

UNIVERSITATEA DE VEST DIN TIMIȘOARA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚELE NATURII
DOMENIUL: CHIMIE

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT
CONTRIBUȚII LA CHIMIA ȘI
APLICAȚIILE HIDROXIAPATITEI

Conducător științific:

C.S. I Dr. Ilia Gheorghe

Doctorand:

Pahomi Alexandru

TIMIȘOARA, 2024

CUPRINS

CUPRINS	1
LISTA LUCRĂRILOR	4
LISTA CONFERINTELOR	5
CONTRIBUȚII PROPRII	7
INTRODUCERE	8
CAPITOLUL 1. DATE DE LITERATURĂ	11
1.1. Materiale bioceramice	12
1.2. Clasificarea materialelor bioceramice în funcție de interacțiunea țesut-implant	12
1.2.1. Ceramice bioinerte	13
1.2.2. Ceramice poroase	14
1.2.3. Ceramice bioactive	15
1.2.4. Ceramice bioresorbabile	15
1.3. Clasificarea implanturilor în funcție de tipul de reacție cu țesutul	16
1.3.1. Implanturi cu efect toxic	16
1.3.2. Implanturi biocompatibile	17
1.3.3. Implanturi bioactive	17
1.3.4. Implanturi dizolvabile	18
1.4. Materiale bioceramice cu aplicații în domeniul medical	18
1.4.1. Alumina	18
1.4.2. Dioxidul de zirconiu	20
1.4.3. Sticla bioactivă	22
1.4.4. Hidroxiapatita	25
1.4.4.1. Generalități	25
1.4.4.2. Structura hidroxiapatitei	26
1.4.4.3. Proprietăți chimice ale hidroxiapatitei	28
1.4.4.4. Metode de sinteză	28
1.4.4.5. Utilizări ale hidroxiapatitelor	32
1.4.5. Diferite forme de fosfați calcici	32
1.4.6. Carbonul pirolitic	34
1.4.7. Compozite	34
1.5. Aplicații ale materialelor bioceramice	36
1.5.1. Aplicații în ortopedie	36
1.5.2. Aplicații dentare	38
1.5.3. Aplicații în ingineria țesuturilor dure	39
CAPITOLUL 2. CONTRIBUȚII PROPRII	41
2.1. SINTEZA DIFERITELOR TIPURI DE HIDROXIAPATITĂ, CARACTERIZAREA LOR ȘI MODIFICAREA PROPRIETĂȚILOR ACESTORA	42
2.1.1. Sinteza hidroxiapatitei prin co-precipitarea chimică	42
2.1.1.1. Modul de lucru	43
2.1.1.2. Rezultate și discuții	43
2.1.1.2.1. Analiza FT-IR a pulberilor sintetizate	43
2.1.1.2.2. Analiza termică a pulberilor sintetizate	45
2.1.1.2.3. Analiza XRD a pulberilor sintetizate	46
2.1.1.2.4. Analiza DLS a pulberilor sintetizate	48
2.1.1.3. Concluzii	50
2.1.2. Modificarea dimensiunii particulelor de hidroxiapatită prin tratamentul termic și dispersia în matricea polimerică	51
2.1.2.1. Materiale și metode	51

2.1.2.2.Rezultate și discuții	53
2.1.2.2.1.Caracterizarea probelor	53
2.1.2.2.1.1.Analiza FT-IR	53
2.1.2.2.1.2.Analiza XRD	55
2.1.2.2.1.3.Analiza termică	59
2.1.2.2.1.4.Analiza EDAX	61
2.1.2.2.2.Evaluarea parametrilor dimensionali	63
2.1.2.2.2.1.Analiza DLS	63
2.1.2.2.2.2.Analiza XRD	63
2.1.2.2.2.3.Analiza SEM	64
2.1.2.3.Concluzii	66
2.1.3.Sinteza și caracterizarea hidroxiapatitei dopată cu un metal	68
2.1.3.1.Materiale și metode	70
2.1.3.2.Rezultate și discuții	71
2.1.3.2.1.Analiza FT-IR	71
2.1.3.2.2.Analiza termică	73
2.1.3.2.3.Analiza EDAX	75
2.1.3.2.4.Analiza ICP-OES	76
2.1.3.2.5.Analiza XRD	76
2.1.3.2.6.Analiza SEM	77
2.1.3.3.Concluzii	78
2.1.4.Sinteza și caracterizarea unor precursori de hidroxiapatită dopați cu două elemente	80
2.1.4.1.Modul de lucru	80
2.1.4.2.Rezultate și discuții	82
2.1.4.2.1.Analiza FT-IR a precursorilor	82
2.1.4.2.2.Analiza termică a precursorilor	84
2.1.4.2.3.Analiza EDAX a precursorilor	85
2.1.4.2.4.Analiza ICP-OES a precursorilor	87
2.1.4.3.Concluzii	87
2.2.OBTINEREA DIFERITELOR MATERIALE PE BAZĂ DE HIDROXIAPATITĂ	88
2.2.1.Încorporarea unui compus bifazic format din β-fosfat tricalcic/hidroxiapatită în matrice de chitosan și alginat	88
2.2.1.1.Modul de lucru	89
2.2.1.2.Rezultate și discuții	90
2.2.1.2.1.Analiza FT-IR a probelor	90
2.2.1.2.2.Analiza termică a probelor	93
2.2.1.2.3.Analiza SEM a probelor	96
2.2.1.3.Concluzii	99
2.2.2.Compozite polimerice dentare care conțin antibiotice, bifosfonați și hidroxiapatită pentru posibilă utilizare a acestora în ingineria tisulară	100
2.2.2.1.Materiale și metode	102
2.2.2.2.Rezultate și discuții	105
2.2.2.2.1.Analiza FT-IR a substanțelor active	105
2.2.2.2.2.Spectrele FT-IR a substanțelor active în matricele de polimer	107
2.2.2.2.2.1.Substanța activă încorporată în matricea de alginat	108
2.2.2.2.2.2.Substanța activă încorporată în matricea de kappa-caragenan	109
2.2.2.2.2.3.Substanța activă încorporată în matricea de chitosan	110
2.2.2.2.3.Spectrele FT-IR a amestecurilor ternare	112
2.2.2.2.4.Spectrele FT-IR a amestecurilor cuaternare	113

