

UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE POLITEHNICA BUCUREȘTI

Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii

Domeniu de doctorat: Inginerie Chimică

- Rezumat teză de doctorat -

Sinteza și caracterizarea biomaterialelor generate prin tehnici cu plasmă

Student doctorand:

Conducător de doctorat:

Ing. Maria-Elena ZARIF

Prof. Dr. Ing. Ecaterina ANDRONESCU

București

2025

Cuprins

Partea I. Tematica tezei de doctorat, metode și concepte.....	16
Capitolul 1 Fosfați de calciu.....	16
1.1 Clasificare și proprietăți.....	16
1.1.1 Fosfații monocalcici	19
1.1.2 Fosfații dicalcici	19
1.1.3 Fosfatul octacalcic	20
1.1.4 Fosfații tricalcici.....	20
1.1.5 Fosfat de calciu amorf	21
1.1.6 Hidroxiapatită cu deficit de claciu.....	21
1.1.7 Hidroxiapatită.....	21
1.1.8 Fluorapatită.....	22
1.1.9 Fosfat tetracalcic.....	22
1.1.10 Fosfați de calciu substituiți.....	23
1.2 Metode de sinteză	24
1.2.1 Metode uscate	25
1.2.2 Metode umede	25
1.2.3 Metode de temperatură înaltă	27
1.3 Tehnici de caracterizare	27
1.3.1 Microscopie electronica de baleiaj	28
1.3.2 Spectroscopie de raze X cu dispersie de energie.....	29
1.3.3 Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier	30
1.3.4 Spectroscopie de fotoelectroni cu raze X	31
1.3.5 Difracție cu raze X și difracție cu raze X la incidență razantă	31
1.3.6 Profilometrie.....	32

1.3.7	MTT	33
1.3.8	LDH.....	33
1.3.9	Teste antimicrobiene și antibiofilm.....	33
Capitolul 2	Utilizarea plasmelor la presiune atmosferică în stomatologie	35
2.1	Surse de plasmă la presiune atmosferică	36
2.2	Aplicații ale plasmei la presiune atmosferică în stomatologie	38
2.2.1	Restaurări dentare.....	39
2.2.2	Tratamente endodontice/de canal radicular.....	40
2.2.3	Albirea dinților	41
2.2.4	Decontaminare – îndepărtarea biofilmului și sterilizarea bacteriană	42
2.2.5	Prevenția cariilor și modularea biofilmului.....	44
Capitolul 3	Tehnici de depunere de filme subțiri.....	47
3.1	Pulverizare magnetron în radiofrecvență.....	48
3.2	Evaporare laser pulsată asistată de o matrice	60
Partea II. Rezultatele cercetării.....		70
Capitolul 4	Obiectivele cercetării.....	70
Capitolul 5	Îmbunătățirea fluorizării și modularea biofilmului cu plasmă la presiune atmosferică	71
Capitolul 6	Straturi compozite de fosfați de calciu/chitosan generate prin tehnici de plasmă și laser	86
Capitolul 7	Straturi compozite de fosfați de calciu dopați cu stronțiu/chitosan generate prin tehnici de plasmă și laser.....	112
Capitolul 8	Rolul Sr și al chitosanului asupra proprietăților biologice ale straturilor compozite generate prin tehnici de plasmă și laser	129
Capitolul 9	Straturi de fosfați de calciu generate în plasmă la putere rf mică – proprietăți fizico-chimice	159

Capitolul 10 Contribuții originale și concluzii generale	175
Capitolul 11 Perspective viitoare	182
Capitolul 12 Lista publicațiilor	184
Referințe	188

Cuvinte cheie: fosfați de calciu; plasmă la presiune atmosferică; stomatologie; fluorizarea smalțului dentar; modularea biofilmului bacterian; pulverizare magnetron în radiofrecvență; evaporare laser pulsată asistată de o matrice; chitosan; acoperiri de implanturi;

Teza de doctorat a fost structurată în două părți. **Prima parte**, “*Tematica tezei de doctorat, metode și concepte*”, descrie aspecte legate de fosfați de calciu (*calcium phosphates*: CaPs), tratamente de plasmă la presiune atmosferică (*atmospheric pressure plasma*: APP) în stomatologie și două tehnici de depunere de filme subțiri, pulverizarea magnetron în radiofrecvență (*radio-frequency magnetron sputtering*: RF-MS) și evaporarea laser pulsată asistată de o matrice (*matrix-assisted pulsed laser evaporation*: MAPLE). Prin urmare, prima parte a acestei teze are drept scop prezentarea contextului actual al cunoștințelor în domeniu.

