

UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI BIOTEHNOLOGII

**MATERIALE DE ADIȚIE OSOASĂ UTILIZATE ÎN
STOMATOLOGIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCATORUL DE DOCTORAT,

Prof. Dr. Ing. Ecaterina Andronescu

DOCTORAND,

Cristina Rodica Dumitrescu

București,

2022

Teza de doctorat contine:

Numar de pagini: 192

Numar de figuri: 93

Numar de tabele: 33

Numar de referinte bibliografice: 247

CUVINTE CHEIE

Biocompozite de adiție osoasă, nano-pulbere mezoporoasă de hidroxiapatită, pulberi de niobati de sodiu si potasiu, chitosan, metoda de liofilizare, maturare hidrotermala asistata de microunde, augmentare osoasă

CUPRINS

PARTEA I	8
STUDIUL CRITIC AL DATELOR DE LITERATURA	8
CAPITOLUL 1	8
1.1 Introducere în tematica de studiu	8
1.2 Noțiuni despre anatomia țesutului osos la nivelul cavităților alveolare	10
1.2.1 Matricea osoasa și componenta celulara	10
1.2.2 Noțiuni despre anatomia țesutului osos la nivelul dinților	13
1.3 Osificare și osteogeneza	14
1.4 Mecanisme biologice implicate în refacerea osoasa	15
1.5 Mecanisme biologice la refacerea osoasa în prezenta unei grefe osoase	17
1.5.1 Adeziune celulară	18
1.5.2 Morfologie și motilitate celulară	18
1.5.3 Proliferarea și diferențierea celulară	18
1.5.4 Adsorbția proteinelor pe biomaterial și compoziția interfeței	18
1.5.5 Interacțiunea și redistribuirea sarcinii electrice la suprafața biomaterialelor	19
1.5.6 Bio-piezoelectricitatea	19
1.5.7 Efectul antibacterian	21
CAPITOLUL 2	24
2.1 Biomateriale de adiție utilizate in stomatologie	24
2.1.1 Autogrefele	24
2.1.2 Alogrefele	25
2.1.3 Xenogrefele	26
2.1.3.1 Os bovin	26
2.1.3.2 Os cabalin	27
2.1.3.3 Os porcine	27
2.1.3.4 Substitut osos din alge	27
2.1.3.5 Substitut osos din corali	27
2.1.4 Materiale aloplastice	27
2.1.4.1 Fosfații de calciu	28
2.1.4.2 Sulfat de calciu	31
2.1.4.3 Sticla bioactivă	31
2.2 Stadiul actual al cercetărilor cu privire la materialele de adiție osoasa cu aplicație stomatologica	31

2.1.4	<u>Materiale aloplastice</u>	27
2.1.4.1	<u>Fosfații de calciu</u>	28
2.1.4.2	<u>Sulfat de calciu</u>	31
2.1.4.3	<u>Sticla bioactivă</u>	31
2.2	<u>Stadiul actual al cercetărilor cu privire la materialele de adiție osoasa cu aplicație stomatologica</u>	31
2.2.1	<u>Biomateriale de adiție osoasa îmbogățite în ioni activi</u>	33
2.2.2	<u>Îmbunătățirea osteoinducției biomaterialelor prin creșterea adsorbției proteinelor</u>	34
2.2.3	<u>Tratamentul suprafeței biomaterialului cu plasma</u>	34
2.2.4	<u>Utilizarea biomaterialelor piezoelectrice pentru îmbunătățirea aderenței celulare și a efectului antibacterian</u>	35
2.2.4.1	<u>Polimeri și biopolimeri piezoelectrice</u>	36
	<u>Polimeri sintetici</u>	36
	<u>Biopolimeri</u>	38
2.2.5.2	<u>Materiale piezoceramice</u>	42
2.2.5.3	<u>Biocompozitele de adiție osoasa cu proprietăți piezoelectrice</u>	45
PARTEA a II a		48
SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA		48
CAPITOLUL 3		48
3.1	<u>Sinteza pulberii de hidroxiapatită din coaja de ou</u>	48
3.1.1	<u>Prepararea materiei prime – pulberea de coaja de ou</u>	48
3.1.2	<u>Calcinarea</u>	49
3.1.3	<u>Co-precipitarea pulberii de coaja de ou calcinata pentru sinteza hidroxiapatitei (HA)</u>	49
3.1.4	<u>Maturarea precipitatului la temperatura camerei</u>	50
3.1.5	<u>Maturarea hidrotermala asistata de microunde</u>	50
3.2	<u>Caracterizarea compozițională și morfostructurală a pulberilor de apatită carbonatata sintetizate</u>	51
3.2.1	<u>Caracterizarea pulberii de coaja de ou necalcinată</u>	52
3.2.1.1	<u>Analiza difracției de raze X</u>	52
3.2.1.2	<u>Analiza spectrelor de fluorescența de raze X</u>	54
3.2.2	<u>Caracterizarea pulberii de coaja de ou după calcinare</u>	54
3.2.2.1	<u>Analiza compozițională prin difracția de raze X</u>	54
3.2.3	<u>Caracterizarea comparativa a pulberilor de hidroxiapatită sintetizate din coaja de ou</u>	55

3.2.3.2	Analiza spectrelor elementale de fluorescența de raze X (XRF)	58
3.2.3.3	Caracterizarea prin analiza difracției de raze X(XRD)	59
3.2.3.4	Caracterizarea texturală (structurală) prin microscopia de baleiaj (SEM)	62
3.2.3.5	Caracterizarea elementală prin spectrele EDS (Energy Dispersive Spectra)-SEM	65
3.2.3.6	Caracterizarea morfo-structurală prin microscopia de transmisie TEM, microscopia de înaltă rezoluție (HR-TEM) și microscopia electronica de dispersie pe arii selectate (SAED)	65
3.2.3.7	Caracterizarea comparativă a comportării citotoxice <i>in vitro</i>	69
3.3	Caracterizarea compozițională și morfo-structurală comparativă a pulberii de apatita carbonată de sinteză HA1 din coaja de ou și xenogrefele Gen-OS® și Bio-Oss® utilizate ca substituenți osoși în stomatologie	72
3.3.1	Caracterizarea compozițională comparativă prin spectroscopia de absorbție în IR (FTIR)	72
3.3.2	Caracterizarea compozițională comparativă prin difractometria de raze X (XRD)	73
3.3.3	Caracterizarea morfo-structurală comparativă prin microscopia electronica de baleiaj (SEM)	75
3.3.4	Caracterizarea compozițională elementală prin spectroscopia de dispersie a energiei(EDS)	77
3.3.5	Caracterizarea morfologică comparativă prin microscopia electronica de transmisie(TEM), microscopia de înaltă rezoluție(HR-TEM),microscopia electronica de dispersie pe arii selectate(SAED)	78
3.3.6	Caracterizarea comparativă a comportării citotoxice în vitro	85
3.3.6.1	Prepararea culturilor celulare	85
3.3.6.2	Determinarea viabilității celulare (Testul MTT)	85
3.3.6.3	Determinarea stresului oxidativ (Testul GSH-Glo)	86
3.3.6.4	Testul fluorometric de citotoxicitate pe microculturi celulare(FMCA)	87
CAPITOLUL 4		89
4.1	Sinteza pulberii de niobat de sodiu și potasiu(KNN)	89
4.1.1	Prepararea suspensiei de reactanți	90
3.2.2	Tratamentul hidrotermal asistat de microunde (HTMW)	92
4.2	Caracterizarea compozițională și morfostructurală a pulberilor de soluție solidă $K_xNa_{1-x}NbO_3$ 93	
4.2.1	Determinarea compoziției elementale a pulberilor $K_xNa_{1-x}NbO_3$ prin analiza spectroscopiei de fluorescența (XRF)	93
4.2.2	Caracterizarea compoziției elementale prin analiza EDS (Energy Dispersive X-Ray analyse)	97
4.2.3	Caracterizarea compoziției fazelor cristaline și determinarea parametrilor caracteristici celulelor elementare ale $K_xN_{1-x}NbO_3$ prin analiza difracției de raze X (XRD) și rafinarea structurală prin metoda Rietveld	99

4.2.4	Caracterizarea compozițională a pulberilor de $K_xNa_{1-x}NbO_3$ prin spectroscopia Raman..	111
4.2.5	Caracterizarea morfo-structurata a pulberilor $K_xNa_{1-x}NbO_3$ prin analiza de microscopie electronică de baleiaj (SEM)	113
4.2.6	Caracterizarea morfo-structurata a pulberilor $K_xNa_{1-x}NbO_3$ prin analiza microscopiei electronice de transmisie (TEM) și microscopia electronica de înalta rezoluție HRTEM	119
4.2.7	Caracterizarea proprietăților piezoelectrice a pulberilor $K_xNa_{1-x}NbO_3$ prin determinarea constantei piezoelectrice d_{33}.....	120
Capitolul 5		122
5.1	Strategia de sinteza a compozitul HA-KNN-CS	122
5.2	Prepararea compozitelor de adiție osoasă în sistemul HA-KNN- CS.....	122
5.2.1	Prepararea hidrogelului de chitosan.....	122
5.2.2	Prepararea hidrogelurilor de material compozit	123
5.2.3	Prepararea probelor de biocompozit sub formă de scaffolduri.....	124
5.2.4	Prepararea probelor de biocompozit din seria HA- KNN-CSL_{1.5} sub formă de granule	125
5.3	Caracterizarea compozițională și morfo-structurală a chitosanului.....	126
5.3.1	Caracterizarea compozițională a scaffoldurilor de chitosan prin spectroscopia de absorbtie în IR	126
5.3.1.1	Gradul de acetilare DA(%).....	129
5.3.2	Caracterizarea compozițională a scaffoldurilor de chitosan prin difrctometria de raze X	130
5.3.3	Caracterizarea morfo-structurata a scaffoldurilor de chitosan prin microscopia electronica de baleaj (SEM)	131
5.4	Caracterizarea compozițională și morfo-structurală a biomaterialelor în sistem CSL-HA-KNN	133
5.4.1	Caracterizarea compozițională a scaffoldurilor de biocompozite prin spectroscopia de absorbtiei în IR- FTIR (Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy)	133
5.4.2	Caracterizarea compozițională a biomaterialelor HA-KNN-CS prin difracția de raze X ...	136
5.4.3	Determinarea gradului de gonflare în SBF, a biodegradabilitatii pentru scaffoldurile de biocompozite	139
5.4.4	Determinarea suprafeței specifice, a volumului și razei porilor la granulele de biomaterialele HA-KNN-CSL_{1.5}	140
5.4.5	Caracterizarea morfo-structurală a biomaterialelor HA-KNN-CS prin microscopia electronica de baleiaj SEM.....	144
5.4.5.1	Caracterizarea morfo-structurata a scaffoldurilor de bio- compozite HA-KNN-CSL_{1.5} ...	144
5.4.5.2	Caracterizarea morfo-structurata a granulelor de bio- compozite HA-KNN-CSL_{1.5}.....	147
5.5	Caracterizarea comportamentului in vitro al al biomaterialelor HA-KNN-CS.....	148
5.5.1	Biodegradarea in vitro a scaffoldurilor de compozite HA-KNN-CSL_{1.5} prin caracterizarea compozițională EDS, FTIR si morfo-structurală SEM.....	148

5.5.2 Comportamentul antibacterian al biomaterialelor în sistem HA-KNN-CSL_{1.5} în forma de scaffolduri și hidrogeluri compozite	157
5.3.6 Caracterizarea comportamentului citotoxic al biomaterialelor HA-KNN-CSL_{1.5}	163
6. CONCLUZII GENERALE, PERSPECTIVE DE STUDIU ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE	169
6.1 CONCLUZII GENERALE	169
6.2 CONTRIBUTII ORIGINALE	176
6.3 PERSPECTIVE DE STUDIU	177
BIBLIOGRAFIA	178
DISEMINAREA REZULTATELOR	192

INTRODUCERE

Din studiile statistice publicate în 2022, costurile totale implicate cu tratamentele cazurilor de paradentoză raportate în anul 2018 în SUA a fost estimat la 3,49 miliarde USD și la 2,52 miliarde EUR în Europa[1]. Se apreciază ca aproximativ 10% din populația lumii este afectată sever de parodontoză, iar netratarea acestei afecțiuni duce la pierderea dinților[2]. Pe lângă afecțiunile parodontale, și alte deficiente pot conduce la pierderea dinților, printre care și degenerarea țesutului osos cauzat de vârstă și sex. Studii recente au arătat legătura dintre apariția bolilor parodontale la femeile aflate în 0-4 ani de la debutul menopauzei [3]. Primul scop în ingineria tisulară parodontală este regenerarea țesutului suport al dinților [2]. Deficitul osos al maxilarelor este adesea atribuit accidentelor, în depărtării chirurgicale a leziunilor benigne sau a neoplasmelor maligne, anomalii congenitale, inflamații parodontale, abces sau extracție a dinților și, în final, atrofia maxilarului din cauza vârstei înaintate sau a bolii generale[2, 4-13]. Aceste defecte osoase necesită reabilitare din mai multe motive, de ex. menținerea conturului anatomic normal, eliminarea spațiului gol, restaurarea estetică, plasarea implanturilor dentare și mai ales împiedicarea procesului fiziologic de resorbție osoasă [2, 5-13].

Țesuturile ca osul, cartilajele, dentina, tendoanele au demonstrat proprietăți piezoelectrice. În 1960, Fukada a observat că tensiunea mecanică induce în os un efect piezoelectric determinat de alunecarea fibrelor de colagen unele față de altele[15]. Efectul piezoelectric este caracterizat printr-o transformare liniară între variabilele mecanice și electrice. În general, materialele piezoelectrice pot genera sarcini electrice diferite pe suprafețele opuse, ca răspuns la o solicitare mecanică, cum ar fi întinderea, compresia sau înclinarea [16]. Țesuturile conjunctive dure și semidure se remodelează dinamic pentru cerințele lor funcționale prin semnale chimice transmise de celule sau matricea extracelulară și electrice prin sinapse sau prin efectul piezoelectric[16]. Țesutul conjunctiv dur conține constituenți organici și anorganici: proteine de natură colagenică sau necolagenică care conferă flexibilitatea țesutului osos cât și componenta celulară care asigură funcționarea fiziologică a țesutului; componenta minerală și apa au roluri atât funcționale cât și structurale. Biomaterialele de adiție osoasă de ultimă generație încearcă să urmeze mimetic compoziția și structura țesutului osos, până la constituenții organici care pot induce efecte de respingere din partea organismului gazdă. Hidroxiapatita reprezintă componentul mineral majoritar al osului. Numită și apatita biologică, acest mineral, care constituie suportul mecanic al țesutului osos, are caracteristici morfo-structurale specifice: particulele policristaline nanometrice de apatita biologică, cu morfologie parchetară și de bare, sunt împachetate în structuri tridimensionale cu ajutorul fibrelor de colagen tip I cu structura helicată, acest compozit inducând acestui țesut importante particularități funcționale în timpul osteogenezei cât și în procesele reparatorii.

Un biomaterial implantat ca material de adiție și substituție osoasă trebuie să răspundă la câteva provocări importante, care vor decide reușita operației de grefare [17]: biocompatibilitatea cu mediul biologic tradusă prin intensitatea moderată a proceselor inflamatorii și a activității

macrofagelor de fagocitoza ca răspuns al organismului la prezenta implantului [18]; bioactivitatea sau comportamentul inert al biomaterialelor trebuie să fie în concordanță cu procesele biochimice fiziologice și de păstrarea unor proprietăți funcționale (de exemplu rezistența mecanică); inducerea proceselor osteoinductive adică capacitatea materialului de a realiza legături și interacțiuni care să ducă sinergic la activarea osteoblastelor în procesele de generare a osului *de novo* [19, 20]; inducerea unor efecte hemostatice, după caz, care să favorizeze activitatea condrocitelor, macrofagelor, trombocitelor [21, 22]; să dețină proprietăți antibacteriene care să permită reducerea populației bacteriene sau chiar să întrerupă procesele de diviziune celulară împiedicând reproducerea bacteriilor [23].

Diferite tehnici ca modificarea chimismului, compoziției sau proiectarea structurii suprafețelor biomaterialelor (micro sau nanoparticulate), aplicarea din exterior a stimulilor electrici și polarizarea sau a câmpului magnetic pot îmbunătăți răspunsul antibacterian, de adezivitate dar mai ales răspunsul osteoinductiv [24]. Adeziunea bacteriilor la suprafața biomaterialului (implantului) are loc prin interacțiuni electrostatice dar și prin legături tip van der Waals, pe suprafețe hidrofobe. De obicei membrana exterioară a bacteriilor este încărcată cu sarcini negative (mai puternic negativ la germeni gram negativi decât gram-pozitivi) datorată ionizării hidrogenului activ al grupelor funcționale (carbonil, fosfat, amino și hidroxil). Agenții antibacterieni vizează genomul celulei, respirația, diviziunea, traseul metabolic și întreruperea membranei celulelor bacteriene pentru a le omorî [23]. Formând bio-filme auto-protective, cei mai des întâlniți coci în infecțiile asociate implanturilor sunt: staphylococci gram-pozitiv (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, etc.), specii de *streptococcus* și *enterococcus*, iar speciile aerobe gram-negative includ enterobacterii (*Salmonella enteritidis*, *E. coli* și *Pseudomonas aeruginosa*) [24].

Teza de doctorat a fost structurată în două părți: **Partea I „Studiul critic al datelor de literatură”** care cuprinde capitolul 1 și 2; **Partea a II a „Sinteza și caracterizarea”** cuprinzând capitolele 3, 4 și 5.

