (Ca:P=1.67) وجود دارد، اما بدین منظور نیرو و زمان زیادی لازم است. از سوی دیگر محصولات بدست آمده از این فرآیندها، معمولاً از یکنواختی پایینی برخوردار می باشند. (۷) به هر حال، هنگامیکه تولید انبوه هیدروکسی آپاتیت کریستالی مد نظر باشد، علیرغم حضور برخی از آلودگی‌ها در حین فرآیند آسیاب کاری، فرآیندهای خشک به دلیل قابلیت تولید مجدد و ارزان بودن فرآیند در مقایسه با روش‌های تر مطلوب تر هستند. (۶) در این میان عملیات مکانوشیمیایی یکی از فرآیندهایی است که به دلیل تولید مواد با مشخصاتی نظیر فرم پذیری بهتر و زیست سازگاری با استخوان‌های طبیعی، در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است. (۸-۱۲) در این فرآیندها اغلب محفظه‌هایی از جنس کاربید تنگستن، کاربید سیلیسیم و یا فولاد زنگ نزن استفاده می شود که متاسفانه منجر به ایجاد آلودگی‌هایی با نقطه ذوب بالا و یا آلودگی‌های پایدار شیمیایی می شود که به سختی از بین نمی روند. (۱۳-۱۴)

بنابراین از طریق کنترل عواملی مانند اتمسفر و محیط آسیاب کاری شامل محفظه و گلوله‌ها می توان از آلودگی محصول جلوگیری به عمل آورد. از سوی دیگر مکانیزم آمورف شدن در عملیات مکانیکی-شیمیایی کاملاً شناخته شده نمی باشد و مشخصات آن عمدتاً به شرایط آسیاب کاری نظیر محفظه و محیط آسیاب کاری و ... بستگی دارد. (۱۳)

پروتئین‌های موجود در پلاسما خون به عنوان مهمترین فاکتورهای کلیدی در پذیرش یک عضو پیوندی به اندام‌های بدن می باشد. (۱۴-۱۵) بعد از کاشت هر جزء مصنوعی در بدن، تحت یک سری فرآیندهای بیوایمنی، جزء بیگانه مورد حمله مولکول‌های بیولوژیکی از جمله پلاکت‌های موجود در خون قرار می گیرد، که در طی آن پروتئین‌ها بر روی آن جذب سطحی شده و گاهی به دنبال این فعالیت بیولوژیکی، عضو پیوندی دفع خواهد شد. (۱۶) جذب سطحی پروتئین به خواص فیزیکی-شیمیایی سطح جاذب بستگی دارد. برای پیشرفت در طراحی و ساخت بیومتریال‌هایی از قبیل سیمان مصنوعی برای ترمیم بافت استخوان با کارایی و زیست سازگاری بالا، اطلاع از مکانیزم و چگونگی جذب پروتئین بر سطح HA ضروری است. از عوامل مؤثر بر جذب سطحی پروتئین می توان به آثار pH، قدرت یونی محلول، دما، بار سطحی پروتئین، بار سطح جاذب، خواص فیزیکی شیمیایی سطح اشاره کرد. (۱۷) همچنین از HA به عنوان جاذب برای حذف فلزات سنگین از محلول‌های آبی (۱۸-۱۹) و حذف نیترات (۲۰) اشاره کرد.