Capitolul 1, “Fosfați de calciu”

Capitolul 1 începe cu prezentarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale CaPs. Fiecare CaP a fost tratat separat luând în considerare raportul Ca/P, densitatea, stabilitatea pH-ului, solubilitatea și sistemul de cristalizare. O discuție mai detaliată a fost prezentată despre structura hidroxiapatitei (HAp) și substituția CaPs.

Celula elementară a HAp (structură hexagonală, grupul spațial P6₃/m) conține [1–3]:

- 2 ioni OH⁻;
 - 6 ioni PO₄³⁻;
 - 10 ioni de Ca²⁺ distribuiți în două poziții, din care:
 - 4 ioni de Ca²⁺ sunt:
 - Distribuți în pozițiile Ca(I) (denumite și Ca1);
 - Aranjați în coloane;
 - Legați cu 9 atomi de hidrogen aparținând de 9 grupări PO₄³⁻ (6 legături
-

puternice și 3 slabe);

○ 6 ioni de Ca^{2+} sunt:

- Distribuți în pozițiile Ca(II) (denumite și Ca2);
- Aranjați într-o matrice triunghiulară;
- Legați cu 7 atomi de oxigen aparținând de 5 grupări PO_4^{3-} și o grupare OH^- ;

Pentru a mima compoziția țesutului osos, interesul pentru substituția CaPs cu diverși ioni a crescut. În literatura de specialitate a fost raportată substituția mai multor CaPs, însă cercetarea a fost axată în mare parte pe substituția HAp, componenta principală a țesutului osos. Substituția ionilor HAp: Ca^{2+} , PO_4^{3-} , și OH^- îmbunătățește proprietățile biologice ale acestuia. Substituția calciului se numește substituție cationică, iar substituțiile grupărilor fosfat și hidroxil se numesc anionice [1] (Figura 1).

Ioni precum Ag^+ , Li^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , or $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ pot înlocui ionii de Ca^{2+} ai HAp [2,3], grupările hidroxil pot fi substituite de F^- sau Cl^- , iar gruparea fosfat de HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , sau SeO_3^{2-} [2,3]. Gruparea CO_3^{2-} poate substitui atât ionii PO_4^{3-} (substituție de tip B), cât și ionii OH^- (substituție de tip A) [2].

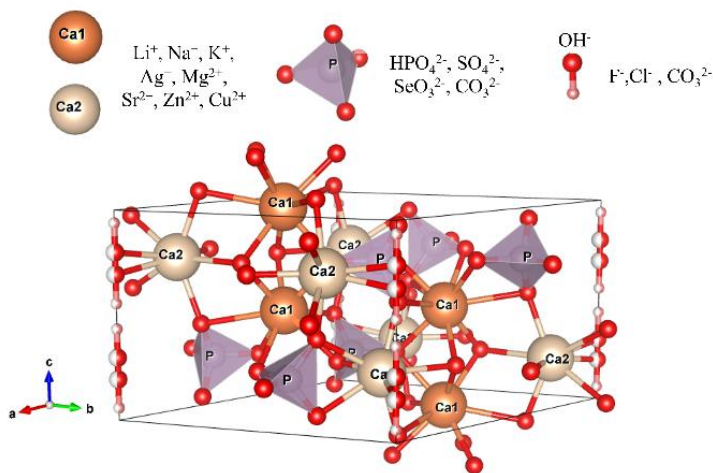


Figura 1. Structura cristalină a HAp și substituția cu ioni

Capitolul continuă cu prezentarea metodelor de sinteză a CaPs: metode uscate (solid-solid și mecanochimică), umede (precipitare chimică, hidroliză, hidrotermală, sol-gel, emulsie și cu ultrasunete) și la temperatură înaltă (combustie și piroliză). Acest capitol se încheie cu prezentarea tehnicilor de caracterizare selectate pentru investigarea proprietăților biomaterialelor obținute în teza de doctorat. (Tabelul 1).