CAPITOLUL 1 Noțiuni despre anatomia și fiziologia țesutului osos, descrierea proceselor de refacere osoasă, a mecanismelor antibacteriene și bio-piezo-electrice

În capitolul 1 sunt prezentate informații generale despre anatomia și fiziologia țesutului osos care are capacitate mare de autorefacere în cazul unor fisuri, extracții dentare sau fracturi, dacă acestea nu depășesc anumite limite. Compoziția, structura și morfologia țesutului osos este important de cunoscut în contextul studiului grefelor de materiale de adiție, întrucât acesta diferă în funcție de tipul de os și de proprietățile funcționale la care trebuie să răspundă în mod fiziologic. De asemenea, în capitolul 1 au fost furnizate noțiuni despre fiziologia țesutului osos, care sunt în corelare cu structura, compoziția și morfologia acestuia.

Defectele osoase mari la nivelul alveolelor dentare, cauzate de extracțiile dentare sau de resorbția osoasă pot fi corectate doar prin adiția de material care să aibă rol de suport, furnizor de minerale sau proteine specifice, care să inducă efecte osteopromotoare și osteogenetice. S-au identificat câteva mecanisme biologice de refacere osoasă care pot fi potentate de prezenta unor biomateriale de adiție osoasă.

Mecanismele și etapele de formare a diferitelor tipuri de țesut osos cât și de refacere a defectelor osoase au fost prezentate de asemenea în Capitolul 1, fiind necesară cunoașterea celor trei, după unii autori 4 faze : inflamatorie, de reparație și faza finală de remodelare [19, 20, 35].

Efectul piezoelectric care se manifestă în organism în procesele de osificare, poate implica câteva subprocesse:

- ✓ Aplicarea unor tensiuni mecanice la nivelul țesutului osos al alveolelor dentare determină ca proteinele structurale (colagenul, proteoglicanii etc.) să se deformeze și să auto inducă o sarcină electrică de suprafață cu rolul :
 - de semnalizare asupra membranei celulelor osteoblaste din matricea osoasă , activându-le;
 - de polarizare a grupărilor funcționale de suprafață, crescând potențialul electric și capacitatea de mineralizare, deci refacere osoasă;
 - polarizarea de suprafață crește aderența celulară și a proteinelor prin manifestarea efectelor electro- statice de atracție.

Utilizarea unor grefe din biomateriale cu proprietăți piezoelectrice poate potența atât efectul osteopromotor cât și poate acționa ca agent slab antibacterian, după mecanismele descrise în acest capitol.

CAPITOL 2 Biomateriale de adiție osoasă pentru stomatologie

În cadrul Capitolului 2, au fost prezentate cauzele pentru care sunt necesare intervenții de augmentare osoasă utilizând materiale de adiție în domeniul stomatologic. De asemenea, a fost realizată o vedere de ansamblu asupra caracteristicilor pe care trebuie să le îndeplinească biomaterialele pentru a genera clinic rezultate de augmentare osoasă îmbunătățite. În ultima parte a Capitolului 2 au fost prezentate detaliat categoriile de materiale de adiție osoasă utilizate în domeniul stomatologic.

Extracțiile dentare reprezintă cauza principală a pierderii de masă osoasă la nivelul aparatului masticator. În urma acestora, pe de o parte este îndepărtată o parte din țesutul conjunctiv și țesutul osos dar apare fenomenul de resorbție osoasă fiziologică cauzată de pierderea vascularizației și inervației dar și a caracteristicilor funcționale de suport. În cele mai multe cazuri, refacerea alveolelor dentare urmarea extracțiilor dentare, fără intervenții exogene, presupune formarea țesutului fibros, puțin vascularizat, care nu reprezintă un suport potrivit pentru implantul dentar. Studiile clinice au arătat că important pentru reușita operației de grefare este forma de prezentare a materialelor: de mai nouă generație sunt materialele de adiție sub forma de gel care prezintă o mai bună bioactivitate iar tehnica de punere în opera prin injectare, crează un disconfort minim pacientului. Grefele de tip scaffold trebuie să prezinte o porozitate care să confere o bună aderență a proteinelor de creștere, nu trebuie să prezinte rezistențe mecanice ridicate, să nu inducă un efect inflamator potențat, suplimentar un ușor efect hemostatic, să fie biodegradabil și activ chimic moderat, și să transmită semnale electrice osteopromotoare.

Studiile din ultimii ani asupra materialelor aloplastice de adiție osoasă , au vizat realizarea unor materiale care, pe lângă mimetismul structural și compozițional să inducă proprietăți cu efecte pozitive

asupra proceselor complementare osificării, cum ar fi : îmbunătățirea aderenței proteinelor specifice, angiogeneza, biosemnalizarea, polarizarea , efectul bacteriostatic și antifungic, hemostaza sau hemoliza, etc.

O abordare nouă în practica stomatologică este impregnarea materialelor aloplastice cu serul extras din sângele pacientului, tehnica care îmbunătățește semnificativ acceptarea grefei din partea organismului și lărgeste capabilitatea de utilizare a numeroaselor variante de materiale de adiție osoasă sintetică.

MOTIVAREA STUDIULUI DE CERCETARE

Astfel, tema de cercetare urmărește sinteza unui biocompozit care să fie mimetic compozițional cu țesutul osos pentru conservarea unor proprietăți esențiale, dar care conține un component cu proprietăți piezoelectrice și fără efecte citotoxice care, odată implantat în defectul osos alveolar, să potențeze prin polarizare, atât semnalizarea, cinetica reacțiilor de formare cât și aderența celulelor sau biopolimerilor din matricea extracelulară osoasă. Proprietăți cum ar fi bio-compatibilitatea tradusă prin posibilitatea inducerii unui efect inflamator moderat, stimularea aderenței celulare sau sursă de biopolimeri și minerale au fost furnizate de pulberea manometrică de hidroxiapatită din surse biogene (HA) și chitosanul cu masă moleculară mică și grad de deacetilare mediu (CSL). Domeniul de cercetare al materialelor piezoelectrice de tipul soluției solide de niobat de sodiu și potasiu (KNN) este unul de extrem de actual, în contextul necesității de securitate a sănătății și protecției mediului, dar și datorat utilizării în domenii electronice și aplicații medicale de ultima generație (bio-senzori, dispozitivelor medicale pentru generare de ultrasunete și de energie de înaltă frecvență, sonare etc.). Mai mult, efectul de polarizare a granulelor de bio-materiale în sistemul HA-KNN-CSL poate induce micro-câmpuri electrice utile în mecanisme de bio-semnalizare, antibacterian și antifungic și creșterea aderenței celulare sau moleculare prin atracție electrostatică cât și modificarea potențialului membranelor celulare. De asemenea, biomaterialele de adiție osoasă utilizate în stomatologie trebuie să răspundă unor cerințe complexe și să inducă efecte antibacteriene, de reducere a reacției inflamatorii sau chiar hemostatice, cât și să fie cât mai versatil în privința fasonării sau punerii în operă în cabinetele stomatologice.

OBIECTIVELE STUDIULUI DE CERCETARE

Obiectivul general al studiului de cercetare din cadrul tezei de doctorat este sinteza unui bio-compozit în sistemul HA-KNN-CSL care să însumeze proprietățile funcționale ale unui material de adiție osoasă de ultimă generație, facil de grefat pentru augmentarea osoasă a alveolelor dentare.

Obiectivul general s-a realizat prin :

- Utilizarea unor metode de sinteza cum ar fi metoda hidrotermala asistata de microunde (HTMW) sau metoda de uscare prin liofilizare, care să genereze rezultate trasabile și predictibile prin controlul parametrilor de proces sau al materiilor prime;
- Sinteza componentelor compozitului în sistemul HA-KNN-CSL care sa dețină caracteristicile potrivite: pulbere nanometrică mezoporoasă de apatită carbonată cu conținut de oligoelemente, hidrogel de chitosan cu acțiune antibacteriana, coagulanta și antiinflamatoare, cat și pulberea sub-micronică de soluție solida de niobat de sodiu și potasiu, conținând cristale cu simetrie ortorombică și tetragonală aflată la limita de fază morfotropă ($K_{0.5}Na_{0.5}NbO_3$), cu cel mai bun coeficient piezoelectric d_{33} ;
- Sinteza bio-compozitului în sistemul HA-KNN-CSL având proporțiile potrivite ale componentelor, astfel încât să ii asigure cele mai bune proprietăți piezoelectrice, bioactivitate moderată, proprietăți antibacteriene și antifungice dar în condițiile unui minim efect citotoxic și o bună activitate celulară.

PARTEA A II A CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 3 Sinteza și caracterizarea compozitionala, morfo-structurala si a comportarii *in vitro* a pulberilor nanometrice de hidroxiapatita din coaja de ou

SINTEZA PULBERILOR DE HIDROXIAPATITA DIN COAJA DE OU

Metoda de sinteza a primului component al biocompozitului este detaliata în cadrul Capitolului 3. Sunt prezentați precursorii, condițiile de reacție cat și parametrii tehnologici ai metodei de maturare hidrotermal utilizând microundele ca sursă de încălzire a sistemului. De asemenea, este realizata o caracterizare amplă atât a materiilor prime(coaja de ou) cat și , comparativ, a celor 5 specimene de hidroxiapatita obținute. In a doua parte a Capitolului 3 este prezentată o caracterizare comparativa a specimenului de apatită carbonată sintetizat HA1 *versus* două produse comerciale Bio-Oss® și Gen-OS® care sunt utilizate cu bune rezultate în practica actuală stomatologică.

CARACTERIZAREA COMPOZITIONALA , MORFOSTRUCTURALA SI COMPORTAREA CITOTOXICA A PULBERILOR DE HIDROXIAPATITA

S-a adoptat metoda hidrotermală asistată de microunde pentru sinteza hidroxiapatitei carbonatate pornind de la o sursa naturală și ieftină care este coaja de ou. Coaja de ou este o sursa de calcit (96%) și s-a ales varianta utilizării ca precursor calcitic după calcinare, oxidul de calciu obținut a fost precipitat la hidroxiapatită prin adăugarea de fosfat acid dibazic de amoniu, titrat cu o viteza de 2 ml/minut, sub omogenizare magnetica continua, produsul de reacție secundar (hidroxidul de amoniu) acționând drept corector de pH în domeniul puternic bazic. S-a urmărit maturarea precipitatului în doua direcții : prin tratament hidrotermal și maturarea clasica la temperatura camerei pentru o durata de 12 h și 48 h (probe denumite HA_CP_12, HA_CP_48). Maturarea hidrotermala asistata de microunde (HTMW) a fost, de asemenea, urmărită în doua variante: tratament hidrotermal la temperatura ridicata (200°C) cu o durata a ciclului complet de 60 minute (HA1) și o durată redusă de 30 minute la 135°C, care ulterior au fost maturate în condiții normale pentru 12 respectiv 48 ore(HA_HT_12, HA_HT_48).

În urma caracterizării compoziționale, morfostructurale și citotoxice s-au putut emite următoarele concluzii:

- Spectrele de absorbanta în IR (FTIR) au arătat prezenta grupurilor carbonat de tip B, cu un conținut mai mare la probele maturate clasic, o vibrație slabă sau absentă a legăturii H-O și o asemănare mare a spectrelor FTIR atât a pofilelor cât și a amplitudinilor spectrelor pentru toate probele, deci la asemănarea compozițională foarte buna cu apatita carbonată (Figura 1); conținutul de grupuri carbonat tip A substituind grupurile PO_4^{3-} din rețeaua hidroxiapatitei C/P determinat cu ecuația empirică [179], se încadrează între 0.0304 – 0.0737, cea mai mare valoare a acestui raport fiind găsită la HA_CP_12.

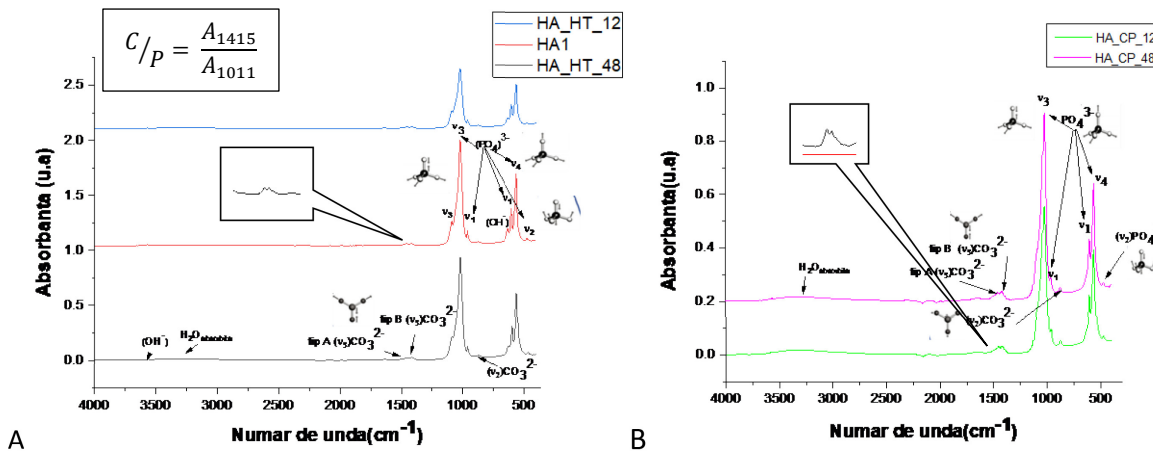


Figura 1 Spectrele de absorbție FTIR comparative pentru probele de A) hidroxiapatită maturate HTMW (HA1) și combinat HTMW de scurtă durată și la temperatura camerei (HA_HT_12, HA_HT_48), B) hidroxiapatită maturate la temperatura camerei (HA_CP_12, HA_CP_48)

- Spectrele XRF pun în evidență conservarea oligoelementelor (Na, Mg, K, Sr, Si, Fe, Cl etc.) în proporții mai mari de jumătate față de conținutul din coaja de ou la toate probele sintetizate, dar și rapoarte $Ca/P < 2$ (~1.8) pentru probele sintetizate hidroramal și $Ca/P > 2$ pentru maturarea clasică;
- Analiza difracției de raze X și rafinarea structurală Rietveld au pus în evidență faza unică de hidroxiapatită la care pofilele picurilor diferă ușor prin amplitudine și lărgime (Figura 2), cu conținut variabil de faze hexagonală și o fază monoclinică, majoritară la probele obținute prin maturare hidrotermală; faza monoclinică a păstrat ceilalți parametri de rețea ca în cazul simetriei hexagonale, derivând din faza hexagonală prin distorsionarea unghiului planului bazei de la 120° cu $\pm 0.5^\circ$ și alungirea după parametrul b al rețelei cristaline (Tabel 1); cel mai mare grad de cristalinitate l-au avut probele tratate hidrotermal, iar dintre acestea, HA1 a scos în evidență cristalinitatea de ~90%;

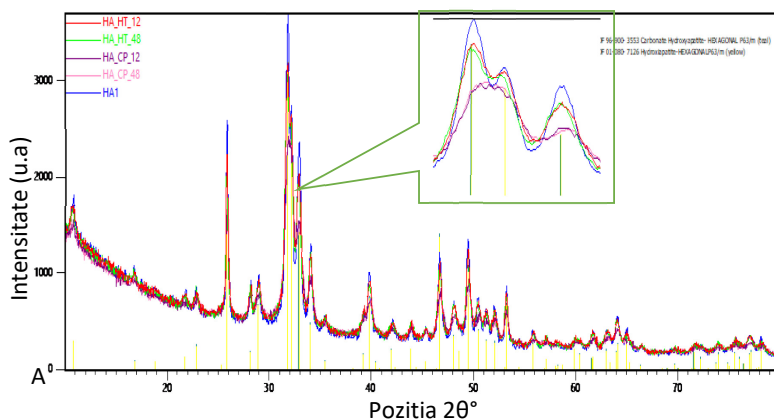


Figura 2 Difractogramele de raze X comparative suprapuse pentru probele maturate HTMW (HA_HT_12, HA_HT_48 și HA1) și probele maturate la temperatura camerei (HA_CP_12, HA_CP_48)

Tabel 1 Determinarea proporțiilor dintre faze de hidroxiapatita cristalizata cu simetrie M (P21/b ,PDF 04-016-1185) și H (P63/m, PDF 01-080-7126) , determinarea caracteristicilor celulei elementare prin metoda rafinării structurale Rietveld

Proba	HA M, P21/b Z=4 PDF 01-089-4405	HA H P63/m Z=2 PDF 04-080-7126	HA_CP_12		HA_CP_48		HA_HT_12		HA_HT_48		HA1	
			M 23.5 %	H 76.4 %	M 17.7 %	H 82.3 %	M 94 %	H 6 %	M 97 %	H 3 %	M 96.9 %	H 3.1 %
a (Å)	9.426	9.460	9.617	9.417	9.671	9.408	9.456	9.631	9.432	9.304	9.408	9.167
b(Å)	18.856	9.460	19.231	9.417	19.257	9.408	18.864	9.631	18.852	9.304	18.943	9.167
c(Å)	6.887	6.885	6.881	6.884	6.883	6.885	6.885	6.885	6.884	6.880	6.886	6.902
V(Å³)	1060.4	539.4	1084.7	528.7	1048.8	527.8	1060.2	550.7	1057.8	515.8	1062.7	503.2
α(°)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
β(°)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
γ(°)	119.9	120	120.5	120	120.8	120	120.31	120	120.2	120	120.02	120
Dimensiunea medie a cristalitelor (nm)	-	-	33.8642		35.6023		31.9256		32.6276		31.98	
Deviatia standard(nm)	-	-	19.36687		19.52428		9.53257		9.59872		1.89	
Micro-tensiuni(%)	-	-	0.67935		0.6766		0.63205		0.5142		0.5208	
Cristalinitate (%)	-	-	33.95		36.61		60.46		72.44		84.20	