2.2.2.2.5. Analiza termică	115
2.2.2.2.6. Analiza UV-Viz a materialelor dentare finale	117
2.2.2.2.7. Analiza SEM/EDAX	119
2.2.2.2.8. Testarea <i>in vivo</i> a citotoxicității	123
2.2.2.3. Concluzii	125
CONCLUZII GENERALE	127
LISTA FIGURILOR	137
LISTA TABELELOR	141
BIBLIOGRAFIE	142
ANEXA 1. ARTICOLE PUBLICATE	163
ANEXA 2. ACORDURI DE UTILIZARE PENTRU MATERIALELE PRELuate ȘI REPRODUSE	191

CUVINTE CHEIE: Hidroxiapatită, Bioceramici, Implant, Hidroxiapatită Dopată, Bioactivitate, Matrice Polimerică, Inginerie Tisulară, Compozite

În prima parte a tezei s-au expus unele aspecte cu privire la tipul bioceramicilor și aplicațiile acestora în domeniul medical. Datorită condițiilor necesare pe care trebuie să le îndeplinească pentru a putea fi utilizate în ingineria tisulară, s-a exemplificat o clasificare a acestora în funcție de proprietățile necesare și importanța acestor proprietăți.

Partea a doua a tezei, a contribuțiilor proprii, este structurată în două subcapitole diferite. Primul subcapitol fiind axat pe studiul proprietăților hidroxiapatitei sintetizate folosind metode simple și avantajoase din punct de vedere economic și caracterizarea compușilor sintetizați. Caracterizarea s-a făcut pentru precursori de hidroxiapatită, hidroxiapatită sintetizată prin metoda de co-precipitare chimică, precursori și hidroxiapatită dopată cu unul sau două metale și evaluarea evoluției dimensiunii particulelor sintetizate folosind polimeri ca mediu de dispersie a reactivilor și aplicând tratament termic.

În cel de al doilea subcapitol, studiul compușilor sintetizați pentru aplicații în regenerarea osoasă s-a axat pe compuși care conțin o matrice polimerică, cu proprietăți avantajoase refacerii osoase, și un compus bifazic format din β -TCP/HA, care facilitează regenerarea țesutului osos.

În final, prin combinarea tehnicilor analitice fizico-chimice, s-a încercat stabilirea celui mai bun material de grefare osoasă sintetizat care poate fi folosit pentru eliberarea ingredientelor active, analizate individual și sub formă de amestec. Materialele sintetizate conțin bio-os, antibiotice, bifosfonat și polimer și au avantajul tratamentului local, prevenirii unei infecții și facilitarea reconstrucției osoase cu avantajele unei administrări locale a unei cantități minime de substanță activă.

1. Sinteza diferitelor tipuri de hidroxiapatită, caracterizarea lor și modificarea proprietăților acestora

S-a studiat sinteza și caracterizarea hidroxiapatitei obținute prin metoda co-precipitării, urmată de modificarea parametrilor dimensionali ai particulelor asistată de polimeri și prin aplicarea unui tratament termic. De asemenea, s-au efectuat studii asupra sintezei și caracterizării precursorilor de hidroxiapatită dopați cu unul sau două metale.

1.1. Sinteza hidroxiapatitei prin co-precipitarea chimică

Scopul acestui studiu este de a caracteriza produsul de sinteză obținut prin aplicarea metodei de co-precipitare pentru a obține hidroxiapatită. Protocolul de lucru s-a bazat pe folosirea azotatului de calciu ca și sursă de calciu, iar pentru cele trei protocoale de lucru aplicate substanța care asigură sursa de fosfor a fost modificată.

Structura fizică și proprietățile chimice ale pudrelor obținute sunt studiate folosind analiza termogravimetrică (TG), difracția de raze X (XRD), spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) și împrăștierea dinamică a luminii (DLS).

Analiza spectrelor FT-IR pentru probele uscate la 120 °C reușește identificarea benzilor caracteristice precursorilor de hidroxiapatită și celor provenite din partea reactivilor utilizați sau de la absorbția dioxidului de carbon din atmosferă. După tratarea termică a probelor la 1000 °C timp de 12 ore s-a observat dispariția unor benzi. Pentru probele HA (S1) și HA (S2), s-a observat o bandă ascuțită la 3570 cm^{-1} care s-a menținut după tratarea termică, această bandă

fiind dată de vibrația de valență a HO^- caracteristică hidroxiapatitei. De asemenea, pentru proba HA (S2), banda la 633 cm^{-1} s-a observat bine definită, provenită de la vibrația de rețea a grupării HO^- . În schimb, spectrul probei HA (S3) a sugerat formarea unui fosfat de calciu diferit de hidroxiapatită.