Tabelul 1. Tehnicile de caracterizare utilizate pentru investigarea proprietăților CaPs

Tehnica de caracterizare	Principalele proprietăți investigate	Ref.
Microscopie electronică		
SEM	• morfologia suprafeței; • forma și dimensiunea particulelor (ex.: diametru, lungime); • grosimea straturilor (imagini SEM – secțiune transversală);	[4]
Difracție de raze X		
XRD	• cristalinitatea; • identificarea fazelor cristaline;	[5]
GIXRD	• cristalinitatea și identificarea fazelor cristaline în filmele subțiri;	[6,7]
Tehnici de spectroscopie		
EDX¹	• compoziția elementală;	[8]
FTIR	• structura moleculară;	[9]
XPS	• chimia suprafeței (compoziția elementală, stările chimice și electronice ale elementelor);	[10]
Topografia suprafeței		
Profilometrie	• profilul suprafeței; • rugozitatea suprafeței;	[11]
Biological assays		
Testul MTT	• viabilitatea celulară;	[12]
Testul LDH	• citotoxicitatea celulară;	[13]
Teste antimicrobiene	• activitatea antimicrobiană;	
Teste antibiofilm	• activitatea antibiofilm;	

¹efectuată cu microscopul electronic de baleiaj

Capitolul 2, “Utilizarea plasmelor la presiune atmosferică în stomatologie”

Plasma a fost descoperită în anul 1879 de către chimistul și fizicianul britanic William Crookes, în timp ce termenul “plasmă”, ce provine din cuvântul grecesc *plassein*, însemnând *a forma/ a modela*, a fost atribuit de către chimistul, fizicianul și inginerul american Irving Langmuir în anul 1928. În studiile sale a observat faptul că la trecerea unui curent electric printr-un gaz, la presiuni sub presiunea atmosferică, atunci când descărcarea este luminiscentă, aceasta „umple” tubul de descărcare, luând forma acestuia [14].

Plasma este considerată a patra stare de agregare a materiei, pe lângă starea solidă, lichidă și cea gazoasă. Dacă un material solid primește suficientă energie, acesta se va topi într-un lichid, iar dacă acesta primește în continuare energie, se va evapora, ajungând la starea gazoasă (Figura 2). Energiile necesare pentru tranzițiile solid-lichid și lichid-gaz sunt de ordinul 10^{-2} eV/particulă, însă, pentru a trece din starea gazoasă în starea de plasmă, energia necesară este mult mai mare, fiind cuprinsă între 1 și 30 eV/particulă [14].