- Micrografiile SEM au arătat asemănarea între textura afânată, pufoasă a agregatelor de particule, cu dimensiuni sun 1 μm, dificultatea de a măsura dimensiunea particulelor chiar la mărimi de 100.000x; EDS confirma Ca/P<2 pentru probele maturate hidrotermal;
- Din analiza imaginilor TEM, HRTEM și SAED, s-a evidențiat faptul că morfologia particulelor policristaline de dimensiuni nanometrice este diferită: probele tratate hidrotermal au morfologie

de nano-bare mezoporoase, iar cele maturate clasic sunt plachete prismatice, având o porozitate plasată la limita superioară a microporozității (Figura 3);

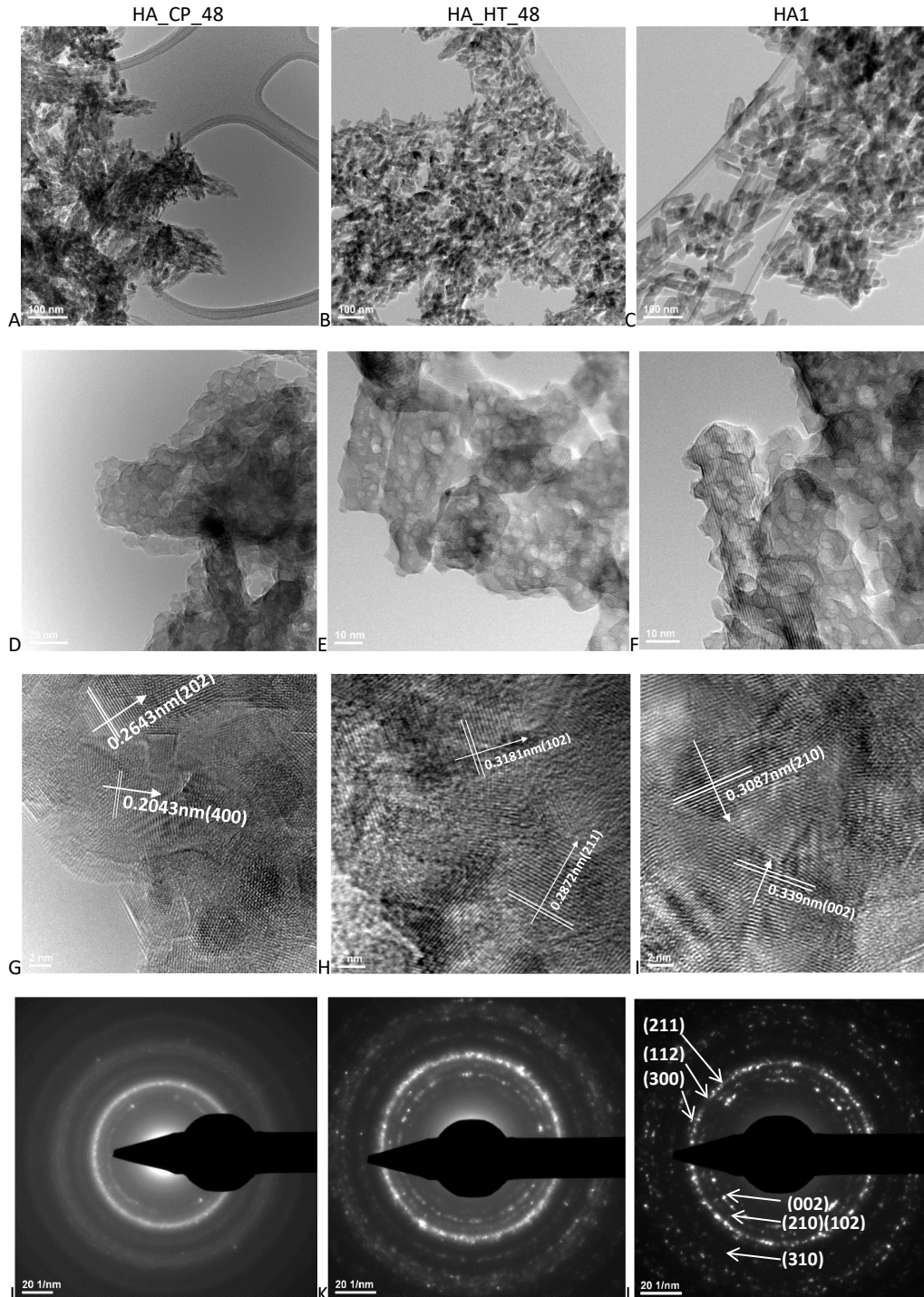


Figura 3 Micrografii TEM (A-F) pentru probele HA_CP_48 (A, D), HA_HT_48 (B, E), HA1 (C, F); Imaginile HR-TEM pentru probele HA_CP_48 (G), HA_HT_48 (H), HA1 (I); Imaginile SAED pentru probele HA_CP_48 (J), HA_HT_48 (K), HA1 (L)

- Comportarea citotoxică a pulberilor față de culturile de celule osteoblaste de șoarece (MC3T3-E1) nu a evidențiat diferențe notabile între cele cinci probe analizate, la nici una dintre concentrații.

CARACTERIZAREA COMPOZITIONALĂ , MORFOSTRUCTURALĂ ȘI COMPORTAREA CITOTOXICĂ A PULBERII DE HIDROXIAPATITA HA1 COMPARATIV CU XENOGRELE BIO-OSS® ȘI GEN-OS®

Toate pulberile obținute (HA1, HA_HT_12, HA_HT_48, HA_CP_12, HA_CP_48) sunt constituite din particule policristaline nanometrice având fază unică hidroxiapatita carbonatată cu diferențe neesențiale compozițional și textural. Tratatamentul hidrotermal la temperatura ridicată (200°C) și o durată completă a ciclului de 60 minute, a condus la obținerea unei pulberi de apatita carbonatată, proba HA1, cu numeroase substituții anionice și cationice determinate de prezența oligoelementelor în structura cristalină, cu particule policristaline având morfologia de bare cu lungimea medie de 77 nm și diametrul mediu 21 nm, cu mezopozitate (intra și inter-particule), ridicată creată de porii sferici cu diametre <10 nm.

Pulberea HA1 a fost, de asemenea, caracterizată comparativ alături de două probe granulare de xenogrefe, Bio-Oss® având ca origine osul cortical bovin complet deproteinizat și Gen-OS® provenind din os porcine deantigenat, cu largă utilizare ca materiale de adiție osoasă în practica stomatologică.

- Pulberea HA1 a manifestat o similitudine compozițională mare față de cele două xenogrefe, cu deosebiri mai mari față de Gen-OS®, la care remanenta fazei proteice sub forma fibrelor de colagen mineralizate, induce diferențe compoziționale, marcate în special în spectrele FTIR, dar și morfo-structurale față de celelalte două probe conținând doar faza minerală a osului(Figura 4).

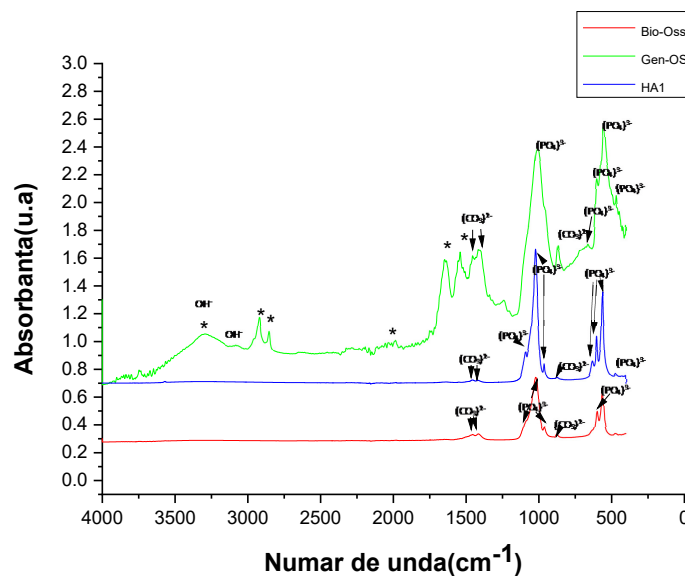


Figura 4 Spectrul de absorbție FTIR pentru Bio-Oss, Gen-Os și HA1;(*) benzile de absorbție pentru grupele funcționale din proteinele colagenoase

- Imaginile TEM și paternurile SAED au pus în evidența dimensiunea nanometrică și policristalinitatea particulelor de HA1 cât și a probelor de xenogrefe Bio-Oss® și Gen-OS®, porozitatea superioară, din domeniul mezopozilor, a particulelor de HA1, indusa de tratamentul hidrotermal, comparativ cu probele de os mamifer (Figura 5). De asemenea, morfologia particulelor este diferită la cele trei probe analizate: în timp ce proba HA1 conține doar particule policristaline cu forma de nanobare (Figura 5 F, G, H), proba de Bio-Oss conține în mare parte particule cu morfologie de nanobare dar și plachete poliedrice (Figura 5 A, B, C), iar în proba de Gen-OS se pot identifica cu greu particulele de hidroxiapatită de forma alungită de bare (Figura 5 D, E) acestea fiind estompate de prezența fibrelor de colagen. Cea mai mare lungime a particulelor de forma barelor a fost identificată la proba HA1 (Tabel 2).

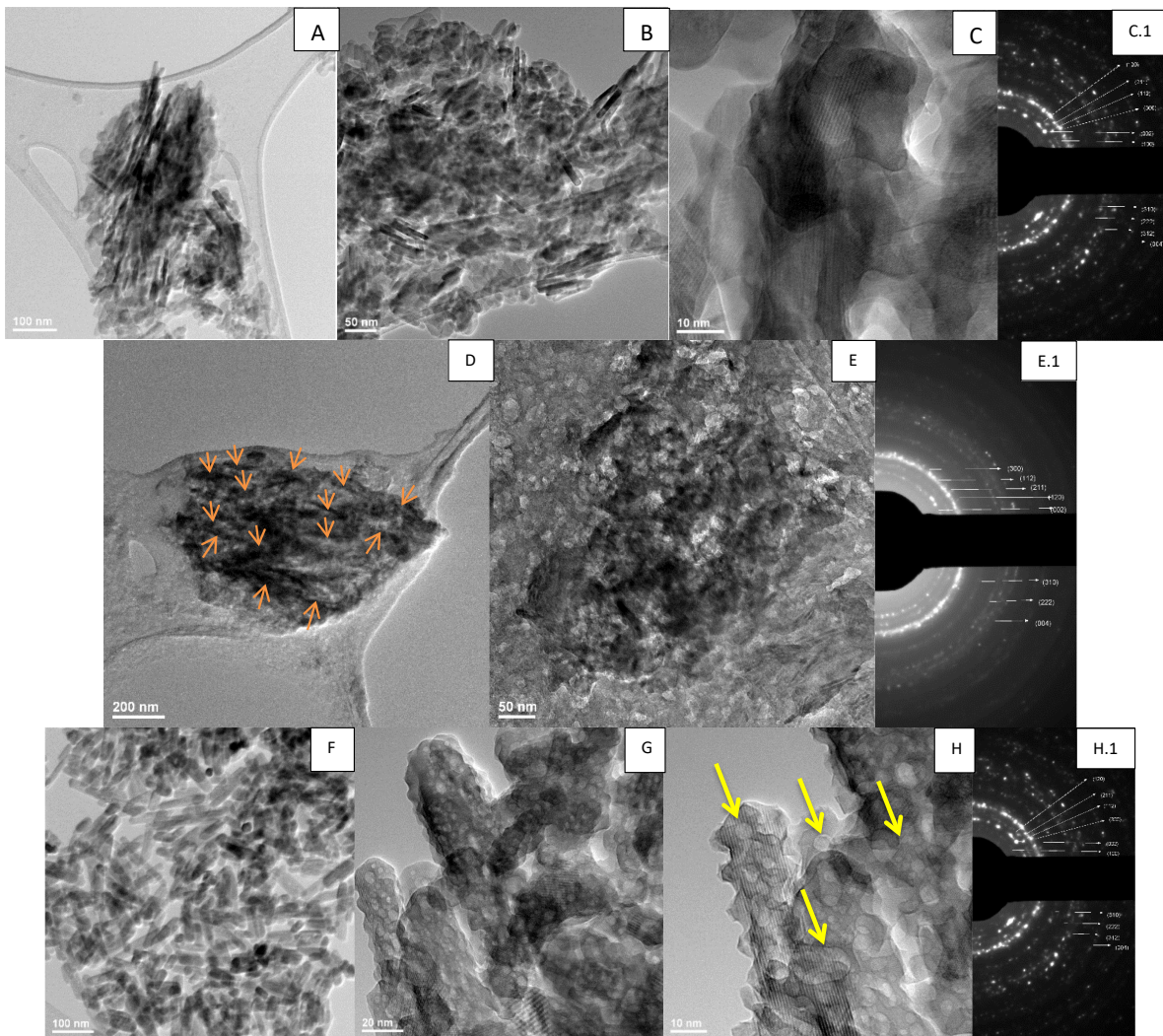


Figura 5 Imaginile TEM (A-C) Bio-Oss, (D-E) Gen-Os, imagini SAED ale probelor Bio-Oss (C.1), Gen-Os (E.1) și HA1 (H.1)

Tabel 2 Dimensiunea particulelor de hidroxiapatită din probele Bio-Oss, Gen-Os și HA1 măsurate din imaginile TEM

Dimensiune particula	Bio-Oss	Gen-Os	HA1
Diametrul minim(nm)	10.25	17.76	21.74
Diametrul maxim(nm)	14.1	26.45	27.18
Lungimea minima(nm)	50.41	77.29	74.32
Lungimea maxima(nm)	72.23	107.16	116.49
Raportul l/d	4.9	4.4	3.4

- Comportamentul citotoxic al celor trei materiale analizate comparativ a arătat că HA1 induce o viabilitate celulară și un stres oxidativ comparative cu probele control (doar cultura de celule AFSC), mai mici decât proba Gen-OS®, iar Bio-Oss® a manifestat un comportament citotoxic atipic, având situate valorile stresului oxidativ și a viabilității celulare sub valorile probelor CTRL (Figura 6).

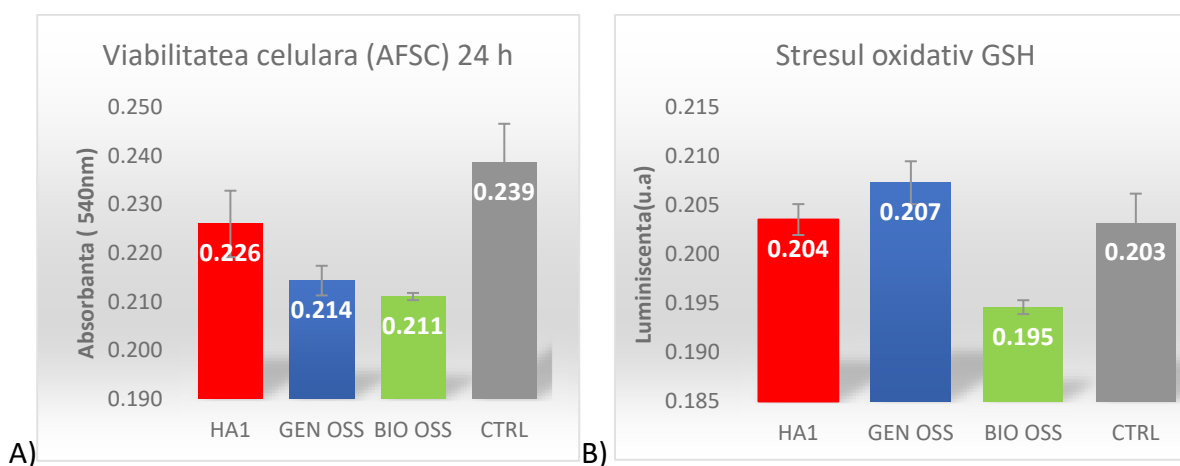


Figura 6 Rezultatele A) testului MTT: absorbanta la 540 nm pentru culturi de AFSC în prezența HA1, Gen-Os, Bio-Oss și proba control CTRL (doar celule), B) Testul GSH care pune în evidență stresul oxidativ al AFSC în prezența HA1, Gen-Os, Bio-Oss și Control (CTRL doar celule) perioada de incubație 72h. Rezultatele sunt prezentate ca medie a trei încercări ± S.D; $p < 0.05/n = 6$ pe baza analizei statistice ANOVA, urmat de t- test cu corecție post hoc Bonferroni

În urma acestor rezultate, s-a concluzionat faptul că pulberea HA1 reprezintă cel mai bun candidat pentru a putea fi utilizat ca material de adiție osoasă, fie în forma de pulbere, fie fasonată sub forma de scaffolduri poroase sau dense. În plus, adăosul unor biopolimeri la pulberea de HA1, poate potența caracteristicile biocompatibilitate și bioactivitate moderată, aderentă îmbunătățită a proteinelor și celulelor la biomaterial, care conduc la o creștere a efectului osteoconductiv și chiar a mecanismelor osteopromotoare.

CAPITOLUL 4 Sinteza și caracterizarea compozițională, morfo-structurală și a proprietăților piezoelectrice a pulberilor de niobat de sodiu și potasiu $K_xNa_{1-x}NbO_3$

Capitolului 4 a fost dedicat sintezei și caracterizării a pulberii de soluții solide de niobat de sodiu și potasiu $K_xNa_{1-x}NbO_3$, utilizând o rută hidrotermală asistată de microunde, cu o cinetică încă neelucidată pe deplin, urmărind stabilirea parametrilor de proces pentru obținerea reproductibilității și predictibilității compoziționale. În partea a doua a Capitolului 4 s-a realizat o caracterizare compozițională și morfo-structurală a celor 15 compoziții de soluții solide, încercând identificarea și confirmarea fracției molare x a $K_xNa_{1-x}NbO_3$, în vederea stabilirii concentrațiilor precursorilor și a parametrilor tehnologici necesari obținerii compoziției soluției solide $K_{0.5}Na_{0.5}NbO_3$.