Analiza termogravimetrică a arătat comportarea la descompunere a probelor analizate în intervalul de temperatură $30\text{-}900 \text{ }^\circ\text{C}$. S-a observat un pic ascuțit, mai proeminent, care caracterizează un proces endotermic la $770 \text{ }^\circ\text{C}$, acompaniat de o pierdere de masă de 1%, posibil datorat descompunerii hidroxiapatitei nestoichiometrice în $\beta\text{-TCP}$ și apă.

Cu ajutorul analizei XRD, două faze sunt identificate în spectrul de difracție a probelor calcinate HA (S1) și HA (S2), compoziția celor două probe indicând obținerea la calcinare a unui amestec de hidroxiapatită și $\beta\text{-TCP}$. Pentru proba HA (S3) s-a observat obținerea unei singure faze, $\beta\text{-TCP}$. Pe lângă acestea, s-a mai observat modificarea cristalinității probelor și creșterea dimensiunii cristalelor în toate probele.

Indicele de polidiversitate (PDI) determinat cu ajutorul analizei DLS pentru probele uscate la $120 \text{ }^\circ\text{C}$ arată o polidiversitate medie a probelor. Excepție făcând proba HA (S1), care are o valoare a indicelui mai ridicată, indicând prezența aglomeratelor de particule în probă. Tratamentul termic aplicat probelor duce la creșterea valorii indicelui de polidiversitate, arătând că în suspensie mai multe aglomerate se formează. Dimensiunea medie a particulelor determinată pentru probele uscate la $120 \text{ }^\circ\text{C}$ variază între $2,1 \text{ }\mu\text{m}$ pentru HA (S2) și $2,7 \text{ }\mu\text{m}$ pentru HA (S1). Pentru HA (S3) s-a observat o dimensiune a particulelor de $3,4 \text{ }\mu\text{m}$. După aplicarea tratamentului termic, unele probele prezintă o scădere a dimensiunii particulelor de aproape 50% față de dimensiunea inițială.

S-a dovedit că metoda de co-precipitare chimică este o metodă simplă de sinteză, dar este puternic influențată de parametrii de sinteză, cum ar fi temperatura, timpul de reacție, tratamentul termic, pH-ul și tipul de reactivi utilizați.

1.2. Modificarea dimensiunii particulelor de hidroxiapatită prin tratamentul termic și dispersia în matricea polimerică

În acest studiu, soluții la diferite concentrații de chitosan și alginat de sodiu au fost utilizate ca mediu de nucleare pentru particulele de HA. Soluțiile de precursor de calciu și fosfat au fost mai întâi ajustate la un pH de 12 și adăugate la soluția de polimer cu o concentrație variind la 5% și 10 %, raportată la masa stoichiometrică de HA sintetizată conform reacției de sinteză prezentate. După sinteză, o cantitate din pulberea rezultată a fost calcinată la $1000 \text{ }^\circ\text{C}$. Comparativ s-au studiat proprietățile particulelor obținute inițial și după calcinare, folosind produsul de sinteză inițial și produsul obținut în urma dispersiei în matricea polimerică. Efectele pe care polimerii le au asupra proprietăților fizico-chimice ale particulelor de HA au fost monitorizate prin intermediul SEM, FT-IR, EDAX, DLS, XRD și TG, înainte și după tratamentul termic al particulelor pentru a urmări modificarea proprietăților.

În primă fază, s-a realizat caracterizarea produșilor obținuți cu ajutorul spectroscopiei FT-IR, analizei termice, XRD și EDAX. Apoi, cu ajutorul tehnicilor XRD, DLS și SEM, s-au prezentat parametrii dimensionali și s-a evidențiat influența tratamentului termic asupra dimensiunii particulelor.

Pentru caracterizarea particulelor, spectrele FT-IR au fost comparate cu substanțele pure componente: hidroxiapatită comercială cu dimensiunea particulelor de 5 μm , alginatul de sodiu și chitosanul. S-a realizat caracterizarea spectrelor FT-IR a substanțelor pure, iar apoi s-au comparat benzile caracteristice atribuite cu cele din spectrele probelor care conțin alginat și chitosan, înainte și după calcinare.

S-a observat că prezența hidroxiapatitei în soluțiile de polimeri duce la interacțiuni între cele două substanțe în cazul probelor uscate la 120 °C. În primul rând, s-a observat faptul că benzile caracteristice hidroxiapatitei sunt predominante, cele caracteristice polimerilor fiind predominant acoperite. În al doilea rând, s-a observat scăderea în intensitate a benzii de la 1593 cm^{-1} , caracteristice alungirii legăturii C=O din alginat, și dispariția benzii de la 1325 cm^{-1} , caracteristice alungirii legăturii C-N din chitosan. După calcinare, s-a observat dispariția completă ale benzilor caracteristice polimerilor în toate probele analizate. De asemenea, în probele care conțin alginat s-au observat benzile caracteristice grupării HO^- și grupării fosfat, bine evidențiate. În schimb, în spectrele probelor care conțin chitosan, nu s-au observat benzile caracteristice hidroxiapatitei cristaline și apar alte trei benzi la 1222, 970 și 728 cm^{-1} , pe lângă cele caracteristice grupării fosfat.