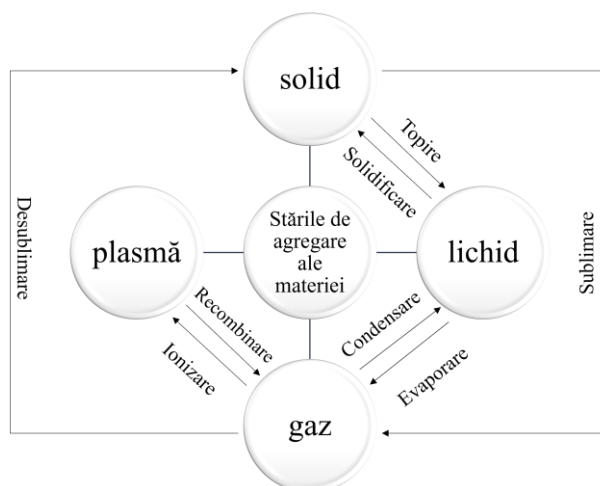


Figura 2. Tranzițiile între cele patru stări de agregare ale materiei

Plasma este un gaz ionizat ce conține ioni (încărcați pozitiv sau negativ), electroni, neutri (atomi și molecule) și fotoni și care, la nivel macroscopic, este neutră din punct de vedere electric [14]. Plasmele pot fi clasificate, în funcție de temperatură, în plasme de temperatură înaltă și plasme de temperatură joasă. Temperaturile ionilor (T_i), electronilor (T_e), și a moleculelor gazului (T_g), sunt similare în cazul plasmelor de temperatură înaltă, ceea ce indică faptul că în cazul acestora se ajunge la un echilibru termodinamic ($T_e \approx T_i \approx T_g$), temperaturile fiind cuprinse între 10^6 și 10^8 K. În ceea ce privește plasmele de temperatură joasă, acestea se clasifică în plasme termice, cu $T_e \approx T_i \approx T_g \leq 2 \times 10^4$ K, și plasme non-termice, de neechilibru, cu $T_e \gg T_i \approx T_g = 300 - 10^3$ K [15,16].

Capitolul 2 începe cu clasificarea descărcărilor la presiune atmosferică după cum urmează: descărcări în arc, descărcări corona, jeturi de plasmă și descărcări cu barieră dielectrică (DBD), oferind o scurtă descriere a fiecăreia. Dintre descărcările enumerate anterior, ultimele două menționate sunt cele mai studiate în domeniul medical (studii clinice și preclinice) [17]. Descărcarea de tip DBD este una dintre cele mai utilizate metode pentru obținerea APPs și este generată între doi electrozi (dintre care cel puțin unul este acoperit cu un material dielectric) utilizând un curent electric de înaltă tensiune (c.c. sau c.a.). Materialul dielectric (ex: ceramică, sticlă, cuarț, alumina sau Teflon) este utilizat pentru a preveni formarea arcului electric, determinând reducerea curentului [17–20].

În medicină au fost propuse diverse aplicații ale APPs, precum tratamentul rănilor, cancerului, și tratamente în domeniul stomatologiei [21]. Aplicațiile APPs în stomatologie pot fi clasificate în directe și indirecte [22,23].

În continuare discuția este axată pe prezentarea rezultatelor din literatura de specialitate în ceea ce privește aplicațiile directe ale APP în stomatologie și anume, restaurări dentare, tratamente endodontice/de canal radicular, albirea dinților și decontaminare – îndepărtarea biofilmului și sterilizarea bacteriană. Capitolul se încheie cu o discuție despre prevenirea cariilor, modularea biofilmului și rolul biofilmului în dezvoltarea cariilor (Figura 3). Rezultatele prezentate în literatura de specialitate asupra utilizării APP în stomatologie sunt, de asemenea, descrise în acest capitol. Acestea evidențiază noutatea metodei și implicit a direcției de cercetare a tezei.

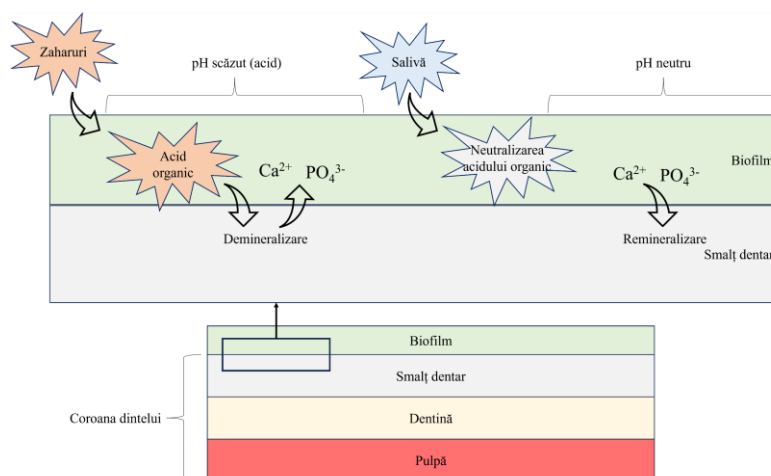


Figura 3. Reprezentarea schematică a demineralizării și remineralizării dintelui în prezența și în absența zaharurilor