SINTEZA PULBERILOR DE SOLUȚII SOLIDE DE NIOBAT DE SODIU ȘI POTASIU $K_xNa_{1-x}NbO_3$

S-a urmărit sinteza pulberii de niobat de sodiu și potasiu cu cele mai bune proprietăți piezoelectrice pentru utilizarea la sinteza biocompozitelor în sistemul HA-KNN-CS. Pentru sinteza pulberii de soluție solidă de niobat de sodiu și potasiu cu o compoziție cât mai apropiată de $K_{0.5}Na_{0.5}NbO_3$, la limita de fază morfotropă O-T, s-a apelat la metoda de sinteză în fază umedă prin metoda hidrotermală asistată de microunde, care permite limitarea dimensiunii particulelor la nanometrice și submicronice, evitarea formării fazelor secundare sau a reactanților neconsumați prin controlul duratei de tratament, durata redusă și temperaturi scăzute de tratament comparativ cu metoda clasică de sinteză în fază umedă, deci un consum redus de energie. S-a pornit de la amestec de soluții alcaline de KOH + NaOH, în patru serii de rapoarte molare (K/Na = 8M/8M, 8M/4M, 7M/3M și 6M/4M) și pulbere de Nb_2O_5 , având o reactivitate scăzută pentru rutele de sinteză umede. Variabilele aplicate în procesul tehnologic au fost temperatura 200-250°C (limitată tehnologic ca valoare maximă), temperaturi potrivite obiectivului de menținere a coexistenței fazelor cristaline O și T; durata procesării de 30, 60, și 90 minute la temperatura maximă a permis identificarea duratelor necesare de timp în ciclul hidrotermal pentru atingerea echi-molarității între K și Na în $K_xNa_{1-x}NbO_3$; presiunea ridicată a fost o constantă a procesului hidrotermal (40 bari) și a vizat catalizarea cineticii formării soluției solide pe structura perovskitică. Dintre toate seriile de probe, doar K8N2 a beneficiat de comparația tratamentului hidrotermal la cele două temperaturi.

CARACTERIZAREA COMPOZIȚIONALĂ, MORFOSTRUCTURALĂ ȘI A EFECTULUI PIEZOELECTRIC ALE PULBERILOR DE $K_xNa_{1-x}NbO_3$

Caracterizarea compozițională a pulberilor sintetizate s-a realizat prin determinarea spectrelor de fluorescență de raze X (XRF) estimându-se câte o formulă medie a soluției solide $K_xNa_{1-x}NbO_3$ pentru fiecare din cele 15 probe sintetizate, apoi cu ajutorul analizei difracției de raze X, spectroscopia Raman, și spectroscopia SEM-EDS s-a încercat confirmarea estimărilor pentru valorile raportului dintre K și Na (fracției molare x) în cele 15 rețelele perovskitice obținute prin variația concentrației precursorilor și modificarea duratei de palier și a temperaturii tratamentului hidrotermal.

- Rezultatele analizei XRF au evidențiat că pulberile de soluție solidă cu compozițiile medii cele mai apropiate de $K_{0.5}Na_{0.5}NbO_3$ au fost generate de probele: K8N2_250_30 ($K_{0.47}Na_{0.53}NbO_3$), K7N3_200_30 ($K_{0.43}Na_{0.57}NbO_3$) și K8N8_200_90 ($K_{0.44}Na_{0.56}NbO_3$). În diagrama pseudobinara de

echilibru termic fazal în sistemul KNbO_3 - NaNbO_3 au fost reprezentate cele 15 specimene sintetizate(Figura 7).

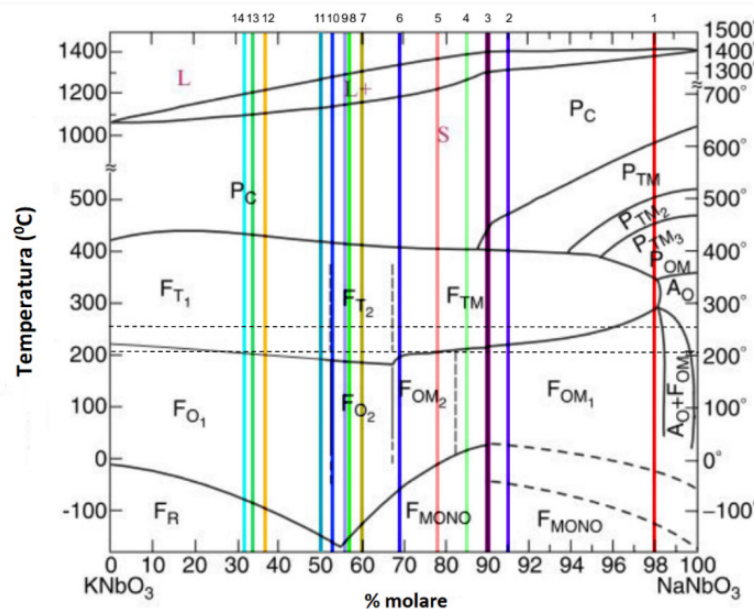


Figura 7 Încadrarea probelor 1-15 preparate de soluții solide în diagrama de echilibru termic fazal pseudobinar KNbO_3 - NaNbO_3 [169]:
1-K8N8_200_30; 2-K6N4_200_90 și K8N2_200_90; 3- K8N8_200_60; 4-K6N4_200_60; 5- K6N4_200_30; 6- K7N3_200_90 ; 7- K7N3_200_60; 8- K7N3_200_30; 9- K8N8_200_90; 10- K8N2_250_60; 11-compoziția $\text{K}_{0.5}\text{Na}_{0.5}\text{NbO}_3$; 12- K8N2_200_60; 13- K8N2_250_30;14- K8N2_200_30 și K8N2_250_90;

- Analiza difracției de raze X a evidențiat formarea fazelor de soluții solide, absența fazelor secundare (niobat de sodiu sau niobat de potasiu, cât și oxid de niobiu ne reacționat), coexistența cristalelor în simetrie O și T, dar nu s-a putut identifica exact compoziția soluțiilor solide sintetizate. Totuși, s-a confirmat faptul că soluțiile solide cu $x > 0.5$ au structura perovskitică mai apropiată de cea a KNbO_3 , iar cele identificate prin XRF mai bogate în Na, au picurile de difracție la unghiuri 2θ apropiate de cele ale paternului de difracție al NaNbO_3 (Figura 8). Prin rafinarea structurală Rietveld, s-a confirmat coexistența fazelor de simetrie O și T la cele trei probe, dar și similitudinea structurală a rețelelor cristaline cu $\text{K}_{0.5}\text{Na}_{0.5}\text{NbO}_3$ având simetrie O și T, cristalitele celor 3 candidate nu depășesc 20 nm. Refacerea sintezelor pentru pulbere stock în condițiile $\text{KOH}/\text{NaOH}=8/2$, 250°C , palier de 30 minute, a demonstrat reproductibilitatea compoziției soluției solide ($\text{K}_{0.47}\text{Na}_{0.53}\text{NbO}_3$), verificată prin compararea difractogramelor de raze X a pulberilor sintetizate independent, care difereau doar ca amplitudine a picurilor poziționate la aceleași unghiuri de difracție.

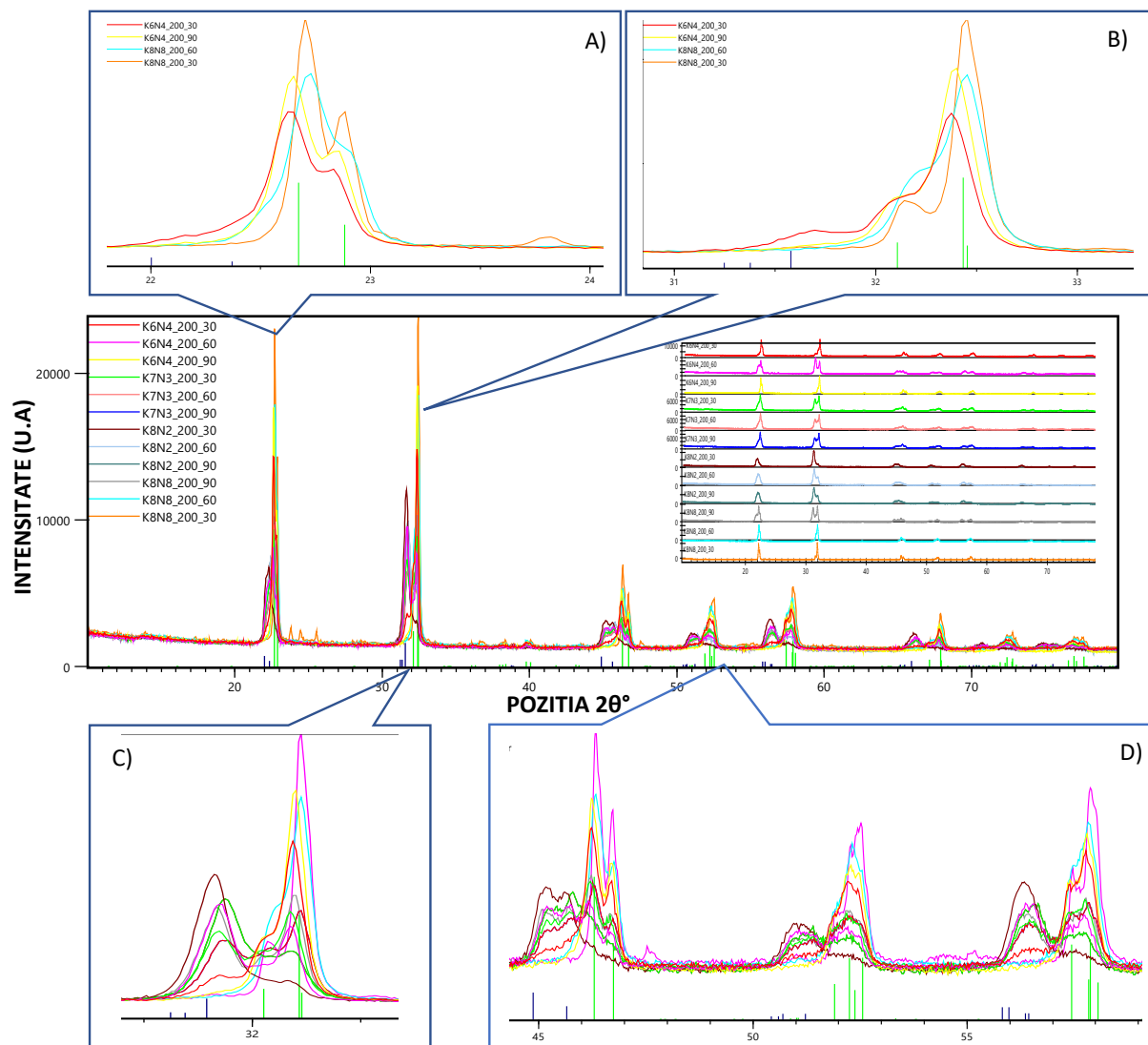


Figura 8 Difractogramele probelor tratate HTMW la 200°C, 30-90 min, comparativ cu paternurile NaNbO_3 (O)(verde PDF 04-012-8146) și KNbO_3 (O)(bleumarina PDF 96-721-2944), insert detaliu difractograma $2\theta = 31-33^\circ$ și $41.8-60^\circ$

- Din spectrele Raman s-au putut confirma unele constatări determinate în analiza XRF, XRD și rafinarile structurale Rietveld, fara a putea determina cu precizie compozițiile soluțiilor solide, în absenta unor spectre patern ale acestora. Interferențele apărute au fost create de compararea spectrelor probelor analizate cu spectrele Raman din literatura ale niobatilor de sodiu, niobati de potasiu sintetizate prin metode clasice avand o singura faza O sau T. Oricum, s-au putut determina vibrațiile caracteristice legăturilor Na-O de la numerele de unda $68 - 73 \text{ cm}^{-1}$ și K-O la numere de unda $<60 \text{ cm}^{-1}$, cu atât mai intense cu cât conținutul de K sau Na creștea în $\text{K}_x\text{Na}_{1-x}\text{NbO}_3$. Picul modului vibrațional de strângere a legăturii Nb-O, $A_{1g}(v_1)$ de la $610-612 \text{ cm}^{-1}$, este sensibil influențat de modificarea unghiului O-Nb-O din cadrul octaedrelor NbO_6 și scurtarea distanței Nb-O, care apare la schimbarea simetriei rețelei, de la ortorombic la tetragonal. Aceste transformări

sunt marcate prin splitarea sau apariția unui umăr al picului de intensitate mare de la $\sim 600 \text{ cm}^{-1}$, datorita intensificării modului vibrațional de strângere $E_g (u_2)$ la $569\text{-}572 \text{ cm}^{-1}$ [225]. La faza tetragonală picul este larg, acesta se splitază și devine mai ascuțit odată cu trecerea la o formă de simetrie redusă (O) [221]. O valoare FWHM mai mare este legată de o cristalinitate ridicată dar și de un conținut mai mare de fază de simetrie joasă ortorombică sau monoclinică [221, 226]. Această comportare pare a fi cauzată de scăderea stresului intern determinat de alungirea distanței dintre ionii Nb^{5+} și ionii de oxigen coordonați, rotirea octaedrelor și mărirea parametrilor la rețeaua ortorombică față de cea tetragonală (a, b și c) [225]. Se cunoaște că, la fazele polimorfe ortorombic și tetragonal s-a raportat o înclinare diferită a octaedrelor NbO_6 , ceea ce s-a observat și în rezultatele XRD unde după rafinarea structurală Rietveld fazele ortorombice aveau celula elementară mai mare decât cea tetragonală [225].

- Micrografiile SEM au pus în evidență aglomerări bine cristalizate cu morfologie cuboidă formate prin coalescență, cu dimensiuni maxime de până la $2.9 \mu\text{m}$ în pondere de până în 1% și dimensiuni medii cuprinse între 98 - 464 nm, cu pondere majoritară între 100-300 nm. S-a constatat o dependență între dimensiunea medie a particulelor și x în sensul că soluțiile solide cu conținut mediu de K mai mare de 0.5 dar și cele conținând o pondere mai mare de fază O au dimensiunile medii mai apropiate de limita de 300 nm. S-a constatat de asemenea faptul că temperatura superioară a tratamentului hidrotermal de 250°C poate potența creșterea dimensiunii medii a granulelor de exemplu la proba K8N2_200_30 are o dimensiune medie a granulelor de $116 \pm 12.23 \text{ nm}$ iar K8N2_250_30 de $301 \pm 30.29 \text{ nm}$, dar nu se verifică la K8N2_200_60 ($181 \pm 10.7 \text{ nm}$) vs. K8N2_250_60 cu $221 \pm 11.2 \text{ nm}$ sau K8N2_200_90 ($464 \pm 11.6 \text{ nm}$) și K8N2_250_90 ($369 \pm 19.6 \text{ nm}$). Dealtfel, nici creșterea duratelor de palier al tratamentului hidrotermal de la 30 la 90 minute nu determină formarea cristalelor de dimensiuni mai mari de exemplu în seria K7N3 la 200°C la 30 minute dimensiunea medie este de 275 nm la 60 minute este 98.5 nm iar la 90 minute 403 nm, din cauza proceselor de dizoluție care apar în mediul de reacție în timpul tratamentului hidrotermal asistat de microunde care conduce la modificarea conținutului de K și Na al soluțiilor solide. Astfel, constatarea a fost că durata și temperatura tratamentului asociat cu efectul energiei microundelor vor influența evoluția fracției molare x a $\text{K}_x\text{Na}_{1-x}\text{NbO}_3$, care va dicta ponderea mai mare sau mai mică a fazei cristaline O sau T, dimensiunea cristalitelor dezvoltate în rețeaua O fiind mai mare decât cele T, conducând astfel la dimensiuni mai mari ale particulelor de forme cuboide (Figura 9). În dimensiunea medie a particulelor de $\text{K}_x\text{Na}_{1-x}\text{NbO}_3$ a fost determinată prin măsurători din imaginile SEM, iar cele ale cristalitelor au fost obținute în urma rafinării structurale Rietveld

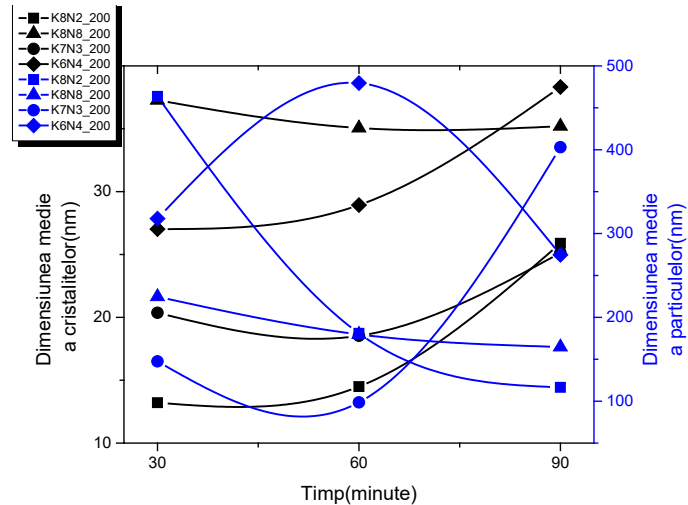


Figura 9 Variația dimensiunii medii a cristalitelor și dimensiunea medie a particulelor în funcție de timpul de tratament HTMW la 200°C, dimensiunea medie a particulelor de $K_xNa_{1-x}NbO_3$ a fost determinată prin măsurători din imaginile SEM, iar cele ale cristalitelor au fost obținute în urma rafinării structurale Rietveld

- Determinarea coeficientului piezoelectric în condiții neconvenționale, pe discuri de pulbere KNN crude, nepolarizate, s-a efectuat pe o selecție de 5 probe având aceeași durată de palier (30 minute) și temperatura 200 ori 250°C (S1 K8N2_250_30, S2 K8N2_200_30, S3 K7N3_200_30, S4 K6N4_200_30, S5 K8N8_200_30)(Figura 10). După cum era de așteptat, cea mai ridicată valoare a d_{33} s-a înregistrat pentru K8N2_250_30 având formula estimată $K_{0.47}Na_{0.53}NbO_3$, urmata de K7N3_200_30 cu $K_{0.43}Na_{0.57}NbO_3$, cele mai apropiate compoziții față de $K_{0.5}Na_{0.5}NbO_3$ cele mai mari valori ale d_{33} de 0.8 pC/N la frecvența de 110 Hz, pentru proba K8N2_250_30 generând o soluție solidă cu valoarea fracției molare de $x = 0,47$ cu coexistența cristalelor în simetrie O și T. Cea mai mică valoare d_{33} s-a înregistrat pentru proba K6N4_200_30, la toate frecvențele testate. Golurile, porii, fisurile din structura corpurilor ceramice concentrează sarcina electrică, împiedicând deplasarea și concentrarea sarcinii mobile spre suprafețele materialului, generând un răspuns piezoelectric slab la sarcina mecanică, deci o valoare scăzută a d_{33} . densitatea relativă măsurată pe corpurile cilindrice crude nu depășește 65%, în consecință suprafețele epruvetelor nu concentrează densitatea de sarcină generată de compresiunea aplicată pe acestea, iar valoarea coeficientului este cu mult sub valorile d_{33} raportate pentru KNN sinterizat și polarizat [158, 232]. De asemenea, polarizarea materialului are scopul de a crește densitatea de sarcină pe suprafețele libere ale epruvetelor cilindrice, prin stimulare electrică exterioară, cu rezultate pozitive asupra valorilor efectului piezoelectric. Măsurarea constantei piezoelectrice pe epruvete crude, în condiții neconvenționale, a avut scopul de a aprecia dacă compoziția soluției solide influențează valoarea d_{33} , chiar în condițiile în care pulberile analizate au fost deficitare densificate.