Analiza XRD a arătat formarea hidroxiapatitei cu cristalinitate scăzută în cazul probelor uscate la 120 °C. În urma tratamentului termic forma picurilor s-a modificat și s-au identificat fazele care se găsesc în produsul calcinat folosind metoda Rietveld. Vizibil, s-a observat că intensitățile caracteristice hidroxiapatitei se regăsesc integral în reprezentarea grafică a picurilor probelor care conțin alginat. Probele care conțin alginat, au dus la formarea unei cantități mai mari de hidroxiapatită în urma calcinării, iar prezența chitosanului a dus la formarea de β -fosfat tricalcic ca fază predominantă în probe.

Analiza termică a verificat comportarea probelor în urma aplicării tratamentului termic și influența polimerilor asupra acesteia. Curbele termogravimetrice sunt asemănătoare curbei probei HA 120 °C, diferențele de procente din pierderea de masă fiind cauzate de către masa adăugată de polimer. În cazul probelor care conțin chitosan, pierderea de masă apare în două etape diferite. O comportare diferită și mai complexă s-a observat în cazul probelor care conțin alginat. În intervalul de temperatură 750-800 °C, pentru probele HA, HA+ Chit 5% și HA+ Chit 10%, s-a observat un proces exotermic cu o pierdere de masă de aproximativ 1%.

Rezultatele analizei termice sunt corelate cu observațiile făcute în urma analizei FT-IR și analizei XRD. S-a observat formarea hidroxiapatitei cristaline în probele care conțineau alginat și prezența unor impurități sau formarea unor alții compuși decât cei așteptați în urma tratamentului termic.

În urma analizei EDAX, s-a urmărit conținutul de Ca și P din probele analizate și modificările cantitative care apar în urma tratamentului termic. Astfel, putându-se face o idee asupra substanței posibile prezente în proba analizată, în funcție de raportul Ca/P, care față de hidroxiapatita stoichiometrică, este cuprins în intervalul 1,658-1,824. Rapoartele rezultate în urma calcinării arată o scădere a raportului Ca/P pentru toate probele. În cazul probei HA+ Alg 5%, s-a obținut cea mai apropiată valoare a raportului de 1,667, lucru care indică obținerea unei hidroxiapatite cât mai pure. De asemenea, se evidențiază proba HA+ Chit 10% care are raportul Ca/P= 1,577, raport apropiat de raportul Ca/P prezent în β -TCP de 1,5.

Spectroscopia FT-IR și analiza termogravimetrică au oferit informații asupra compușilor sintetizați și posibilitatea prezenței unor alte substanțe față de cele dorite, sub formă de impuritate, în probele analizate. Analiza XRD a identificat cu succes fazele prezente în probe, iar analiza EDAX a venit cu completări asupra celor observate.

Apoi, folosind metodele de analiză disponibile (XRD, DLS și SEM), s-au centralizat datele oferite de către aceste metode, pentru probele uscate la 120 °C și calcinate la 1000 °C, cu scopul de a face observații asupra modificării dimensiunii particulelor apărute în urma tratamentului termic a probelor.

În cazul analizei DLS, s-a observat o scădere a diametrului mediu al particulelor în cazul tuturor probelor. Cea mai semnificativă fiind în cazul probei HA+ Alg 10%, unde s-a observat o scădere în diametrul mediu al particulelor de 67,7% în urma tratamentului termic. Totodată, s-a observat că adaosul de polimer în concentrații mici duce la scăderea dimensiunii particulelor de până la 50%.

Dintre parametrii identificați în urma analizei XRD pentru probele uscate la 120 °C s-a observat că dimensiunea cristalelor obținute în urma sintezei este asemănătoare. Excepție face proba HA+ Alg 10%, unde dimensiunea cristalelor este mai mare față de restul probelor. Prin aplicarea tratamentului termic, fazele prezente în probe își modifică parametrii dimensional și dimensiunea cristalelor se mărește semnificativ.

Imaginile SEM ale probelor oferă o perspectivă asupra formei particulelor și distribuției acestora în probele analizate. S-a observat în toate probele prezența aglomeratelor, cu dimensiuni cuprinse între 100 și 150 μm. Pe lângă acestea, s-au distins particule de dimensiuni mai mici, între 10 și 25 μm, dar nu se observă o formă bine definită a acestora pentru probele analizate. Cele mai mari dimensiuni ale aglomeratelor fiind găsite în proba HA+ Chit 10%. În urma tratamentului termic, morfologia probelor s-a modificat și mare parte din aglomerate au dispărut, rezultând o scădere a dimensiunilor particulelor prezente în probă. La o magnificare de x1000 se disting pori bine definiți pe suprafața particulelor cu dimensiuni mai mici de 1 μm.