شکل ۱- نوآرایی ساختار پروتئین در جذب سطحی<sup>(۲۱)</sup>

نتایج موجود HA و سایر سطوح، در شرایط آزمایشگاهی محدود به دو نوع پروتئین می‌باشد، در حالیکه در خون بیش از صد نوع پروتئین یافت می‌شود که به صورت رقابتی بر روی سطوح خارجی پیوندی و غیر پیوندی، جذب سطحی می‌شوند و این فرآیند در بدن به صورت مداوم و دینامیک انجام می‌گیرد. همچنین در برخی از شرایط ممکن است پروتئین در آغاز جذب سطحی شده و ممکن است بعد از مدتی توسط یک پروتئین دیگر جایگزین گردد. بنابراین در داخل بدن در مجاورت مولکول‌های بیولوژیکی، پدیده جذب سطحی بسیار پیچیده می‌باشد.<sup>(۲۱)</sup> مطالعات نشان می‌دهند، وقتی پروتئین در محلول نظیر آلبومین نوع انسان یا BSA در تماس با سطح HA قرار می‌گیرند، پروتئین ساختار خود را تغییر می‌دهند و در ساختار آن نوآرایی ایجاد شده که باعث از دست دادن خواص مولکول پروتئین خواهد شد که در شکل ۱ نشان داده شده است.<sup>(۲۱)</sup> سطح HA دارای دو نوع موقعیت C و P که به ترتیب، ترکیبات کلسیم و فسفات در سطح HA می‌باشند. مولکول‌های اسیدی در مکان‌های C و مولکول‌های بازی در مکان‌های P جذب می‌شوند. نیروی غالب در جذب پروتئین بر روی سطح هیدروکسی آپاتیت، نیروهای برهم کنش الکترواستاتیک می‌باشند.<sup>(۲۲-۲۳)</sup>

هدف از اجرای این تحقیق بدست آوردن مقدار جذب سطحی پروتئین BSA بر روی سطح HA در دما و pH ثابت بدست آورده شود. همچنین در نظر است با تعیین روابط بین مقدار ماده جذب شده و غلظت اولیه، مقدار جذب سطحی BSA در سایر غلظت‌ها بدست آید.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد و تجهیزات

سرم آلبومین گاوی بعنوان مولکول جذب شونده از شرکت Sigma، هیدروکسی آپاتیت (HA) بعنوان سطح جاذب، استات سدیم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، برای ثابت نگه داشتن pH محلول، از شرکت Merck آلمان با درصد خلوص ۹۹/۹۹٪ تهیه شده است. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین جذب شده از دستگاه اسپکتروسکوپی UV-

<sup>1</sup> Denaturation

UV-1700 مدل از شرکت شیمادو استفاده شده است.

### روش آزمایش

BSA با غلظت ۰/۵-۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در pH=۷/۲ تهیه و نمودار استاندارد آن بدست آورده می شود. برای کنترل pH از محلول بافر فسفات<sup>(۲۳)</sup> استفاده شده است. داخل ظروف آزمایش ۱۰ میلی لیتر از محلول پروتئین با غلظت اولیه مشخص اضافه می شود و سپس به آن ۰/۱ گرم HA بعنوان سطح جاذب اضافه و نمونه داخل شیکر مجهز به ترموستات در دمای ۲۲±۰/۱ °C قرار داده می شود و پس از زمان مشخص، سطح جاذب از نمونه ها با استفاده از سانتریفوژ جدا شده و غلظت پروتئین با استفاده از دستگاه UV-Vis در طول موج ۲۸۰ نانومتر<sup>(۲۳-۲۸)</sup> بدست آورده می شود. لازم به ذکر است در این تحقیق تمام آزمایشات سه مرتبه تکرار و میانگین آن در نظر گرفته خواهد شد.