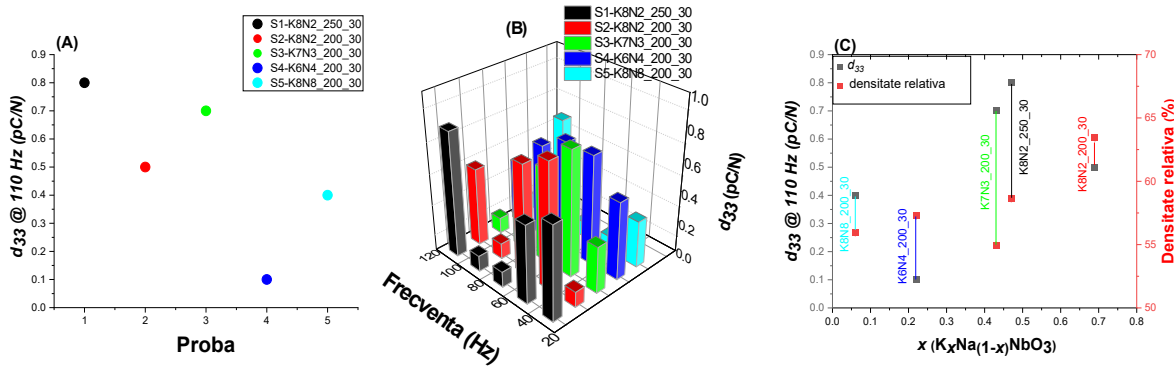


Figura 10 Constanta piezoelectrica d_{33} (A) pentru K8N2_250_30(S1), K8N2_200_30(S 2), K7N3_200_30(S3), K6N4_200_30(S 4), K8N2_200_30(S5) la 110Hz, (B) variația d_{33} cu frecvența(30-110 Hz) (C) variată d_{33} cu x și densitatea relativă de presare pe discuri crude, nesinterizate

CAPITOLUL 5 Sinteza și caracterizarea compozițională, morfo-structurală și a comportării *in vitro* a compozitelor sub forma de scaffolduri, granule și gel în sistemul HA-KNN-CS

SINTEZA

Sinteza compozitelor în sistem HA-KNN-CS a presupus obținerea hidrogelurilor de chitosan din pulberea de polimer insolubil în apă, în varianta cu masă moleculară mare (CSH) și mică (CSL), prin solubilizarea în soluția apoasă de acid acetic cu concentrația de 1.5 și 3%, rezultând trei hidrogeluri de chitosan CSL₃, CSL_{1.5} și CSH_{1.5}. A urmat înglobarea amestecurilor de pulberi de HA și KNN prin omogenizare magnetică menținând rapoartele 30%CS și 70% (HA+KNN) și în cazul amestecurilor de pulberi variind proporția HA/KNN la 10/90, 50/50, 90/10, conducând la obținerea compozitelor sub forma de gel. Liofilizarea hidrogelurilor compozite a fost utilizată pentru a obține variantele tip scaffold poros prin menținerea gelurilor compozite timp de 96 h în regim de depresiune $p \sim 0.01$ mbari (vid) și temperatura de -70°C , granulele compozite (fulgii) putând fi obținute din scaffolduri prin crio-granulare cu N₂ lichid.

CARACTERIZAREA COMPOZIȚIONALĂ ȘI MORFO-STRUCTURALĂ A GELURILOR, PULBERILOR ȘI SCAFFOLDURILOR DE COMPOZITE ÎN SISTEMUL HA-KNN-CSL_{1.5}

Au fost caracterizate cele trei variante de hidrogeluri de chitosan cu aceeași concentrație de 2%(m/v) CSL₃, CSL_{1.5} și CSH_{1.5}. Încă de la prepararea acestora s-a constatat că hidrogelul CSL₃, are o vâscozitate foarte mică (156mPa/s, 100 rpm și 24.5°C) și un pH prea mic (3.82), ceea ce ar fi creat suspiciunea segregării pulberilor și ar fi putut determina descompunerea hidroxiapatitei după înglobare; hidrogelul CSH_{1.5}, ales pentru potențialul de a genera cele mai bune efecte antibacteriene, antiinflamatoare și hemostatice, a creat dificultăți de solubilizare în soluția apoasă de acid acetic 1.5% chiar după 96 de ore de omogenizare, rămânând cantități importante de faza cristalină nesolubilizate depistate în

difractograma de raze X efectuată pe scaffoldurile liofilizate; gelul CSL_{1.5} a manifestat cele mai bune rezultate de stabilitate la absorbția de apă și dezintegrare, omogenitate la înglobarea pulberilor dar și cele mai bune rezultate de biocompatibilitate prin testul MTT și efect antibacterian inoculat pe culturi bacteriene atât gram-pozitive (*S. aureus*) cât și gram negative (*E. coli*) dar și pe tulpini fungice (*C. albicans*).

- În urma analizei de difracție de raze X se confirmă faptul că între cele trei componente ale compozitelor, particulele nanometrice de HA, hidrogelul de chitosan cu 1.5% acid acetic și KNN, nu apar reacții chimice, dar sunt posibile interacțiuni electrostatice ale grupelor funcționale ale chitosanului (hidroxil, carboxil, amino) cu cationi sau grupări cu caracter anionic din pulberile de HA și KNN. Profilele picurilor de difracție ale materialelor compozite sunt foarte asemănătoare cu paternurile pulberilor cristaline de HA și KNN, sunt diminuate ca amplitudine și mult mai largi comparativ cu paternurile pulberilor înglobate, matricea polimeră a chitosanului, ca fază amorfă estompează difracția razelor incidente X de pe material (Figura 11).

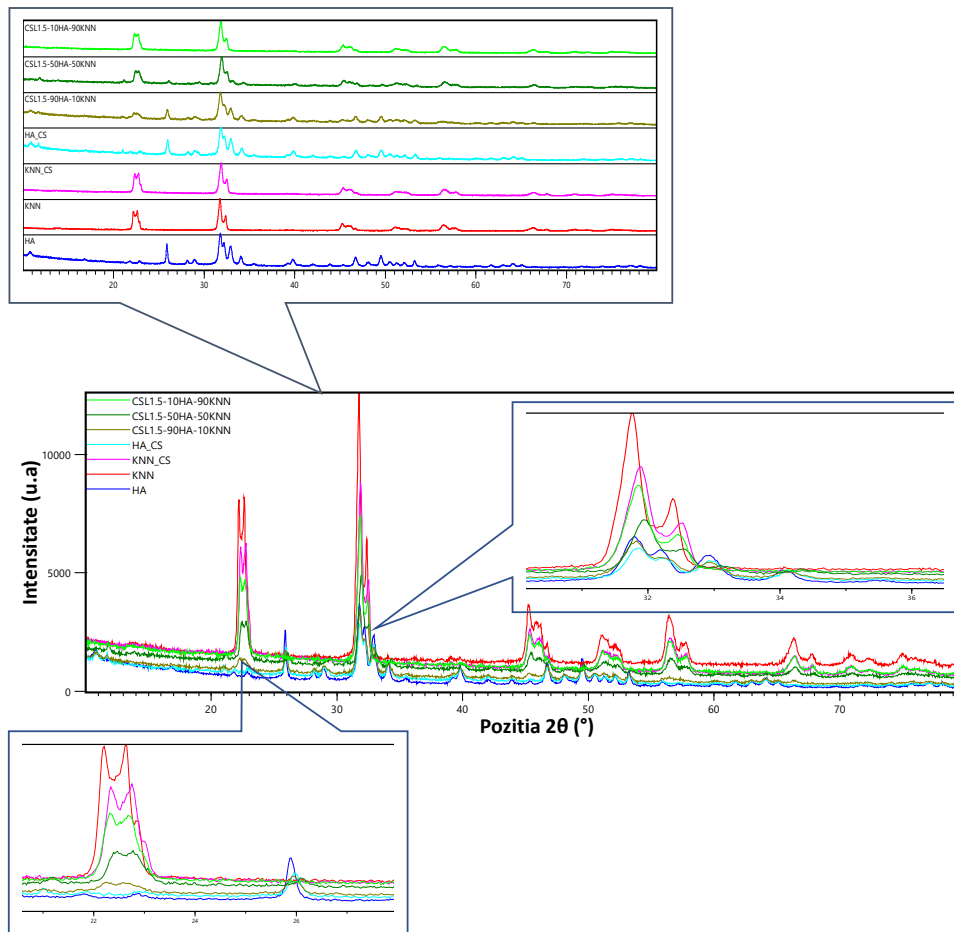


Figura 11 Difractogramele de raze X comparative pentru scaffoldurile liofilizate de biocompozite bi și tri component CSL_{1.5}-HA-KNN, CSL_{1.5}-HA, CSL_{1.5}-KNN

Difractogramele compozitelor se aseamăna și în cazul comparației dintre cele trei variante de chitosan CSL_{1.5}, CSL₃, și CSL_{1.5}, influența tipului fazei amorphe în profilul picurilor de difracție este nesemnificativă.

- Spectrele FTIR au pus în evidență legăturile caracteristice chitosanului, vibrațiile caracteristice grupelor PO₄ din HA și Nb-O-Nb din octaedrele NbO₆ ale soluției solide KNN, suprapuse cu cele ale legăturii glicozidice și cele ale nucleelor piranozice, fără modificarea pozițiilor acestora, indicând menținerea celor trei componente ale compozitelor fără interacțiuni chimice (Figura 12). Spectrele FTIR au permis estimarea gradului de acetilare a chitosanului după solubilizare în acid acetic. Creșterea gradului de acetilare poate scădea efectul antibacterian al scaffoldurilor compozite prin scăderea potențialului pozitiv al grupărilor amino libere, dar nu afectează efectul hemostatic al acestora. Cu toate acestea, acidul acetic prezent are acțiune citostatică și antiinflamatoare, dar prin creșterea solubilizării scaffoldurilor în fluidele biologice, poate favoriza pozitiv viteza de biodegradare a chitosanului la aminoacizi [143, 144].

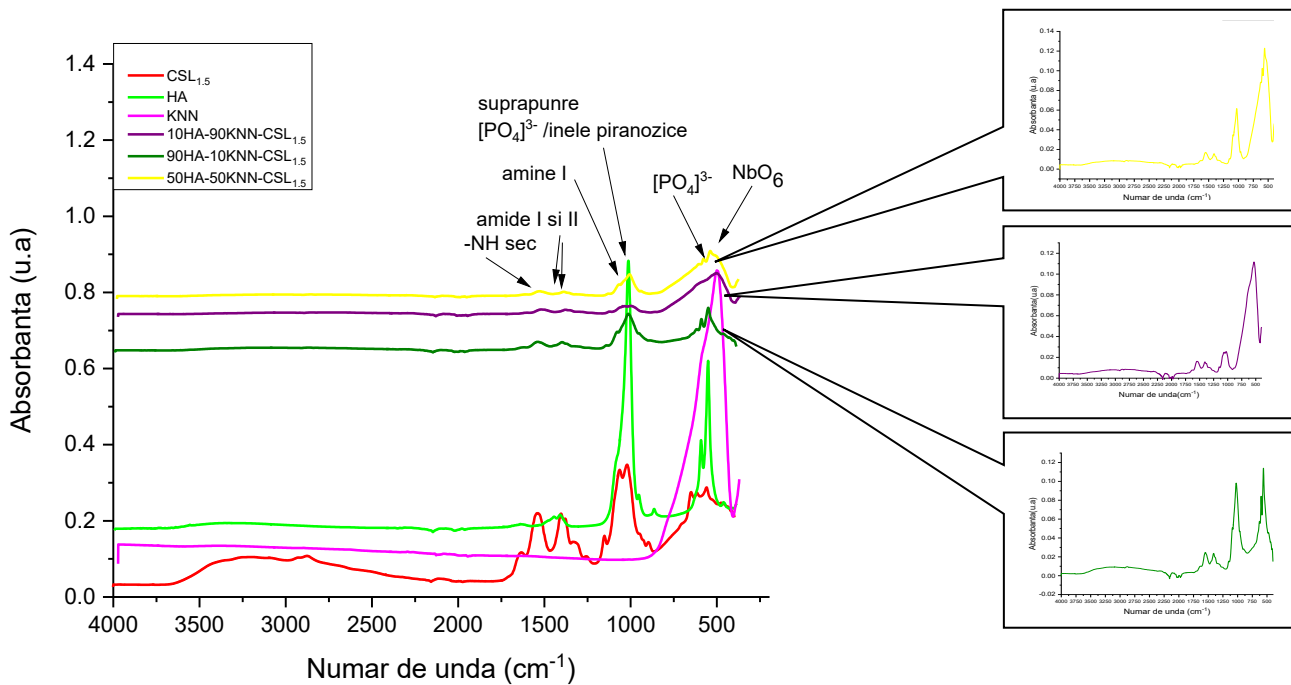


Figura 12 Spectrele FTIR comparativă pentru compozitele 10HA-90KNN-CS, 90HA-10KNN-CS, 50HA-50KNN-CS comparativ cu fazele constituente HA, KNN, CS

- Din analiza BET – suprafața specifică cea mai mare o au compozitele cu conținut mai mare de HA pentru că pulberea înglobată este mezoporoasă, porii creați în scaffoldurile liofilizate sunt în principal din domeniul microporilor, după alura izotermelor, dar datele încadrează diametrul maxim al porilor la mezopori, uniform distribuiți valorile din datele de distribuție arată diferențe foarte mici între probe. Analiza fiind făcută pe granulele de compozit, explică constatările cu privire la dimensiunea porilor din domeniul macroporilor pentru scaffolduri. Corelând datele de dimensiunea porilor și suprafața specifică BET pe granule, se observă că suprafețele specifice au

valori medii de ordinul zecilor de metrii pătrați pe gram deci porii nu sunt interconectați și deschiși. Aceste constatări sunt în acord cu observațiile formulate prin analiza microscopiei electronice de baleiaj cu privire la textura poroasa a scaffoldurilor dar și a granulelor, la dimensiunea macroporilor în ambele variante, la menținerea morfologiei pulberilor de HA și KNN înglobate, care poate atesta absenta interacțiunilor chimice cu formarea altor faze nedorite(Tabel 3).

Tabel 3 Variația suprafețelor specifice BET și Langmuir și a dimensiunilor porilor în seria de granule din materiale compozite din seria HA-KNN- CSL_{1.5}

Proba	HA- CSL _{1.5}	KNN- CSL _{1.5}	10HA-90KNN- CSL _{1.5}	50HA-50KNN- CSL _{1.5}	90HA-10KNN- CSL _{1.5}
Caracteristica					
Suprafața specifică BET(m ² /g)	13.1603 ±0.6217	8.4628 ±0.3628	18.3722 ±0.7329	21.8068 ±0.4316	24.0306 ±1.8824
Suprafața specifică Langmuir (m ² /g)	22.0560 ±2.4558	13.9256 ±1.4344	29.5808 ±2.8841	33.2305 ±2.1907	48.8549 ±9.1257
Grosimea medie a porilor- adsorbție (4V/A BET)(nm)	5.0686	5.0770	5.1412	5.3601	5.1631
Diametrul mediu al porilor- adsorbție(4V/A) (nm)	4.5018	4.2955	4.5169	4.4808	4.9349
Diametrul mediu al porilor- desorbție(4V/A) (nm)	4.4955	4.4680	4.3080	4.2678	4.0609
Diametrul maxim al porilor(nm)	154.6	158	161.2	74.6	154.6
Diametrul minim al porilor(nm)	1.8	1.6	1.8	1.6	1.7

- Prin imersarea în apă a scaffoldurilor compozite s-a constatat ca structurile macroporoase ale acestora pot absorbi o cantitate de apa de 20 de ori mai mare decât masa uscată a acestora, iar scaffoldurile de chitosan cu pana la 50 de ori mai mare. Apar diferențe nesemnificative de valori ale adsorbției de apă între probele aparținând aceleiași serii (10HA-90KNN-CSL_{1.5}, 90HA-10KNN-CSL_{1.5}, 50HA-50KNN-CSL_{1.5}) cât și comparând cu probele din seria HA-KNN-CSH_{1.5} . Totuși, scaffoldurile liofilizate de compozite având matricea de chitosan CSL_{1.5}, au manifestat o stabilitate mai buna de fragmentare la gonflare în urma adsorbției de SBF, după primele 60 minute, ceea ce este de dorit manifestând în practică, o mai bună manevrabilitate (Figura 13).