1.3. Sinteza și caracterizarea hidroxiapatitei dopată cu un metal

Acest studiu și-a propus caracterizarea hidroxiapatitei dopate cu diferite metale și influența acestora asupra stabilității termice și proprietăților diferite pe care acestea le conferă, rezultând o arie largă de aplicații medicale în urma dopajului. Reactivii folosiți în acest studiu sunt acetatul de calciu, fosfatul de trimetil și diferite săruri ale unor metale. Aceștia au fost folosiți pentru a obține hidroxiapatite dopate cu proprietăți termice, mecanice și biologice îmbunătățite. De asemenea, sonicarea probelor a fost aplicată. Pentru a verifica influența acestora o serie de tehnici au fost folosite.

Spectrele FT-IR s-au obținut pentru toate probele înainte și după degradarea termică la 300 °C și 500 °C în intervalul 4000-650 cm⁻¹. Pentru precursorii hidroxiapatitei dopate cu Ag (**d**) și Zr (**a**), spectrele FT-IR au arătat câteva diferențe. Apa de cristalizare s-a observat mai clar și într-o cantitate mai mare și observându-se o bandă mai pronunțată la 1608 cm⁻¹ pentru cele două probe. S-a observat totodată, la probele degradate termic la 300 °C și 500 °C, dispariția benzii de la 1144 cm⁻¹, bandă asociată ionilor de fosfat. În spectrele FT-IR obținute

pentru probele tratate la 1000 °C s-a observat banda ascuțită la 3640 cm⁻¹, bandă provenită de la vibrația de alungi a grupării HO⁻, care indică formarea hidroxiapatitei cristaline.

Datele termoanalitice au fost obținute în intervalul de temperatură 30-550 °C, în atmosferă de aer sintetic cu creșterea de temperatură de 10 °C/min. În toate cazurile, deshidratarea și pierderea apei de cristalizare apar ca etape dificil de distins în curbele TG și DTG. Pentru toate probele, patru sau cinci procese de descompunere s-au observat cu pierderi de masă de până la 12 % în cazul probelor **c**, **d**, **e**, **f** și **g**, în intervalul de temperatură 290-300 °C, celelalte pierderi de masă la temperaturi mai scăzute sunt sub 3%. Procesul de descompunere a componentei organice începe, pentru toate probele, după 300 °C.

Procesul de descompunere puternic exotermic începe la cea mai mică temperatură în cazul probei cu Ag -**d** (305 °C), urmată de proba cu K -**g**. Pentru celelalte probe, descompunerea începe în intervalul 300-350 °C și sunt de asemenea însoțite de procese exotermice puternice. Cea mai mare pierdere de masă, în tot intervalul de temperatură studiat, este observată în cazul probei cu Al, care conține de asemenea și cea mai mare cantitate de apă.

Analiza EDAX a fost efectuată pentru a demonstra sinteza precursorilor dopați cu diferite metale, probele fiind pregătite prin tratarea termică a acestora timp de 30 de minute la 600 °C. Rezultatele au arătat clar prezența metalelor adăugate la doparea hidroxiapatitei, pe lângă metale se poate observa de asemenea prezența C și O, lucru care susține rezultatele obținute în urma analizei FT-IR și termice.

Din analiza ICP-OES se observă faptul că Ca este cel mai abundent în proba **a**, unde cantitatea de dopant este mai mică (Zr). O cantitate mai mare de Ca și material dopant se întâlnește la proba **d**. Se observă că Ag este metalul care este dopat în cantități mai mari în hidroxiapatită. Acest lucru a dus la o structură fragilă și mai instabilă termic, lucru observat în cazul analizei termice pentru proba **d**. Proba dopată cu Ag suferă un proces de topire la temperaturi de peste 600 °C. O cantitate mare de metal dopant reținut de hidroxiapatită se observă în cazul probei cu K (**g**). Metale precum Cd și Ba sunt reținute în procente de 2,5-2,8% în structura hidroxiapatitei. S-a observat că Al este reținut doar 1,89%, dar înlocuiește cel mai mult calciul în structura hidroxiapatitei.

Analiza XRD a identificat în toate probele picurile caracteristice hidroxiapatitei, dar pe lângă acestea s-au mai observat și picuri pentru Ca(OH)₂ și pentru CaO.

Pentru pulberile netratate termic, utilizând analiza SEM s-a observat că particulele prezintă mai multe dimensiuni și forme care variază, ca dimensiune, de la 100 μm la 500 μm. S-au observat în principal aglomerate, dar la o privire mai atentă, în unele probe, s-a observat formarea acestor aglomerate din particule cu formă de tijă. În cazul precursorilor dopați cu Ag și Sb s-a observat o distribuție mai uniformă a particulelor, particule care au dimensiuni între 10 și 50 μm. La o magnificare de x400 a pulberilor tratate termic la 900 °C s-a observat o microstructură rugoasă și poroasă în cazul tuturor probelor. În cazul pulberilor dopate cu Sb și K s-au format pori cu diametrul de 3-5 μm după tratamentul termic și se pot observa particule sub formă de plăci.

1.4. Sinteza și caracterizarea unor precursori de hidroxiapatită dopați cu două elemente

În studiul acesta este prezentată o metodă neconvențională pentru sinteza hidroxiapatitei: o serie de HA dopate simultan cu doi cationi și preparate în câmp ultrasonic. S-a discutat efectul tratamentului termic și caracteristicile fizico-chimice ale precursorilor obținuți.