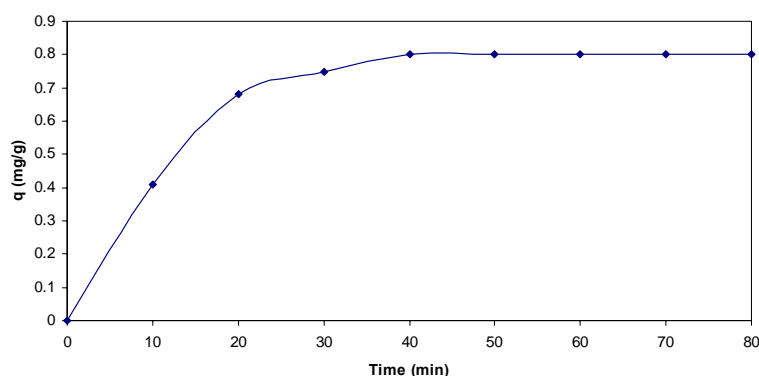
### نتایج و بحث

#### اثر زمان و غلظت اولیه

علت استفاده از پروتئین آلبومین نوع گاوی، این است که این پروتئین از نظر ساختاری نزدیک به پروتئین به نوع انسانی بوده و با توجه به هزینه پائین آن، در اکثر مطالعات از BSA استفاده می شود.<sup>(۲۳)</sup> به منظور تعیین حداقل زمان تماسی بین مولکول های BSA با سطح جاذب HA، نمونه هایی با غلظت اولیه پروتئین ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در pH=۷/۲ در زمان های مختلف تهیه و غلظت پروتئین جذب شده در زمان های مختلف از رابطه زیر بدست آورده و نتایج آزمایش در نمودار ۱ نشان داده شده است.

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{m} \quad (1)$$

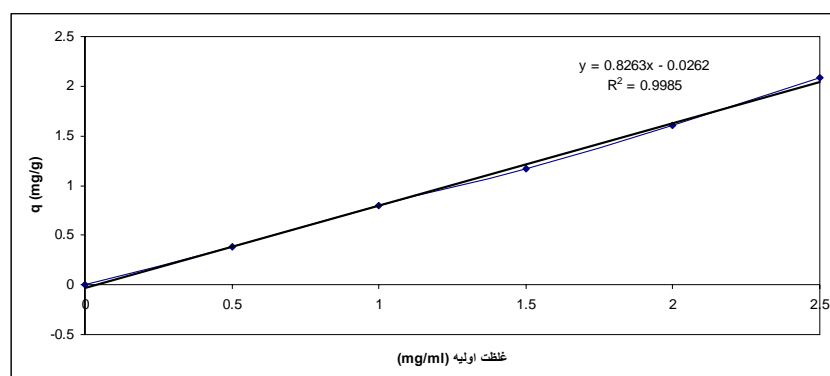
که در این معادله  $q_t$  مقدار ماده جذب شده در زمان مشخص بر واحد جرم جاذب (mg/g)،  $C_0$  و  $C_t$  بترتیب غلظت اولیه پروتئین و غلظت پروتئین در زمان مشخص (mg/ml)،  $V$  حجم نمونه برداشت شده بر حسب میلی لیتر و  $m$  جرم جاذب بر حسب گرم می باشد.



نمودار ۱. مطالعه اثر زمان بر جذب سطحی BSA با غلظت اولیه ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در pH=۷/۲ و دمای

$$۲۲ \pm ۰/۱ \text{ } ^\circ\text{C}$$

همانطور که در نمودار ۱ ملاحظه می‌گردد، در زمان بین ۵۰ تا ۶۰ دقیقه غلظت جذب پروتئین به حالت تعادلی رسیده بطوریکه با افزایش زمان، مقدار جذب سطحی بر روی سطح HA تغییر نمی‌یابد و با گذشت زمان مقدار جذب سطحی نیز ثابت خواهد ماند. بنابراین به دلیل اطمینان کامل از رسیدن به تعادل، ۶۰ دقیقه بعنوان زمان تماسی برای تمام مراحل آزمایش انتخاب می‌گردد. در ادامه مراحل آزمایش، به بررسی اثر غلظت اولیه در جذب سطحی BSA بر روی سطح HA پرداخته می‌شود. بدین منظور با انتخاب غلظت اولیه BAS، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی-گرم بر لیتر انتخاب و شرایط آزمایش و نحوه بدست آوردن غلظت پروتئین قبلاً شرح داده شده است و نتایج آزمایش در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲- بررسی اثر غلظت اولیه در جذب سطحی BSA بر روی HA، زمان تماسی ۶۰ دقیقه، pH=۷/۲ و دمای  $22 \pm 0.1$  °C

همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت اولیه، مقدار جذب سطحی BSA بر روی سطح HA افزایش می‌یابد که بخاطر ظرفیت بالای جذبی HA می‌باشد.