Capitolul 3, “Tehnici de depunere de filme subțiri”

Printre tehnicile de depunere de filme subțiri, depunerea chimică în fază de vapori (chemical vapor deposition - CVD) și depunerea fizică în fază de vapori (physical vapor deposition - PVD) sunt cele mai comune. Diferența majoră dintre CVD și PVD este legată de starea de agregare a materialului ce urmează să fie depus: gazoasă pentru CVD și solidă pentru PVD. Astfel, în timpul depunerii sunt implicate procese diferite. Depunerea CVD presupune o reacție chimică între precursorul/ reactantul aflat în stare gazoasă și alte gaze și depunerea unei acoperiri solide pe substratul de interes. Depunerea PVD presupune vaporizarea sau pulverizarea unui material solid (țintă), urmată de condensarea pe substrat [24–27]. Tehnicile de depunere CVD și PVD au fost descrise pe scurt în acest capitol, atenția fiind acordată în mod special tehnicilor RF-MS și MAPLE.

Cea de-a doua direcție de cercetare a fost axată pe utilizarea a două tehnici de depunere fizică în stare de vapori pentru generarea de filme subțiri, RF-MS (Figura 4) și MAPLE (Figura 5). Astfel, acest capitol prezintă principiile fizice ale acestor depuneri.

Pe scurt:

– tehnica RF-MS:

- este utilizată pentru depunerea materialelor dielectrice pentru a evita acumularea de sarcină la suprafața țintei;
- presupune pulverizarea unei ținte de către ionii pozitivi formați în urma coliziunilor dintre electroni și atomii gazului de lucru și depunerea particulelor pulverizate pe substrat;

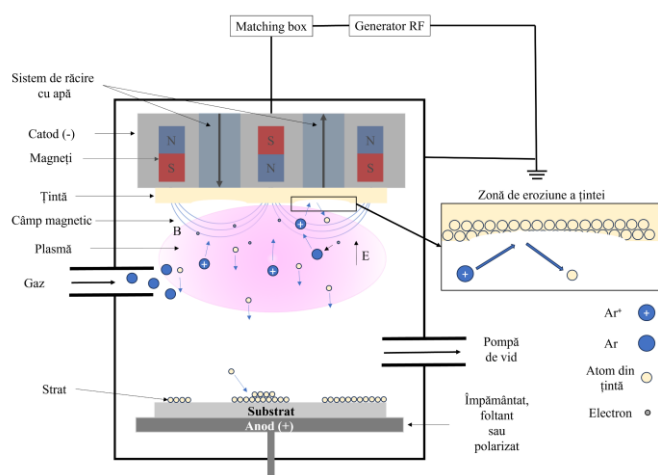


Figura 4. Configurația experimentală și depunerea RF-MS

– tehnica MAPLE:

- în cazul materialelor organice această tehnică este utilizată în scopul evitării deteriorării și descompunerii acestora;
- constă în vaporizarea unei ținte înghețate ce conține un solvent (matrice) și un solut (materialul ce urmează să fie depozitat) sub acțiunea radiației laser; astfel, solutul este depus pe substrat, iar solventul este pompat în afara incintei;

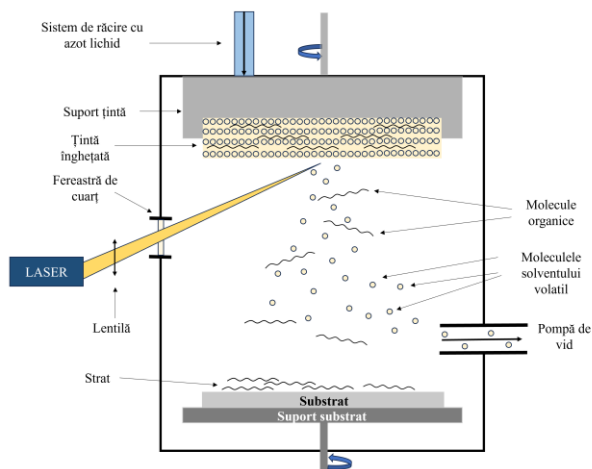


Figura 5. Configurația experimentală și depunerea MAPLE

Pentru o selecție adecvată a condițiilor de depunere, precum și pentru înțelegerea influenței acestora asupra proprietăților fizico-chimice și biologice a straturilor depuse, a fost studiată literatura de specialitate, iar date referitoare la depunerea CaPs prin RF-MS și a polimerilor prin MAPLE au fost prezentate în acest capitol. Polimerul selectat pentru depunerile MAPLE în cazul experimentelor conduse în timpul studiilor doctorale a fost chitosanul (CS) – Figura 6.