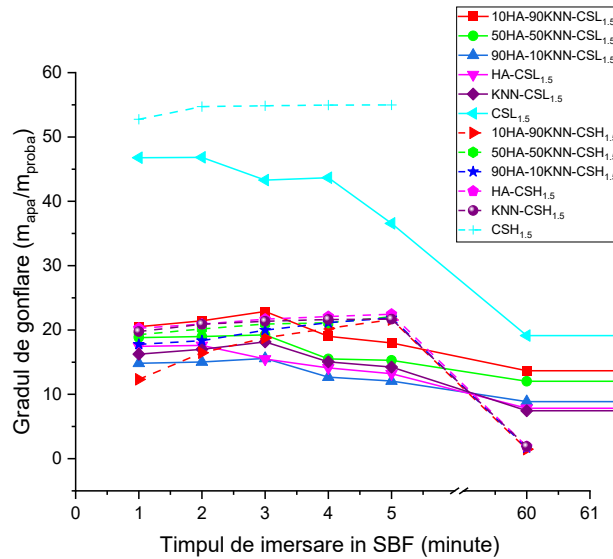


Figura 13 Variația gradului de gonflare a probelor de bi-component și tri-component în funcție de durata de imersare în SBF

- Determinarea gradului biodegradabilității scaffoldurilor compozite prin imersarea acestora în SBF și păstrare în incubator la 37°C timp de 28 de zile, nu s-a putut calcula prin metoda pierderii de masă raportată, întrucât scaffoldurile incubate 7 și 28 de zile în SBF, nu mai aveau consistență pentru a fi cântărite. Scaffoldurile incubate au fost uscate în aer la temperatura camerei pentru o durată de 48 h, în vederea evaluării biodegradării, prin efectuarea analizelor elementale EDS, a spectrelor FTIR și prin imaginile SEM care puteau evidenția noi morfologii de faze cristaline sau amorfe apărute în urma eventualelor reacții chimice de descompunere sau recristalizare pe durata incubării. În toate spectrele FTIR, inclusiv pentru scaffoldurile de chitosan CSH_{1.5}, CSL₃, și CSL_{1.5} (Figura 14), se regăsesc vibrațiile de întindere pentru legăturile caracteristice aceto-glucosaminelor, la care se manifestă degradarea lanțurilor polimere, chiar în absența enzimelor, posibil prin hidroliza acidă. Benzile de absorbție situate între 500-1100 cm⁻¹ reprezintă vibrațiile caracteristice grupelor funcționale PO₄³⁻ sau a octaedrelor NbO₆ din pulberile de HA și KNN, care se suprapun vibrațiilor legăturilor glicozidice sau a atomilor de C din nucleele zaharidice. Comparativ cu spectrul FTIR al probelor compozite înainte de incubare în SBF (Figura 15).

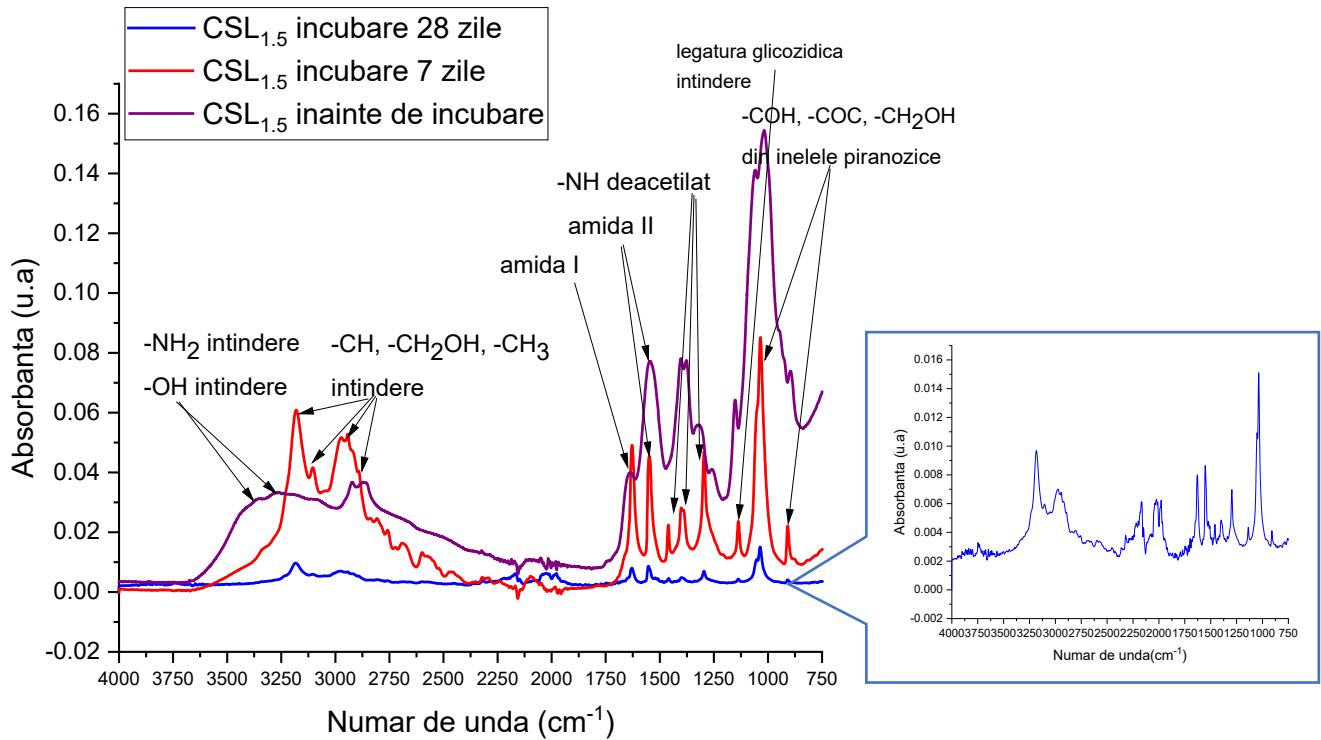


Figura 14 Spectrele FTIR comparative pentru scaffoldurile de chitosan CSL_{1.5} înainte și după imersare în SBF pentru 7 și 28 zile

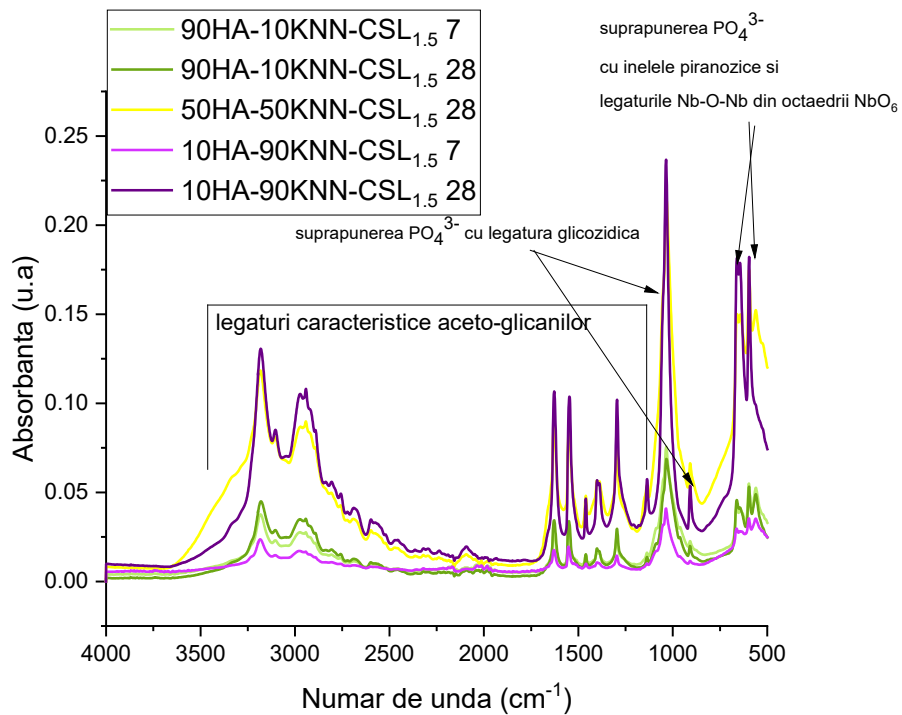


Figura 15 Spectrele FTIR comparative pentru scaffoldurile de compozite 90HA-10KNN-CSL_{1.5}, 50HA-50KNN-CSL_{1.5} și 10HA-90KNN-CSL_{1.5} A) după imersare în SBF pentru 7 și 28 zi

➤ Imaginile SEM pun în evidență modificarea morfologiei suprafeței scaffoldurilor după incubarea în SBF :

- după 7 zile, marcând degradarea polimerului și expunerea la suprafață a particulelor de HA și KNN , evidențiat și prin procente ridicate de Ca, P, Nb, K pe suprafețele scanate(Figura 16);
- la 28 de zile chitosanul este avansat degradat prin modificarea texturii suprafeței scaffoldurilor care marchează cristalizarea sărurilor adsorbite și prin scăderea conținutului de compuși organici conținând elemente precum C și O (Figura 17) .

Imaginile SEM arata densificarea scaffoldurilor și păstrarea intactă a morfologiei granulelor de KNN și HA, chiar daca sunt așteptate (estimate) pierderi ale conținutului de cationi (Ca respectiv Na și K) din rețelele cristaline ale pulberilor înglobate.

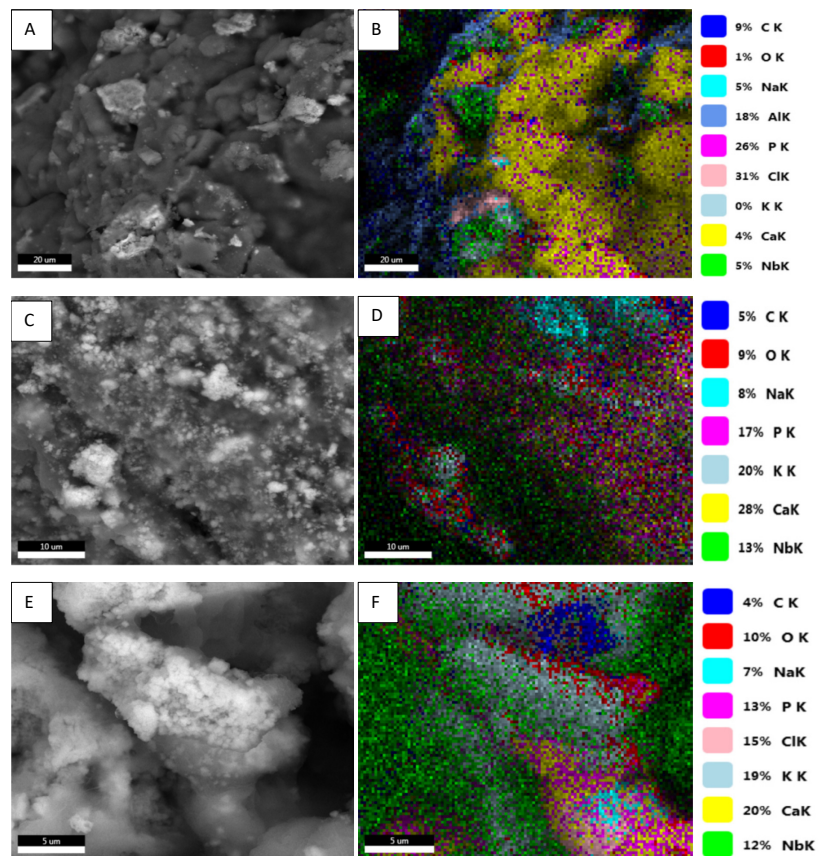


Figura 16 Imaginile SEM(1000x, 2000x, 5000x), mappingul distribuției elementelor identificate EDS și compoziția elementală cantitativă EDS pentru scaffoldurile HA-KNN-CSL_{1.5} după incubare 7 zile în SBF și uscare la temperatura camerei (23.5°C) 24h: (A,B) 10HA-90KNN-CSL_{1.5} (C,D) 50HA-50KNN-CSL_{1.5} (E,F) 90HA-10KNN-CSL_{1.5}

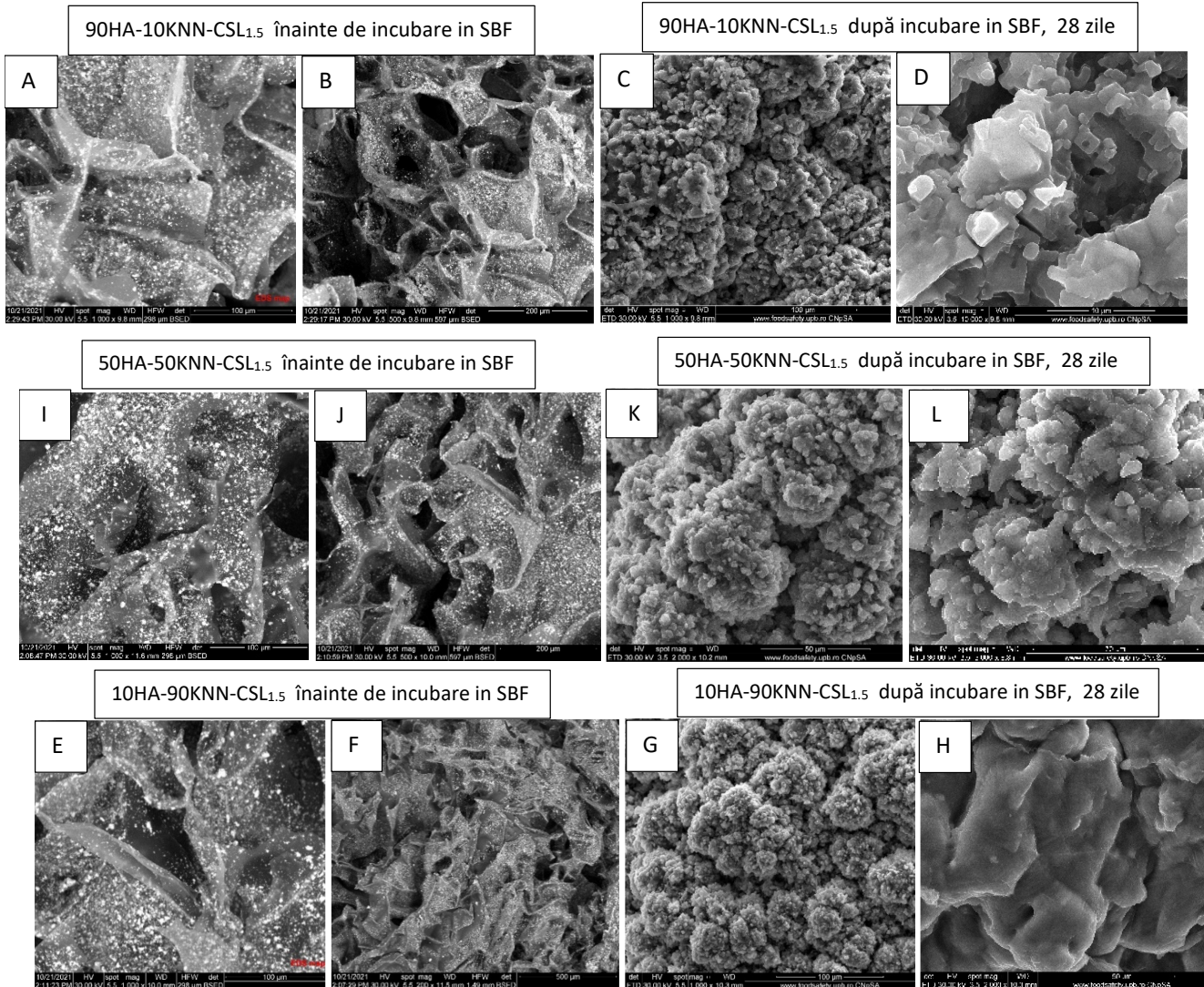


Figura 17 Imaginile SEM și analiza cantitativă EDS pentru scafoldurile de composite din seria HA-KNN-CSL_{1.5} înainte și după incubare în SBF

- La gelurile de chitosan CSH_{1.5}, CSH₃, CSL_{1.5}, CSL₅, efectul antibacterian și antifungic crește odată cu creșterea concentrației de acid acetic folosit la solubilizare, masa de chitosan conținută fiind aceeași la toate probele. Fiind în directă dependență de pH, vâscozitatea gelului și de amprenta de difuziune a acestuia cu mediul de cultura microbian. Din acest motiv probele conținând chitosan cu masa moleculara mare nu exercita efecte antimicrobiene mai bune decât chitosanul cu masă moleculară mică, care conform raportărilor, conține mai puține grupări amino (cationice) decât primul (Figura 18).