Analiza comparativă a spectrelor FT-IR efectuate în intervalul 4000-650 cm^{-1} pentru probele uscate a arătat mici diferențe în intervalul 3600-2900 cm^{-1} și intervalul 1250-1050 cm^{-1} (în cazul probelor de la **a** la **e**). S-a observat un conținut de umiditate scăzută pentru probele **a** și **d**. Spectrele FT-IR, după degradarea termică la 300 °C și 550 °C, prezintă o bandă mai largă în jurul regiunii de 1000 cm^{-1} . Pentru probele tratate termic la 550 °C, spectrele FT-IR au prezentat benzi similare, cu mici diferențe în cazul probei **e**, și s-a observat menținerea benzii caracteristice grupării carbonat la 1407 cm^{-1} . S-a observat de asemenea lipsa reziduurilor provenite de la compușii organici.

Curbele termogravimetrice obținute în atmosferă de aer până la temperatura de 500 °C prezintă un comportament termic similar, excepție făcând proba **a**. În cazul probei **a**, o pierdere de masă continuă în intervalul de temperatură 30-300 °C este observată, asociată cu cinci procese de descompunere dificil de separat. În cazul celorlalte probe s-au observat doar patru procese de descompunere cu pierderi de masă asemănătoare. Pierderea de masă pentru proba **a** în intervalul 380-390 °C este de aproape 25 %, spre deosebire de pierderea de masă observată la celelalte probe în același interval de temperatură, între 11 și 19%. Descompunerea termică care apare în intervalul de temperatură 310-350 °C este acompaniată în toate cazurile de un proces puternic exotermic la care maximul de temperatură diferă de la o probă la alta. Cele mai instabile probe din punct de vedere termic sunt probele **g**, **e**, **b**, **f**, urmate de probele **d**, **c** și cea mai stabilă fiind proba **a**.

Pentru a pune în evidență sinteza precursorilor dopați cu metale diferite, studiul probelor folosind spectroscopia de raze X cu dispersie de energie (EDAX) a fost utilizat. Pentru a efectua analiza EDAX a probelor, probele au fost tratate termic timp de 30 de minute la 600 °C. Astfel s-a verificat dacă metalele folosite adițional se găsesc în precursorii sintetizați.

Pentru a verifica rezultatele prezentate în urma analizei EDAX, dozarea cantitativă a metalelor adăugate ca dopant în compoziția precursorilor studiați a fost efectuată. Rezultatele au confirmat prezența în probele tratate termic la 900 °C a metalelor adăugate ca dopanți împreună cu Zr și s-a observat o concentrație mai ridicată de Cd și Ni în probele analizate, față de restul.

În urma acestui studiu a fost publicată lucrarea: **Alexandru Pahomi**, Gabriela Vlase, Alexandra Toma, Gheorghe Ilia, Violeta Turcuș, Nicolae Doca și Titus Vlase, *Synthesis, thermal behavior and FTIR study of some hydroxyapatite precursors doped with two metals*, J. Therm. Anal. Calorim., vol. 138, no. 3, pp. 2175–2183, 2019, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08550-9>

2. Obținerea diferitelor materiale pe bază de hidroxiapatită

2.1. Încorporarea unui compus bifazic format din β -fosfat tricalcic/ hidroxiapatită în matrice de chitosan și alginat

Studiul a condus la obținerea de matrice foarte poroase care conțin fosfați de calciu bifazici. Particularitatea acestui tip de matrice obținute este dată de dimensiunea mare a porilor în comparație cu matricele similare prezentate în literatură. Dimensiunea porilor și interconectivitatea straturilor le face potrivite pentru utilizarea în regenerarea țesutului osos, punând accent pe efectul osteogen. Adăugarea compozitului bifazic, care conține β -TCP și hidroxiapatită, oferă proprietăți îmbunătățite materialelor obținute. Pulberea HA (S2), sintetizată și caracterizată în Capitolul 2.1.1, a fost aleasă pentru a fi dispersată în matricele de chitosan și alginat datorită conținutului de hidroxiapatită (45,04 %).

În primă fază, s-au identificat benzile caracteristice chitosanului și alginatului în spectrele FT-IR obținute. Aceste rezultate au fost comparate cu spectrele matricelor care conțin faza polimerică și pulberea HA (S2). Spectrele FT-IR a matricelor de chitosan prezintă benzile caracteristice moleculelor de bază utilizate în preparare, iar benzile corespunzătoare chitosanului și materialului bifazic se suprapun. S-a observat absența benzii de la 1706 cm^{-1} în spectrele matricelor de chitosan care conțin HA (S2) tratate cu NaOH, lucru care a indicat neutralizarea în totalitate a acidului acetic utilizat în prepararea soluției de chitosan. Spectrele FT-IR ale matricelor cu alginat sunt comparabile cu cel al alginatului pur. Interacțiunea dintre cationii de Ca^{2+} cu grupările carboxil s-a observa în spectrul FT-IR prin modificarea numărului de undă la valori mai mici a benzilor caracteristice vibrației de alungire simetrice și asimetrice a legăturii C=O.