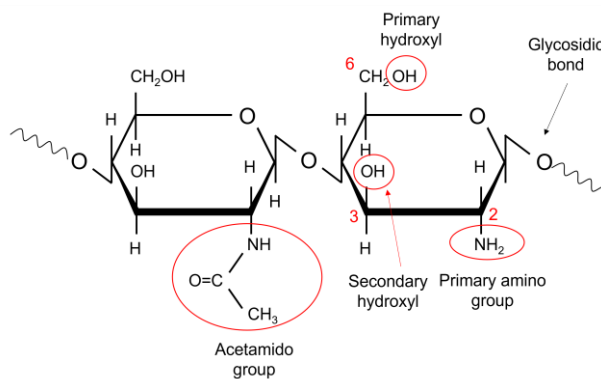


Figura 6. Structura chimică a chitosanului: unități de N-acetil-glucosamină (stânga) și glucoamină (dreapta)

CS este o polizaharidă cationică liniară și este obținut prin deacetilarea chimică sau enzimatică a chitinei. Unitățile CS-ului sunt glucoamina și N-acetil-glucoamina [28]. Unitățile de glucoamină sunt deacetilate, iar proporția lor determină gradul de deacetilare al CS-ului [29]. În funcție de masa moleculară, CS-ul poate să fie clasificat în CS cu masă moleculară mică (mai mică de 100 kDa), medie (între 100 kDa și 1000 kDa) sau mare (mai mare de 1000 kDa) [30].

Cea de-a doua parte a acestei teze, “*Rezultatele cercetării*”, constă în stabilirea scopului, obiectivelor generale și specifice ale cercetării, a rezultatelor științifice obținute în timpul studiilor de doctorat, a contribuțiilor originale și a concluziilor, a perspectivelor de viitor și a listei de publicații.

Două direcții de cercetare au fost dezvoltate în timpul studiilor de doctorat. Prima se referă la utilizarea tratamentelor APP în stomatologie, în timp ce a doua se referă la utilizarea unei RF-MS pentru aplicații în ingineria țesutului osos.

Capitolul 4, “Obiectivele cercetării”

Scopul, obiectivele generale și cele specifice ale tezei sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2. Scopul, obiectivele generale și obiectivele specifice ale tezei de doctorat

Scop	
Utilizarea tehnicilor de plasmă pentru aplicații biomedicale în domeniul stomatologiei și ingineriei țesutului osos	
Obiectiv general 1	Obiectiv general 2
Îmbunătățirea eficienței tratamentelor cu fluor în stomatologie utilizând tratamente cu plasmă la presiune atmosferică	Adaptarea proprietăților fizico-chimice și biologice ale straturilor compozite pe bază de fosfat de calciu/chitosan pentru aplicații în ingineria țesutului osos utilizând tehnicile de pulverizare magnetron în radiofrecvență și de evaporare laser pulsată asistată de o matrice
Obiectiv specific 1.1.	Obiectiv specific 2.1.
Îmbunătățirea retenției de fluor într-un model de smalț dentar dintr-un compus disponibil comercial pe bază de fluor prin activarea cu plasmă la presiune atmosferică	Identificarea modificărilor fizico-chimice ale straturilor ținând cont de parametrii de depunere din timpul descărcării RF-MS la putere rf mare
	Obiectiv specific 2.2.
	Dezvoltarea unei metode bazate pe ablație laser pentru identificarea polimerilor în filmele de fosfat de calciu
Obiectiv specific 1.2.	Obiectiv specific 2.3.
Îmbunătățirea inhibării biofilmului printr-un tratament combinat de plasmă la presiune atmosferică și un tratament pe bază de fluor	Identificarea rolului dopantului și al chitosanului asupra proprietăților biologice și fizico-chimice ale straturilor
	Obiectiv specific 2.4.
	Evaluarea morfologiei și a structurii moleculare a straturilor de fosfat de calciu produse în descărcare RF-MS la putere rf mică