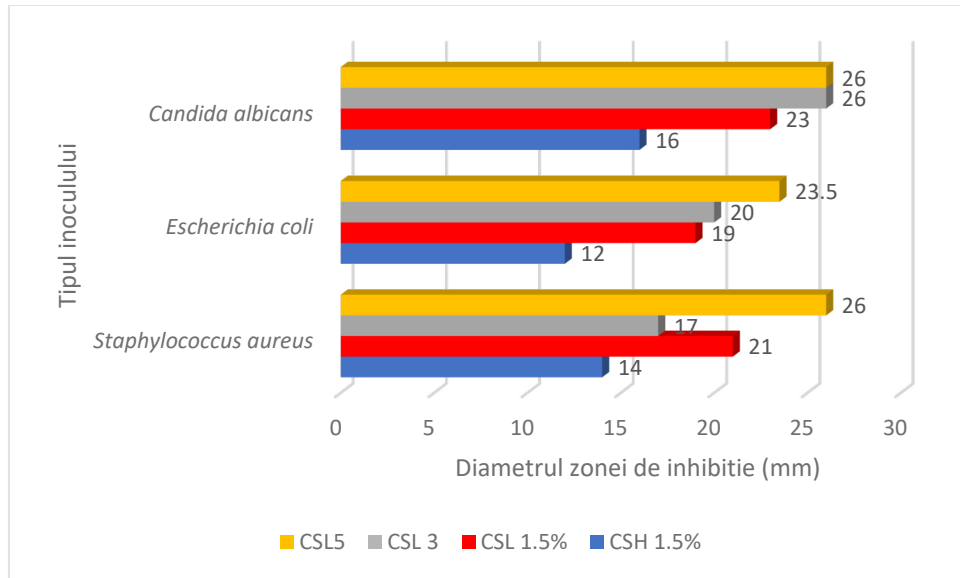
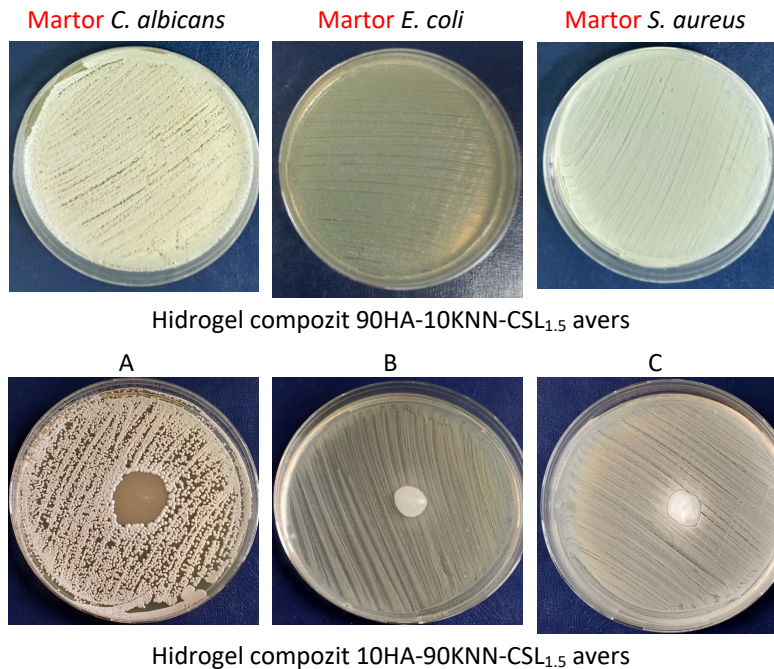


Figura 18 Diametrul zonei de inhibiție prin metoda disc difuzimetrică în spot pentru hidrogelurile de chitosan cu masa moleculară mică (CSL) și masa moleculară mare (CSH) cu concentrația acidului acetic de 1.5, 3 și 5%, pe inocul de *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*

Rezultatele obținute au arătat faptul că proba CSL_{1.5} a exercitat cea mai bună activitate antimicrobiană față de toate cele 3 tulpini (*S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*), având diametrul zonei de inhibiție de 21 mm, 19 mm, respectiv 23,5 mm (Figura 18)

Gelurile compozite manifestă o activitate antibacteriană mai mare cu cât conținutul de pulbere piezoelectrică este mai mare, chiar în absența stimulării externe (Figura 19).



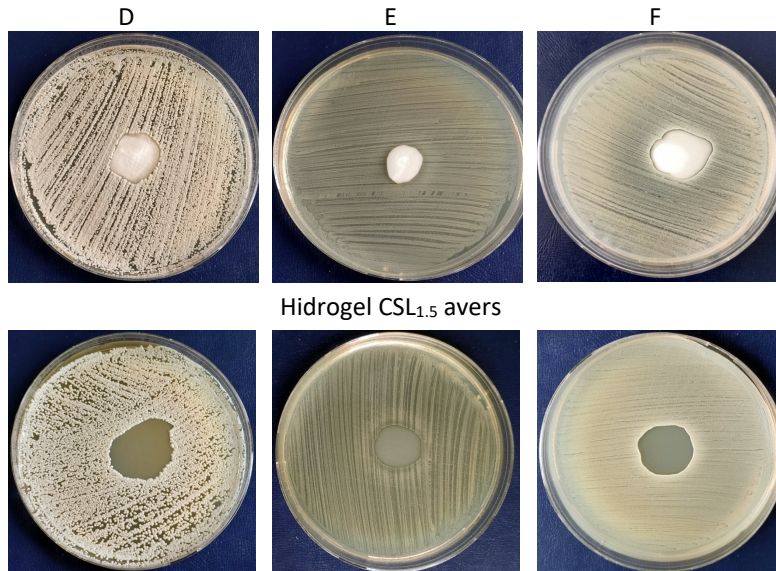


Figura 19 Efectul antibacterian prin metoda disc difuzimetrică-aplicare în spot al hidrogelurilor compozite 10HA-90KNN-CSL_{1.5} și 90HA-10KNN-CSL_{1.5} pe inoculi culturile de tulpini bacteriene (*E.coli* și *S. aureus*) și fungi (*C. albicans*)

Acțiunea antibacteriană a pulberilor KNN piezoelectrice înglobate în matricea polimeră se poate amplifica în condițiile valorificării efectului piezoelectric, la aplicarea unei tensiuni mecanice care conduce la polarizarea de suprafață a granulelor de soluție solidă. Cu toate că acest stimul extern nu a fost aplicat asupra probelor testate, gelurile 10HA-90KNN-CSL_{1.5} formează o zona de inhibiție de dezvoltare a bacteriilor gram pozitive (*S. aureus*) chiar mai mare decât gelul CSL_{1.5} și un efect mai slab asupra *E.coli*. Cele doua geluri compozite au arătat efecte antifungice similare cu ale gelului CSL_{1.5} [24, 49, 244](Figura 20).

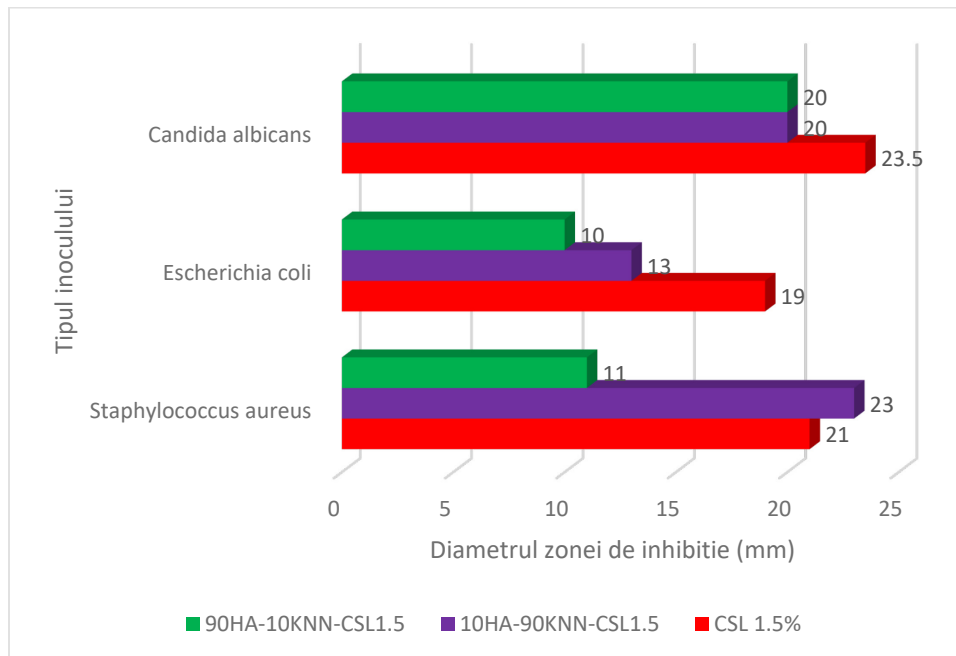


Figura 20 Diametrul zonei de inhibiție prin metoda disc difuzimetrică în spot pentru hidrogelurile compozite 10HA-90KNN-CSL_{1.5} și 90HA-10KNN-CSL_{1.5}, comparativ cu gelul de chitosan CSL_{1.5} pe inocul de *S. aureus*, *E. coli* și *C. albicans*

Scaffoldurile de compozite prezintă o activitate antibacteriană foarte slabă, chiar cele cu conținutul cel mai mare de KNN, din cauza inexistenței mediului apos care să faciliteze interacțiunea chimică și difuziunea moleculelor polarizate[96, 247].

- Viabilitatea celulară individual în prezența pulberilor de HA și KNN a fost superioară probei CTRL, pulberile determinând creșterea moderată (<13%) a activității celulelor osteoblaste MG-63 (Figura 21). Totuși, biocompatibilitatea pulberilor de KNN cu celulele MG-63, s-au dovedit ușor mai scăzută decât a pulberii de HA, ceea ce era de așteptat. Biocompatibilitatea pulberilor HA și KNN s-a reflectat în rezultatele testului MTT la 24h la probele compozite sub forma de scaffold și geluri. Astfel se poate aprecia că scaffoldurile (Figura 22) sau gelurile de biocompozite, nu au avut un comportament citotoxic asupra culturilor de celule MG-63, dimpotrivă au exercitat asupra celulelor un efect de îmbunătățire a activității acestora, la durată scurtă de incubare (24h). Valori foarte mari ale viabilității celulare au manifestat compozitele sub forma de geluri comparativ cu scaffoldurile cu compozitii similare (Figura 23). Apreciată prin testul MTT, o viabilitate celulară prea mare, poate fi rezultatul unui stres oxidativ creat de biomaterialele incubate chiar și după scurt timp. Astfel, viabilitatea se traduce printr-o activitate metabolică mult mai intensă prin care celula sintetizează enzime reducătoare pentru anihilarea radicalilor liberi sau specii de oxigen reactive (ROS). Gelurile tuturor compozițiilor analizate conțin o concentrație de 1.5% acid acetic, care la scaffolduri este eliminată prin liofilizare. Acesta are o acțiune anti-tumorală demonstrată. Reactivitatea mai mare a gelurilor față de scaffolduri este determinată pe de o parte de conținutul mai mare de apă care crește interacțiunea dintre probă și mediul celular prin viteza mare de difuzie a speciilor reactive, dar și printr-o capacitate mărită de solubilizare a chitosanului în mediul de cultură celulară, indusă de mediul slab acid.

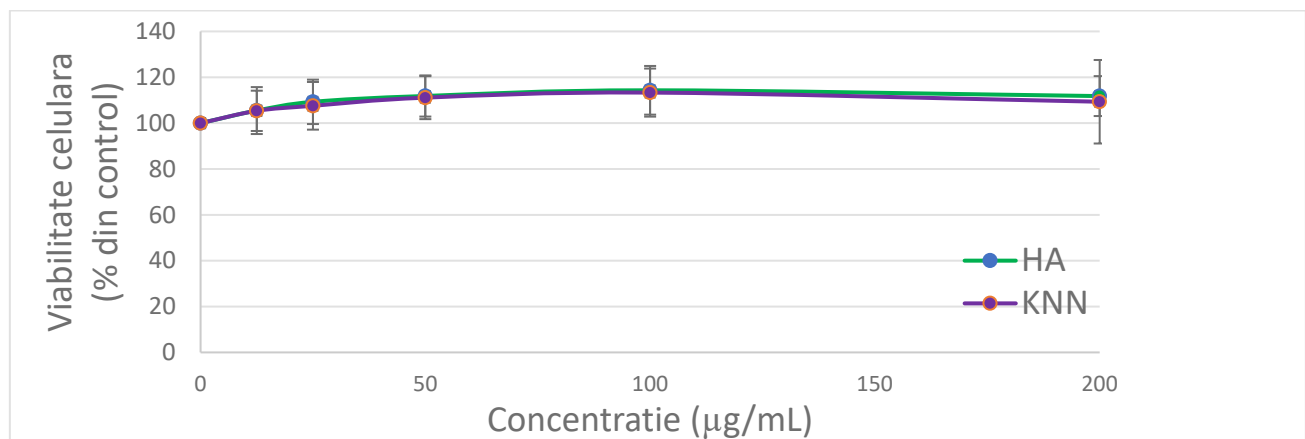


Figura 21 Viabilitatea celulelor MG-63 în prezența diferitelor concentrații de pulbere de HA și KNN (0-200 µg/mL) măsurată utilizând testul MTT la 24 h.

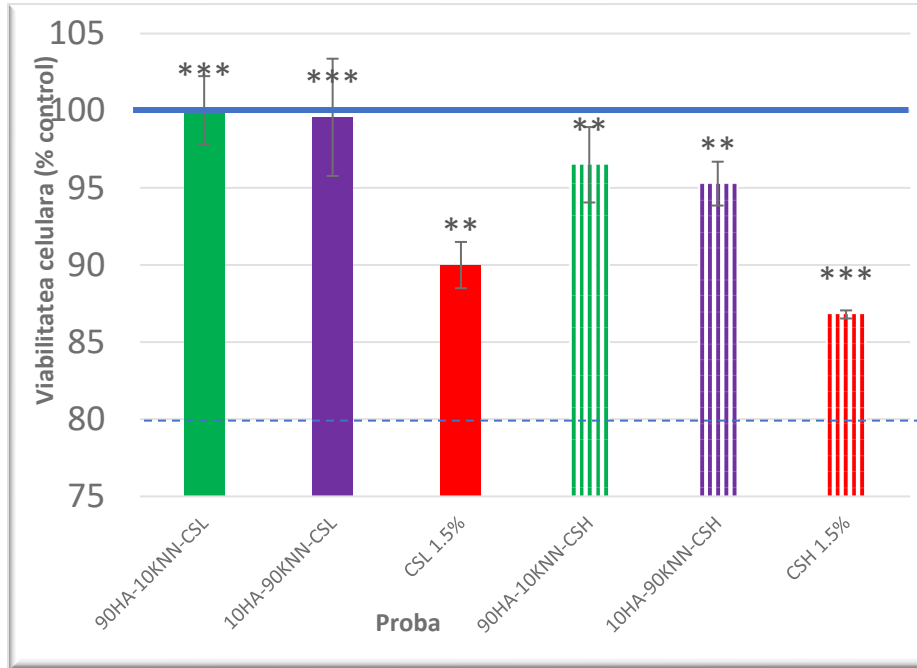


Figura 22 Viabilitatea celulara pentru probele tip scaford poros din materiale compozite în sistemul HA-KNN-CSL_{1.5} și HA-KNN-CSH_{1.5}, folosind testul MTT la 24h.

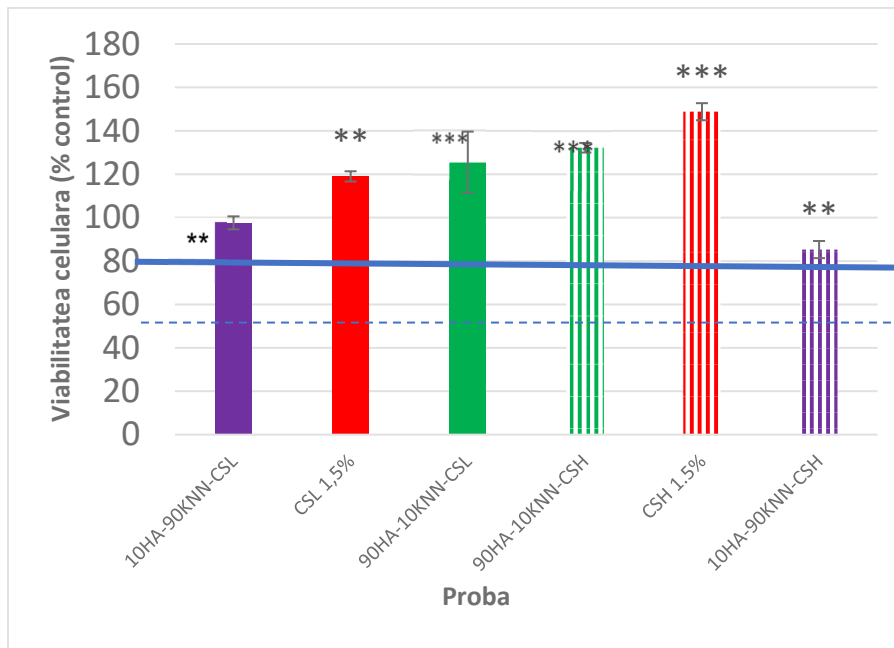


Figura 23 Viabilitatea celulara pentru probele sub forma de gel din materiale compozite în sistemul HA-KNN-CSL_{1.5} și HA-KNN-CSH_{1.5}, folosind testul MTT la 24h.

Nu s-a putut observa efectul osteoinductiv al conținutului de KNN din compozite asupra culturilor de osteoblaste MG-63, prin incubarea de scurta durată (24h) a scaffoldurilor și gelurilor compozite nepolarizate. Pentru exercitarea comportamentului piezoelectric al compozitelor în sistem HA-KNN-CS, scaffoldurile și gelurile necesitau o stimulare externă, cum ar fi polarizarea electrică sau aplicarea tensiunilor mecanice pe durata măsurării efectului antibacterian și a viabilității celulare. Procedurile de polarizare a materialelor dense nu se putea aplica în cazul scaffoldurilor compozite poroase, iar aplicarea tensiunilor mecanice asupra acestora ar fi dus la distrugerea texturii poroase proiectate a scaffoldurilor. În plus, aceste metode nu simulează condițiile fiziologice. Totuși, s-a evaluat efectul non-toxic al soluției solide (biocompatibilitatea) atât ca pulbere cât și sub formă de scaffolduri și geluri compozite.