#### مطالعه تعادل در جذب سطحی

اعداد و نتایج آزمایش‌های جذب سطحی می‌تواند با استفاده از ایزوترم‌ها مطالعه شود که خود پایه و اصول اولیه در سیستم‌های جذبی می‌باشد. اکثر ایزوترم‌ها ریاضی، بخاطر ساده بودن در بکارگیری و تفسیر آسان برای بیان رفتار جذبی استفاده می‌شوند

#### ایزوترم لانگمیر

ایزوترم لانگمیر<sup>۱</sup> بدفعات در فرآیند جذب سطحی مورد استفاده قرار گرفته است. این معادله نیمه تجربی، به منظور بیان مقدار جسم حل شده در محلول آبی بر روی سطح جسم جاذب، استفاده می‌شود. از آنجائیکه اکثر ایزوترم‌های ارائه شده در فرآیند جذب سطحی دارای انحراف هستند، سعی در اصلاح ایزوترم‌های ارائه شده در این زمینه می‌باشد. این ایزوترم با نتایج تجربی جذب سطحی بیشترین مطابقت را داشته است که شکل کلی آن به صورت زیر است: (۲۴-۲۵)

$$q_e = \frac{K_L q_m C_e}{1 + K_L C_e} \quad (2)$$

<sup>1</sup>Langmuir Isotherm

در این معادله  $K_L$  ثابت تعادل جذب سطحی بوده که تمایل اتصال جسم حل شده بر روی سطح جامد و واحد آن  $(L/mg)$ ،  $q_m$  ثابت ایزوترم لانگمیر بوده و حداکثر ظرفیت جذبی می‌باشد و واحد آن  $(mg/g)$ ،  $C_e$  غلظت تعادلی یون فلزی در محلول و واحد آن  $(mg/L)$  و  $q_e$  مقدار یون جذب شده در حالت تعادلی می‌باشد و واحد آن  $(mg/g)$  می‌باشند. این معادله محدودیت زیادی در بکارگیری دارد و آن هنگامی است که سطح جاذب کاملاً توسط یون‌ها پوشیده می‌گردد.

برای بدست آوردن ثابت‌های ایزوترم لانگمیر  $(q_m-K_L)$  می‌توان فرم معادله (۲) را بشکل خطی تبدیل کرد و معادله زیر را بدست آورد:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{q_m K_L} \frac{1}{C_e} \quad (۳)$$

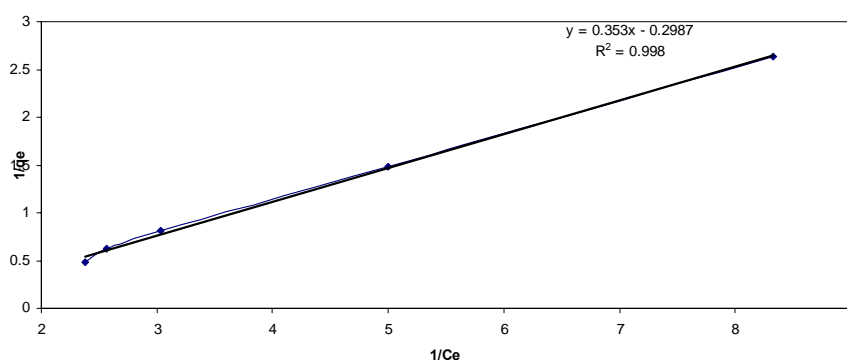
بنابراین برای بدست آوردن ثابت‌های ایزوترم لانگمیر از رسم نمودار  $1/q_e$  بر حسب  $1/C_e$  خطی بدست خواهد آمد که عرض از مبدا آن  $1/q_m$  و شیب خط  $1/q_m K_L$  می‌باشد.