Capitolul 5, “ Îmbunătățirea fluorizării și modularea biofilmului cu plasmă la presiune atmosferică”

Cel de-al cincilea capitol prezintă rezultatele cercetărilor efectuate având ca obiectiv general îmbunătățirea eficienței tratamentelor cu fluor în stomatologie, prin utilizarea plasmă la presiune atmosferică [31]. O sursă de plasmă DBD a fost selectată pentru activarea suprafeței probelor de HAp ce simulează smalțul dentar. Condițiile de lucru sunt următoarele: gaz – Ar, timpul tratamentului – 3 min., flux de gaz – 2000 sccm, putere – 20 W și o distanță între sursă și probă de 0.8 mm. După tratamentul APP, un gel ce conține fluor a fost aplicat timp de 3 min. Pentru comparație au fost obținute și probe tratate doar cu acest gel sau probe a căror suprafață a fost doar activată cu APP. Investigarea prin spectroscopia de raze X cu dispersie de energie (energy dispersive x-ray spectroscopy - EDX) a dezvăluit faptul că procentul atomic de F a fost mai mare în cazul probelor activate în prealabil cu plasmă, atingând-se astfel **Obiectivul specific 1.1.** (Tabelul 2). Proprietățile antibacteriene și antibiofilm au fost evaluate pe două tulpini bacteriene Gram-pozitive: *S. aureus* și *E. faecalis* și pe două tulpini bacteriene Gram-negative: *E. coli* și *P. aeruginosa*. Rezultatele au arătat faptul că cel mai bun tratament pentru reducerea viabilității bacteriene, a creșterii celulelor planctonice și a dezvoltării biofilmului a fost tratamentul combinat, fiind astfel îndeplinit **Obiectivul specific 1.2.** (Tabelul 2).

Capitolul 6, “ Straturi compozite de fosfați de calciu/chitosan generate prin tehnici de plasmă și laser” (pag. 86-111)

Rezultatele prezentate în capitolele 6 – 9 au fost obținute în urma cercetării ce a avut drept obiectiv general adaptarea proprietăților fizico-chimice și biologice a straturilor compozite pe bază de fosfat de calciu/chitosan pentru aplicații în ingineria țesutului osos, utilizând tehnicile RF-MS și MAPLE. Pentru o vizualizare mai bună, condițiile de depunere selectate pentru aceste studii sunt prezentate în Figura 7. În cazul depunerii MAPLE au fost utilizați aceeași parametrii pentru toate studiile pentru a pune mai bine în evidență influența parametrilor selectați pentru depunerea RF-MS asupra proprietăților fizico-chimice ale straturilor