CONCLUZIILE GENERALE

Din capitolele I și II ale părții generale de analiză critică a stadiului actual al cercetării s-a concluzionat că în practica stomatologică actuală, una dintre cerințe pentru materialele de adiție osoasă de nouă generație este capacitatea acestuia de a reduce durata de refacere a osului *de novo*. Această cerință nu poate fi realizată prin utilizarea biomaterialelor cu compoziții mimetice cu țesutul osos, caz în care refacerea țesutului în mod fiziologic poate necesita, după caz, între 6 săptămâni și 2 luni, dar prin achiziția unor componente biocompatibile care să inducă accelerarea unor procese biologice, cum este piezoelectricitatea, acest timp poate fi redus. La nivelul cavitații bucale mai ales, pe durata masticației, tensiunile mecanice, realizate prin intermediul dentiției, sunt transmise țesutului osos al alveolelor dentare, reglând în acest mod procesele care țin de restructurarea osoasă. În absența dentiției corespunzătoare și a stimulului exogen de presiune, pe zonele afectate, osul alveolar se va resorbi în mod fiziologic.

Astfel, s-au ales trei compoziții în sistemul HA-KNN-CS, prin înglobarea pulberilor în hidrogelurile de chitosan, variind raportul masic dintre cele două pulberi HA și KNN (90/10, 10/90 și 50/50) menținând constant conținutul de chitosan de 30%. Sinteza componentelor HA, KNN și CS a urmărit obținerea compusului cu cele mai bune proprietăți, fiecare dintre componente aducând contribuții proprii dar sinergice la proprietățile funcționale ale compozitului. La sinteza HA având ca sursă coaja de ou, din cele cinci variante obținute, în urma caracterizării, s-a decis utilizarea variantei HA 1 cu particule de dimensiuni nanometrice cu morfologie de bare mezoporoase, obținută prin co-precipitare și maturare hidrotermală la 200°C, după un ciclu complet de 60 minute. Aceasta a demonstrat cea mai bună biocompatibilitate față de linia celulară de osteoblaste MC3T3 comparativ cu celelalte patru probe, viabilitate celulară mai bună comparativ cu granulele de os bovin Bio-Oss și care generează un stres oxidativ mai mic decât xenogrefele cu care a fost comparată. Dintre cele trei variante de hidrogeluri de chitosan testate, cele mai bune rezultate ca proprietăți antibacteriene și antifungice cât și inducând o bună viabilitate față de osteoblastele tip MG-63 comparativ cu proba CTRL a avut-o chitosanul cu masa moleculară mică și grad de deacetilare mediu solubilizat în soluție apoasă de 1.5% acid acetic glacial. Dintre cele 15 probe de KNN, cu cele mai mari valori ale coeficientului piezoelectric $d_{33} \sim 1.2\text{pC/N}$ o regăsim la specimenul $\text{K}_{0.47}\text{Na}_{0.53}\text{NbO}_3$, având granule submicronice cu morfologie cuboidă, obținută prin

maturare în condiții hidrotermale la 250°C la o durată de 30 minute. Acesta a manifestat o biocompatibilitate comparabilă cu a probei de HA la testarea viabilității celulelor osteoblaste MG-63 prin metoda MTT.

Caracteristicile morfo-structurale ale celor trei compoziții 10HA-90KNN-CSL_{1.5}, 50HA-50KNN-CSL_{1.5}, și 90HA-10KNN-CSL_{1.5} au fost asemănătoare, însă varianta de compozit cu conținut mare de pulbere piezoelectrică (10HA-90KNN-CSL_{1.5}) a demonstrat proprietăți antibacteriene față de *S. aureus* și *E. coli* și antifungice împotriva *C. albicans* superioare variantei cu 90% HA, chiar în absența polarizării prealabile sau stimulării electrice externe atât în formă de gel dar un efect mult mai slab sub formă de scaffold. De asemenea, viabilitatea celulelor osteoblaste MG-63 în contact cu probele 10HA-90KNN-CSL_{1.5} și 90HA-10KNN-CSL_{1.5} au arătat valori apropiate ale reductazei secretate și comparabile cu proba CTRL, în cazul gelurilor compozite dar valori mai reduse la scaffolduri, conform metodei de testare MTT.

CONTRIBUTII ORIGINALE

Fundamentat de cerința pieței materialelor de adiție osoasă cu aplicații stomatologice, care necesită durate de timp mai scurte de refacere a țesutului osos perialveolar, prealabil implanturilor dentare, s-au sintetizat trei specimene de compozite în sistemul HA-KNN-CSL care se pot prezenta sub formă de gel, granule poroase sau scaffolduri poroase.

Un prim element de originalitate constă în versatilitatea formei de prezentare a compozitelor sintetizate, având aceeași compoziție fazală: gel injectabil, scaffolduri poroase și granule/fulgi poroși, care facilitează adaptarea biomaterialelor la condiții clinice diferite de punere în operă și variația dimensiunii defectelor osoase.

Un alt element de originalitate al studiului constă în sistemul compozițional al materialelor de adiție osoasă elaborate: HA-KNN-CSL. Există numeroase studii în care se analizează comportarea *in vitro* a sistemelor compozite cu chitosan și hidroxiapatita, în variante de prezentare ca scaffolduri rigide, poroase sau dense, sau numeroase cercetări în care se studiază combinații titanat de bariu-hidroxiapatita sau chiar titanat de bariu - hidroxiapatita - collagen ca materiale compozite densificate prin sinterizare sau scaffolduri poroase generate prin diferite metode, inclusiv structuri stratificate de ceramica de niobat de sodiu și potasiu și hidroxiapatită, sinterizate la temperaturi înalte. Totuși, variantele compozitului tricomponent HA-KNN-CSL studiat în această lucrare, la care componentele pulverulente sunt înglobate în matricea polimeră creând un sistem cu proprietăți generate sinergic de cei trei compusi, este un concept de original. Polarizarea piezoelectrică, generată natural în momentul masticăției, a agregatelor granulare de KNN se transmite nanoparticulelor de HA aderente la acestea dar și matricei polimere de chitosan, potențând efectul osteopromotor al compozitelor, chiar în condițiile în care acesta este poros.

În cadrul tezei de doctorat a fost, de asemenea, abordată în mod original metoda de sinteză a pulberilor de niobat de sodiu și potasiu prin metoda hidrotermală asistat de microunde, cu durate scurte de tratament (sub 150 minute), la temperaturi foarte reduse (maxim 250°C), în exces de amestec alcalin și utilizând precursori foarte stabili chimic (Nb₂O₅). În cadrul studiului metodei s-a încercat stabilirea

parametrilor tehnologici pentru obținerea rezultatelor predictibile cu privire la compoziția soluțiilor solide sintetizate și confirmarea acestora prin diferite metode de investigare (spectre Raman, spectroscopia de fluorescență, difracția de raze X, imagistica SEM și spectrele EDS).

Constatări originale pot fi desprinse din diferite capitole ale studiului de exemplu tendința de cristalizare preponderent în sistem monoclinic a pulberilor de apatita carbonatata maturate prin metoda hidrotermala asistata de microunde, comparativ cu metoda clasica de maturare, constatare probată în urma rafinării structurale Rietveld; degradarea în SBF a chitosanului cu masă moleculară mică și grad mediu de deacetilare începe după primele ore de incubare, progresează între 7 și 28 de zile chiar în absența enzimelor specifice chitonaza sau lizozima; nanoparticulele de HA aderă la suprafețele pulberilor de KNN.

PERSPECTIVE DE CERCETARE VIITOARE

Perspectivile de cercetare se pot încadra în două direcții:

- Continuarea stabilirii comportamentului *in vitro* pentru compozițiile deja sintetizate în sistemul HA-KNN-CSL
 - Stabilirea unei metode de polarizare a scaffoldurilor poroase de compozite sintetizate prin liofilizare pentru potențarea efectului piezoelectric și determinarea îmbunătățirilor aduse de componenta KNN,
 - stabilirea comportării *in vitro* antibacteriana și a viabilitatii celulare la scaffoldurilor liofilizate după polarizare sau în condițiile aplicării unor stimuli microelectrici externi , apoi testarea activității de secreție a ATP-azei (prin continutul de luciferază) de către culturile celulare cu osteoblaste în contact cu scaffoldurile polarizate (GSH Test)
 - urmarirea comportarii *in vitro* a scaffoldurilor liofilizate dupa stimularea cu dispozitive LIPUS(LOW INTENSITY PULSED ULTRASOUND), tehnologie non-invazivă care utilizează frecventa pulsurilor de 1.5 MHz cu largimea de 200 μs, cu frecventa de reperare de 1kHz.
- realizarea unor scaffolduri dense din KNN prin sinterizare în condiții SPS, acoperirea cu suspensie gelica de chitosan și pulbere nanometrica de HA prin metoda de printare 3D și testarea comportarii *in vitro* și *in vivo* .

BIBLIOGRAFIA SELECTIVA

- [1] J. Botelho, V. Machado, Y. Leira, L. Proenca, L. Chambrone, J.J. Mendes, Economic burden of periodontitis in the United States and Europe: An updated estimation, J Periodontol, 93 (2022) 373-379.
- [2] G. Iviglia, S. Kargozar, F. Baino, Biomaterials, Current Strategies, and Novel Nano-Technological Approaches for Periodontal Regeneration, J Funct Biomater, 10 (2019).
- [3] Y. Lee, Association between osteoporosis and periodontal disease among menopausal women: The 2013-2015 Korea National Health and Nutrition Examination Survey, PLoS One, 17 (2022) e0265631.
- [4] S. Titsinides, G. Agrogiannis, T. Karatzas, Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review, Jpn Dent Sci Rev, 55 (2019) 26-32.

- [5] M. Khanijou, D. Seriwatanachai, K. Boonsiriseth, S. Suphangul, V. Pairuchvej, R.L. Srisatjaluk, N. Wongsirichat, Bone graft material derived from extracted tooth: A review literature, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 31 (2019) 1-7.
- [6] S. Prasad, R.C.W. Wong, Unraveling the mechanical strength of biomaterials used as a bone scaffold in oral and maxillofacial defects, *Oral Science International*, 15 (2018) 48-55.
- [7] I. Mencia Castano, Curtin, C. M.Duffy, G. P. O'Brien, F. J., Next generation bone tissue engineering: non-viral miR-133a inhibition using collagen-nanohydroxyapatite scaffolds rapidly enhances osteogenesis, *Sci Rep*, 6 (2016) 27941.
- [8] S. Kuroshima, M. Kaku, T. Ishimoto, M. Sasaki, T. Nakano, T. Sawase, A paradigm shift for bone quality in dentistry: A literature review, *J Prosthodont Res*, 61 (2017) 353-362.
- [9] J.G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, I.L.C. Chapple, S. Jepsen, K.S. Kornman, B.L. Mealey, P.N. Papapanou, M. Sanz, M.S. Tonetti, A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification, *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20 (2018) S1-S8.
- [10] W. Wang, K.W.K. Yeung, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioact Mater*, 2 (2017) 224-247.
- [11] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, W. Shu, 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering, *Bioact Mater*, 3 (2018) 278-314.
- [12] J. Venkatesan, B. Lowe, S. Anil, S.-K. Kim, M.S. Shim, Combination of Nano-Hydroxyapatite with Stem Cells for Bone Tissue Engineering, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16 (2016) 8881-8894.
- [13] M. Figueiredo, J. Henriques, G. Martins, F. Guerra, F. Judas, H. Figueiredo, Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes--comparison with human bone, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 92 (2010) 409-419.
- [14] Y. Zhang, L. Chen, J. Zeng, K. Zhou, D. Zhang, Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 39 (2014) 143-149.
- [15] Q. Xu, X. Gao, S. Zhao, Y.N. Liu, D. Zhang, K. Zhou, H. Khanbareh, W. Chen, Y. Zhang, C. Bowen, Construction of Bio-Piezoelectric Platforms: From Structures and Synthesis to Applications, *Adv Mater*, 33 (2021) e2008452.
- [16] B.E. Cameron, J. Wilson, Ricgard E. Clegg, David I. Leavesley, and Mark J. Percy, Mediation of Biomaterial-Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review, *Tissue Engineering*, 11 (2005) 1-18.
- [17] J. Pajarinen, T. Lin, E. Gibon, Y. Kohno, M. Maruyama, K. Nathan, L. Lu, Z. Yao, S.B. Goodman, Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing, *Biomaterials*, 196 (2019) 80-89.
- [18] J.J. El-Jawhari, E. Jones, P.V. Giannoudis, The roles of immune cells in bone healing; what we know, do not know and future perspectives, *Injury*, 47 (2016) 2399-2406.
- [19] L.C. Gerstenfeld, D.M. Cullinane, G.L. Barnes, D.T. Graves, T.A. Einhorn, Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation, *J Cell Biochem*, 88 (2003) 873-884.
- [20] G.S. Selders, A.E. Fetz, M.Z. Radic, G.L. Bowlin, An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration, *Regen Biomater*, 4 (2017) 55-68.
- [21] R.C. Lai, R.W. Yeo, S.K. Lim, Mesenchymal stem cell exosomes, *Semin Cell Dev Biol*, 40 (2015) 82-88.
- [22] S. Saidin, M.A. Jumat, N.A.A. Mohd Amin, A.S. Saleh Al-Hammadi, Organic and inorganic antibacterial approaches in combating bacterial infection for biomedical application, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 118 (2021) 111382.
- [23] A. Singh, A.K. Dubey, Various Biomaterials and Techniques for Improving Antibacterial Response, *ACS Applied Bio Materials*, 1 (2018) 3-20.
- [24] P.M. Kou, J.E. Babensee, Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials, *J Biomed Mater Res A*, 96 (2011) 239-260.
- [25] T.J.U. Thompson, M. Gauthier, M. Islam, The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone, *Journal of Archaeological Science*, 36 (2009) 910-914.

- [26] B.M. Marija Kosec, Andreja Bencan, and Tadej Rojac, KNN-Based Piezoelectric Ceramics, Piezoelectric and Acoustic Materials for Transducer Applications Springer, Boston, MA2008, pp. pp 81-102.
- [27] F. Rubio-Marcos, J.J. Romero, M.S. Martín-Gonzalez, J.F. Fernández, Effect of stoichiometry and milling processes in the synthesis and the piezoelectric properties of modified KNN nanoparticles by solid state reaction, Journal of the European Ceramic Society, 30 (2010) 2763-2771.
- [28] Y. Inagaki, K.-i. Kakimoto, I. Kagomiya, Ferroelectric Domain Characterization of Orthorhombic Sodium-Potassium Niobate Piezoelectric Crystals, Journal of the American Ceramic Society, 93 (2010) 4061-4065.
- [29] S. Kojima, J. Zushi, Y. Noguchi, M. Miyayama, Successive phase transition of lead-free ferroelectric sodium potassium niobate crystals studied by Raman scattering, Ferroelectrics, 532 (2019) 183-189.
- [30] J. Xing, L. Jiang, C. Zhao, Z. Tan, Q. Xu, J. Wu, Q. Chen, D. Xiao, J. Zhu, Potassium sodium niobate based lead-free ceramic for high-frequency ultrasound transducer applications, Journal of Materiomics, 6 (2020) 513-522.
- [31] Y. Ito, A. Tateyama, Y. Nakamura, T. Shimizu, M. Kurosawa, H. Uchida, T. Shiraishi, T. Kiguchi, T.J. Konno, M. Ishikawa, N. Kumada, H. Funakubo, High yield preparation of (100)c-oriented (K,Na)NbO₃ thick films by hydrothermal method using amorphous niobium source, Journal of the Ceramic Society of Japan, 128 (2020) 512-517.
- [32] J. BARCLAY, Injection of acetyc acid in cancer, British Medical Journal, (1866).
- [33] C. Gupta, A. Agrawal, N.D. Gargav, Role of Acetic Acid Irrigation in Medical Management of Chronic Suppurative Otitis Media: A Comparative Study, Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 67 (2015) 314-318.
- [34] X.S. Shaojie Lu, Deyong Cao, Yiping Chen, Kangde Yao, Preparation of Water-Soluble Chitosan, Journal of Applied Polymer Science, 91 (2004) 3497–3503.
- [35] M. Ioelovich, Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan, RRJC Volume 3 (2014).
- [36] T. Yao, J. Chen, Z. Wang, J. Zhai, Y. Li, J. Xing, S. Hu, G. Tan, S. Qi, Y. Chang, P. Yu, C. Ning, The antibacterial effect of potassium-sodium niobate ceramics based on controlling piezoelectric properties, Colloids Surf B Biointerfaces, 175 (2019) 463-468.
- [37] G. Tan, S. Wang, Y. Zhu, L. Zhou, P. Yu, X. Wang, T. He, J. Chen, C. Mao, C. Ning, Surface-Selective Preferential Production of Reactive Oxygen Species on Piezoelectric Ceramics for Bacterial Killing, ACS Appl Mater Interfaces, 8 (2016) 24306-24309.
- [38] A.S. Verma, A. Singh, D. Kumar, A.K. Dubey, Electro-mechanical and Polarization-Induced Antibacterial Response of 45S5 Bioglass-Sodium Potassium Niobate Piezoelectric Ceramic Composites, ACS Biomater Sci Eng, 6 (2020) 3055-3069.
- [39] P. Agalya, G. Suresh Kumar, R. Srinivasan, K.M. Prabu, G. Karunakaran, S. Cholan, E. Kolesnikov, M. Kim, Hydroxyapatite-based antibacterial bio-nanomaterials: an insight into the synthesis using mussel shell as a calcium source, physicochemical properties, and nanoindentation characteristics, Applied Physics A, 127 (2021).