#### ایزوترم فرویندلیچ

ایزوترم فرویندلیچ<sup>۱</sup> که ایزوترمی نیمه تجربی بوده و در اکثر آزمایشات برای جذب سطحی از محلول استفاده می‌گردد و بر پایه جذب سطحی بر روی سطح غیریکنواخت می‌باشد. مدل خطی فرویندلیچ بصورت زیر می‌باشد:<sup>(۲۶)</sup>

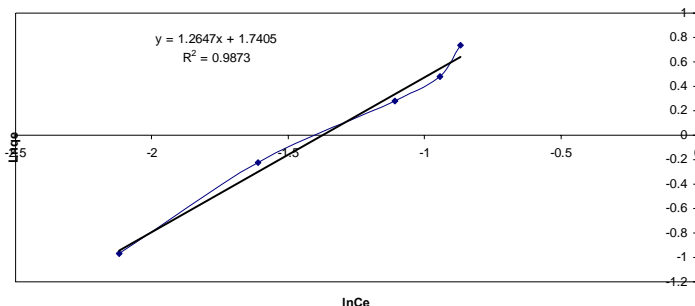
$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (۴)$$

در معادله (۴)  $K_f$  و  $n$  ثابت‌های مدل فرویندلیچ بوده و به ترتیب مربوط به ظرفیت جذب سطحی و تمایل به جذب سطحی می‌باشد.<sup>(۲۶-۲۷)</sup> نتایج مربوط به آزمایش‌ها در این تحقیق در در نمودار ۳ و ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳- ایزوترم لانگمیر برای جذب سطحی BSA بر روی HA

<sup>1</sup>Freundlich isotherm



نمودار ۴- ایزوترم فرویندلیچ برای جذب سطحی BSA بر روی HA

همانطور که از این دو ایزوترم مشخص است، جذب سطحی مولکول‌های BSA بر روی سطح جاذب HA با توجه به ضریب هبستگی خطی ( $R^2$ ) از ایزوترم لانگمیور پیروی کرده است. نتایج نمودار ۳ و ۴ در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- مقایسه میان ایزوترم لانگمیور و فرویندلیچ برای جذب سطحی BSA بر روی HA

	Langmuir			Freundlich		
	$q_m$ (mg/g)	$K_L$ (L/mg)	$R^2$	$K_f$	n	$R^2$
BSA onto HA	۳/۳۴۷۸	۰/۸۵۳۴	۰/۹۹۸	۵/۷۰۰۲	۰/۷۹۰۷	۰/۹۸۷۳

همچنین پارامتر دیگری که می‌تواند مشخص کند که کدام ایزوترم تبعیت بیشتری دارد، خطای نسبی متوسط<sup>۱</sup> (ARE)<sup>(۳۸)</sup> می‌باشد. برای بدست آوردن خطای نسبی متوسط از معادله ۵ استفاده می‌شود:

$$ARE(\%) = \frac{100}{n} \sum_i^n \left| \frac{q_{i,est} - q_{i,exp}}{q_{i,exp}} \right| \quad (5)$$

در این معادله،  $q_{i,exp}$  و  $q_{i,est}$  به ترتیب مقدار ماده جذب شده در آزمایش و مقدار قابل پیش بینی می‌باشد، همچنین n تعداد تکرار آزمایشات بوده و که نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است ( $n=3$ ).