Rezultatele analizei termogravimetrice (TG) indică comportarea termică a polimerilor testați sub formă de pudră și matrice. Matricele de chitosan prezintă etape de descompunere similare cu chitosanul sub formă de pudră, iar matricele netratate prezintă un al treilea pic exoterm în intervalul de temperatură $110\text{-}200\text{ }^\circ\text{C}$ caracterizat de o pierdere de masă adițională de 8% în cazul probei CS netratat și o pierdere de 3% în cazul probei CS-HA (S2) netratat. Pentru matricele fără componenta bifazică, tratarea cu NaOH pare să scadă stabilitatea termică a matricei prin modificarea maximului procesului de degradare de la $300\text{ }^\circ\text{C}$ la $250\text{ }^\circ\text{C}$. Comportarea termică a alginatului de sodiu și a matricelor arată că pierderile de masă au loc în trei etape. În cazul matricei de alginat netratată a doua etapă de descompunere prezintă un pic exoterm adițional care apare în intervalul $150\text{-}210\text{ }^\circ\text{C}$ asociat cu apa captată în porii matricei. După tratarea probelor cu CaCl_2 sau după dispersia fosfatului de calciu bifazic, probele prezintă un proces de descompunere adițional în intervalul $600\text{-}850\text{ }^\circ\text{C}$.

Morfologia matricelor a fost investigată folosind microscopia electronică de baleiaj (SEM). Morfologia în secțiune transversală a matricelor de chitosan arată că microstructura poroasă tridimensională este obținută prin etapa de liofilizare, porii fiind rezultatul formării cristalelor de gheață. O microstructură cu pori deschiși și cu un grad ridicat de interconectivitate este observată în cazul tuturor probelor. Proba de chitosan care nu a fost tratată cu NaOH prezintă o suprafață netedă, în timp ce după tratarea cu NaOH suprafața devine mai rugoasă, iar straturile interconectate sunt mai compacte. După tratarea cu NaOH a matricei care conține HA (S2), microstructura își păstrează interconectivitatea, dar devine vizibil mai compactă față de microstructura inițială. S-au obținut porii vizibili care au un diametru între $40\text{-}60\text{ }\mu\text{m}$, iar distanța dintre straturi este de aproximativ $300\text{ }\mu\text{m}$. O microstructură similară cu matricele de chitosan este observată la matricele de alginat. Microstructura de alginat prezintă mai mulți pori individuali cu diametrul de 100 până la $200\text{ }\mu\text{m}$ după liofilizare. S-a observat că reticularea cu CaCl_2 rearanjează microstructura și distanța dintre straturile interconectate crește de la 200 până la $500\text{-}700\text{ }\mu\text{m}$. După tratamentul matricei de alginat care conține HA (S2) cu CaCl_2 ,

s-a observat o microstructură mai compactă și mai stratificată, cu o distanță medie între straturi de aproximativ 100 μm .

Caracterizarea microstructurii a indicat posibilitatea utilizării matricelor pentru ingineria țesutului osos datorită prezenței microporilor care pot asigura infiltrarea, legarea și proliferarea celulelor.

2.2. Compozite polimerice dentare care conțin antibiotice, bifosonați și hidroxiapatită pentru posibila utilizare a acestora în ingineria tisulară

Scopul acestui studiu a fost de a obține noi variante de grefe osoase, sintetice și provenite din surse animale, acoperite cu diferiți polimeri, conținând antibiotice (ampicilină și oxacilină) și alendronat. Validarea materialelor obținute a constat în testarea amestecurilor care nu prezintă interacțiunii între componente. Prin combinarea tehnicilor fizico-chimice complementare: TG/DTG/HF, FTIR-UATR, UV-Viz, SEM-EDAX, s-a încercat stabilirea celui mai bun material de grefare osoasă care poate fi folosit pentru eliberarea ingredientelor active analizate individual și sub formă de amestec.

În primă fază, s-a efectuat analiza FT-IR a substanțelor active, antibioticele (Ampi și Oxa) și bifosfonatului (Alen), în forma pură pentru a obține informații care pot fi utilizate pentru analiza amestecurilor binare. Conform metodei de sinteze folosite pentru a prepara soluțiile de polimer și încercarea de a încorpora antibioticele, s-a presupus că substanțele active sunt prezente în compusul obținut, iar analiza FT-IR a fost utilizată pentru a obține un răspuns pozitiv asupra prezenței fizice sau a absenței lor în matricea polimerică. S-a efectuat caracterizarea spectrelor FT-IR pentru amestecurile dintre substanțele active și polimerii. Apariția benzilor caracteristice pentru substanțele active în spectrele amestecurilor binare au confirmat prezența substanțelor acestora în cazul celor trei polimeri folosiți.

Spectrele amestecurilor ternare au fost comparate cu spectrele substanțelor active individuale și cu spectrele amestecurilor binare, care conțin antibiotic și bifosfonat, pentru a determina integritatea substanțelor active prezente în amestec. În cazul amestecurilor ternare, benzi mai puțin distincte a substanțelor active s-au observat datorită influenței polimerului și cantității de substanță activă mult mai mici.

Studiul FT-IR a amestecurilor cuaternare a fost efectuat cu scopul de a pune în evidență influența părții osoase, BON sau BOS, din amestecuri. S-a observat în toate cazurile că materialul osos nu afectează spectrele amestecurilor. De asemenea, în aceste spectre s-a presupus că chitosanul va prezenta interacțiuni cu ambele substanțe active conform observațiilor anterioare.