جدول ۲- درصد خطای نسبی متوسط برای دو ایزوترم لانگمیور و فرویندلیچ ( $n=3$ )

سطح جاذب	ایزوترم لانگمیور		ایزوترم فرویندلیچ	
	$R^2$	ARE(%)	$R^2$	ARE(%)
BSA onto HA	۰/۹۹۸۰	۶/۳	۰/۹۸۷۳	۷/۱

همانطور که ملاحظه می‌شود، خطای نسبی متوسط برای ایزوترم لانگمیر برای ایزوترم فرویندلیچ کمتر بوده و در نتیجه می‌توان گفت که از ایزوترم لانگمیر بیشتر پیروی می‌کند. همچنین فاکتور جداکننده<sup>۱</sup> ( $R_L$ ) کمی بی‌بعد بوده و برای پیشگویی اینکه آیا جذب سطحی صورت گرفته، مناسب<sup>۲</sup> یا نامناسب<sup>۳</sup> در فرآیندهای جذبی است یا خیر، مورد استفاده قرار می‌گیرد.<sup>(۲۹)</sup>

مقادیر  $R_L$  برای سیستم‌های مناسب بین ۰ تا ۱ بوده و مقدار آن از معادله ایزوترم لانگمیر و طبق معادله زیر قابل محاسبه می‌باشد:<sup>(۲۹)</sup>

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (۶)$$

در معادله (۶)  $K_L$  ثابت ایزوترم لانگمیر ( $L/mg$ ) بوده و  $C_0$  غلظت اولیه ( $mg/L$ ) هریک از یون‌های فلزی می‌باشد.<sup>(۲۷)</sup> فاکتور جداکننده ( $R_L$ ) در نمودار (۵) نشان داده شده است. پارامتر  $R_L$  بیانگر شکل و ماهیت فرآیند جذب سطحی طبق موارد ذیل می‌باشد:

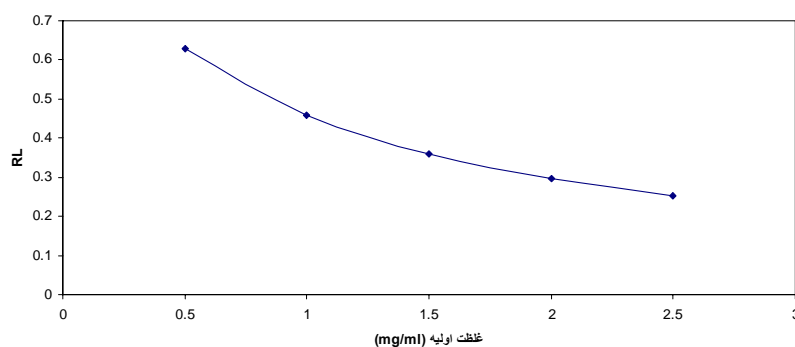
الف- اگر  $R_L$  بزرگتر از یک باشد، حالت نامناسب جذب سطحی صورت گرفته است.

ب- اگر  $R_L$  برابر یک باشد، ایزوترم خطی خواهد بود.

ج- اگر  $R_L$  مساوی صفر باشد، در این حالت ایزوترم برگشت ناپذیر خواهد بود.

د- اگر  $R_L$  بین صفر تا یک باشد، ایزوترم مناسب خواهد بود.

با توجه به معادله ۳ و مقدار بدست آمده از نمودار ۳، مقدار  $K_L$  برابر با  $1/1817 L/mg$  می‌باشد. نتایج مربوط به رسم فاکتور جداکننده در نمودار ۵ نشان داده شده است.



نمودار ۵- فاکتور جداکننده  $R_L$  در جذب سطحی یون‌های فلزی بر روی HA

با توجه به نمودار رسم شده بیانگر مناسب بودن جذب سطحی است، زیرا فاکتور جداکننده بین صفر تا یک در نوسان بوده و با افزایش غلظت اولیه BSA از ۰/۵ به ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، شاهد کاهش فاکتور جداکننده برای جذب سطحی BSA هستیم. از این نمودار براحتی می‌توان دریافت که فرآیند جذب سطحی در غلظت‌های بالا و پائین نیز مناسب است.<sup>(۳۰)</sup>