Potrivit studiului FT-IR a amestecurilor obținute, s-a observat că în amestecurile binare studiate nu apar interacțiuni. În amestecurile ternare și cuaternare, interacțiunile dintre chitosan și cele două antibiotice au fost evidente, interacțiuni care apar doar în prezența umidității introduse odată cu polimerul în etapa de prepararea a amestecurilor finale.

Analiza termică a fost efectuată doar în cazul amestecurilor binare pentru a determina posibile interacțiuni între componentele active și polimeri. Rezultate obținute pentru degradarea termică a antibioticelor sunt confirmate de sursele din literatura de specialitate.

Analizând termogramele amestecurilor binare cu alginat, chitosan și kappa-caragenan, s-a observat faptul că includerea ampicilinei în amestec duce la descompunerea acesteia la temperaturi mai joase a probelor. În cazul amestecului binar cu alginat, efectele termice care apar în timpul descompunerii substanței active se diferențiază, dar la temperaturi mai ridicate față de substanța pură. Introducerea alendronatului în amestec duce la modificarea punctului de topire a acestuia spre temperaturi mai mici.

Analiza UV-Viz a validat prezența substanțelor active în compozitele analizate. Pentru a putea confirma prezența substanțelor active în materialul testat prin metoda UV-Viz, probe de control, soluții de antibiotic, au fost preparate. În cazul oxacilinei, maximul de absorbție la 270 nm se găsește la aceeași intensitate sau la intensități puțin mai mici în cazul materialelor pe bază de kappa-caragenan și alginat care conțin BON și BOS. Acest lucru nu se poate spune despre materialele ce conțin chitosan ca polimer. În cazul materialelor bazate pe chitosan, maximul de absorbție este mai puțin intens, lucru care susține ideea unei interacțiuni între chitosan și oxacilină.

Studiul materialelor finale prin analiza SEM/EDAX începe cu studierea celor două opțiuni de materiale folosite curent în stomatologie, materialul sintetic BON și materialul natural BOS. În cazul materialului natural BON, particule de diferite dimensiuni s-au observat, iar în cazul materialului sintetic BOS, particulele au dimensiuni apropiate. Analiza EDAX a pus în evidență compoziția diferită a celor două materiale.

Comparând analizele SEM a materialelor finale, s-a observat că materialele care conțin BOS sunt mult mai omogene și că există diferențe morfologice între acestea. Materialele care conțin chitosan ca și polimer au un aspect complet diferit, raportat la omogenitate și cristalizarea substanțelor active.

Pentru testul de citotoxicitate s-a folosit linia de celule MCF7 și testul a fost raportat la rata de inhibiție cauzată liniei de celule de către materialele testate. Materialele validate în urma analizelor fizico-chimie și folosite în acest test sunt: Oxa_Alen_Car (1), Ampi_Alen_Car (2), Oxa_Alen_Alg (3), Ampi_Alen_Alg (4). BON și BOS au fost excluse datorită problemelor de solubilizare. BON și BOS sunt materiale care au citotoxicitatea studiată și sunt folosite actual în practica dentară. S-au preparat diluții în serie pentru fiecare compus studiat, iar concentrațiile finale testate au fost: C1-1%, C2-0,500%, C3-0,250%, C4-0,125%, C5-0,0625% și C6-0,03125%.

În cazul celulelor expuse la concentrația C1, compusul (1) a determinat o inhibiție moderată a proliferării celulelor, cu mici variațiuni în funcție de timpul de expunere. Compusului (2) a dus la creșterea ratei de inhibiție la concentrația de 1% în cazul tuturor timpilor de incubare. Pentru compusul (3), s-a observat o scădere a ratei de inhibiție în funcție de timpul de expunere când a fost incubat la concentrații între C1-C3. La expunerea timp de 24 de ore, cea mai mare rată de inhibiție a fost observată la concentrația C6. Pentru concentrația C4 și C5 valorile ratei de inhibiție sunt sub 6% la 24 de ore, iar la timpuri mai îndelungate s-a observat proliferarea celulelor. Expunerea celulelor MCF7 la compusul (4) a dus la reducerea semnificativă a creșterii celulelor.

Cea mai mare rată de inhibiție a fost observată în cazul concentrației C1 pentru toți compușii testați. Celelalte concentrații au determinat o inhibiție moderată în proliferarea celulară. În schimb, la câteva concentrații, s-a observat o stimulare a procesului de proliferare.

Compușii (1) și (4) s-au dovedit a fi biocompatibili la concentrații între 0,5% și 0,03125% pentru o perioadă de incubare mai lungă, 48 și 72 de ore. Cea mai mare rată de proliferare s-a observat la o concentrație de 0,25% la ambii compuși.

În urma acestui studiu a fost publicată lucrarea: Mihaela- Maria Budiul, Gabriela Vlase, Daniel Negru, Dorinel Okolišan, Ionela- Amalia Bradu, Alexandra Tășală, **Alexandru Pahomi**, Titus Vlase, Daniela Jumanca, Atena Galuscan, Paula Sfirloaga, Nicoleta Carabă, Roxana Popescu și Anamaria Matichescu, *Dental biopolymer composites with antibiotics, bisphosphonate, and hydroxyapatite for possible use in bone tissue regeneration*, J. Chem., ID articol: 6614044, 2024, doi: <https://doi.org/10.1155/2024/6614044>