<sup>1</sup>- Separation factor

<sup>2</sup>-Favorable

<sup>3</sup>-Unfavorable



## نتیجه گیری

در این تحقیق به مطالعه جذب سطحی بیومولکول BSA بر روی HA در  $\text{pH}=7/2$  و دمای ثابت پرداخته شده است. مهمترین نتایج این تحقیق، زمان ۶۰ دقیقه تماسی بین مولکول جذب شونده با سطح جاذب است. ملاحظه می شود با افزایش غلظت اولیه BSA مقدار جذب سطحی آن افزایش می یابد. همچنین فرآیند جذب سطحی با استفاده از فاکتور جدا کننده مناسب و از ایزوترم لانگمیر نسبت به ایزوترم فرویندلچ بیشتر تبعیت می کند.

نویسندگان این مقاله از حمایت های مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس تشکر می نمایند.

## References:

1. Komlev, V.S., Barinov, S.M., Orlovskii, V.P., and Kurdyumov, S.G., *Refract. Ind. Ceramics*, **42**, 195 (2001).
2. Fellah, B.H., Josselin, N., Chappard, D., Weiss, P., and Layrolle, P., *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **18**, 287 (2007).
3. Orlovskii, V.P., Komlev, V.S., and Barinov, S.M., *Inorgan. Mater.*, **38**, 1159 (2002).
4. Martinetti, R., Dolcini, L., and Mangano, C., *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 634 (2005).
5. Silva, C.C., Pinheiro, A.G., Miranda, M.A.R., Goes, J.C., and Sombra, A.S.B., *Solid State Sci.*, **5**, 553 (2003).
6. Rhee, S.H., *Biomaterials*, **23**, 1147 (2002).
7. Yoshida, A., Miyazaki, T., and Ashizuka, M., *J. Biomater. Appl.*, **21**, 179 (2006).
8. Silva, C.C., Valente, M.A., Graça, M.P.F., and Sombra, A.S.B., *Solid State Sci.*, **6**, 1365 (2004).
9. Silva, C.C., Pinheiro, A.G., de Oliveira, R.S., Goes, J.C., Aranha, N., de Oliveira, L.R., and Sombra, A.S.B., *J. Phys. Chem. Soli.*, **63**, 1745 (2002).
10. Silva, C.C., Pinheiro, A.G., de Oliveira, R.S., Goes, J.C., Aranha, N., de Oliveira, L.R., and Sombra, A.S.B., *J. Mater. Sci.*, **24**, 549 (2004).
11. Mochales, C., Briak-BenAbdeslam, H.El, Pau Ginebra, M., Alain, T., Planell, J.A., and Philippe, B., *Biomaterials*, **25**, 1151 (2004).
12. Kim, W., Zhang, Q., and Saito, F., *J. Mater. Sci.*, **35**, 5401 (2000).
13. Suryanarayana, C., *Prog. Mater. Sci.*, **46**, 1 (2001).
14. Horbert, T.A., *Coll. Surf. B, Biointt. interface*, **40**, 2 (1994).
15. Horbert, T.A., editors. *Biomaterials, Interfacial phenomena and application* Washington DC, American Chemical Society (1982).
16. Rosengern, A., Pavlovic, E., and Oscarsson, S., *Biomaterials*, **23**, 1237 (2002).
17. Jarcho, M., *Orthop Clin., Relat. Res.*, **157**, 259 (1981).
18. Jang, S.H., Min, B.G., Jeong, Y.G., Lyoo, W.S., and Lee, S.C., *J. Hazard. Mater.*, **152**, 1285 (2008).
19. Liaoa, D., Zheng, W., Li, X., Yang, Q., Yu, X., Guo, L., and Zeng, G., *J. Hazardous Materials*, **177**, 126 (2010).

20. Islam, M., ChandraMishra, P., Patel, R., *J. Environnemental Management*, **91**, 1883 (2010).