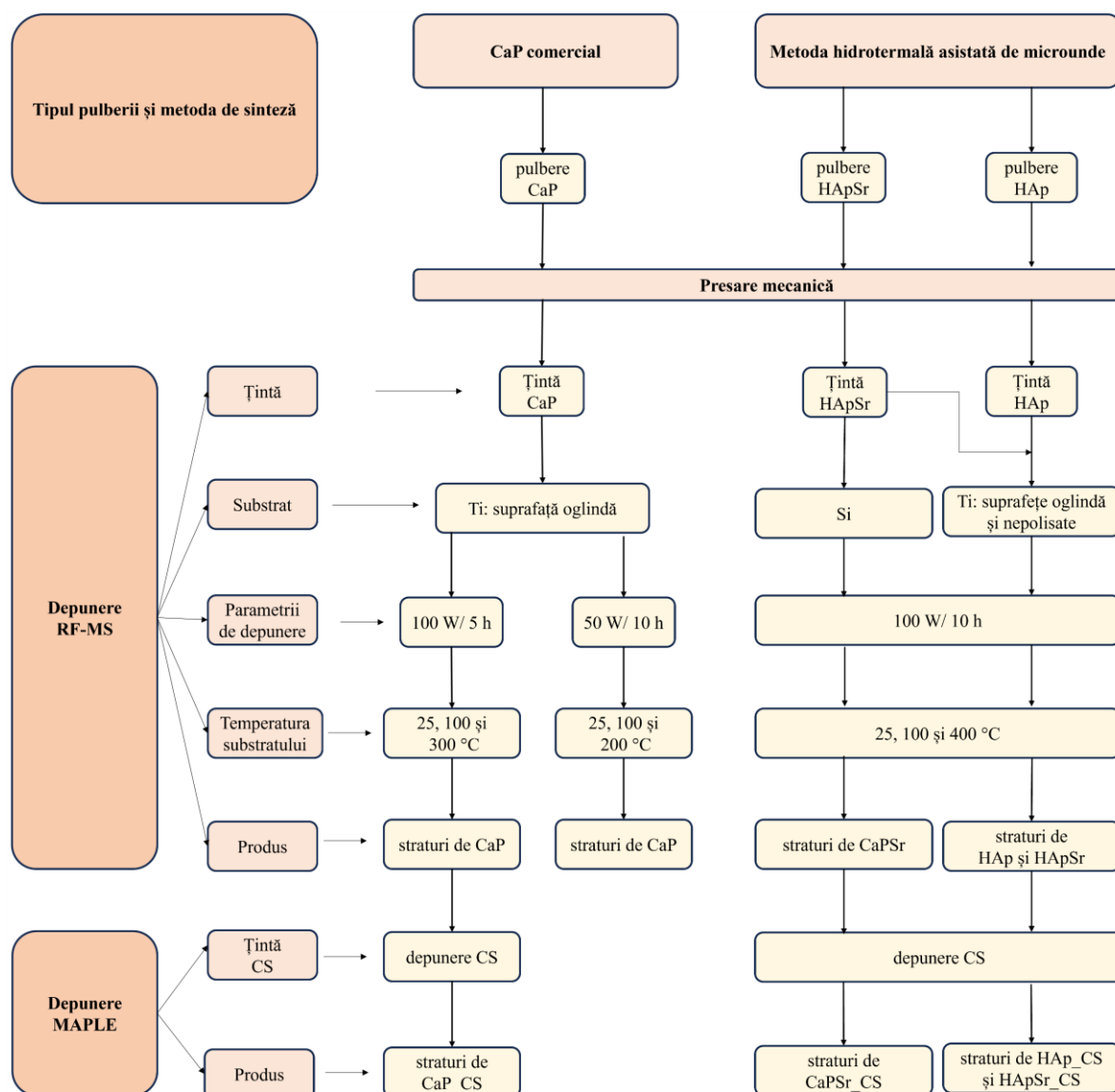


Figura 7. Procedura de lucru

Al șaselea capitol evidențiază influența temperaturii substratului (25, 100 și 300 °C) în timpul depunerii RF-MS asupra proprietăților fizico-chimice ale straturilor de CaP depuse pe substraturi de Ti la o putere de lucru mare de 100 W, pentru 5 h (Figura 7) și a straturilor compozite CaP_CS [32]. Tehnicile de caracterizare au indicat faptul că, la creșterea temperaturii substratului: i) morfologia straturilor de CaP se transforma din structuri granulare la structuri aplatizate dominate de microcavități ii) raportul Ca/P crește cel mai probabil datorită CaO, a cărui prezență a fost confirmată de spectroscopia de fotoelectroni cu raze X (X-ray photoelectron spectroscopy-XPS; iii) este inițiat procesul de cristalizare, aspect dovedit de

analiza de difracție de raze X la incidență razantă (grazing incidence X-ray diffraction - GIXRD); iv) încorporarea CS în straturile de CaP este diminuată.

Analizele XPS și de spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (Fourier transformed infrared spectroscopy - FTIR) au arătat faptul că HAp a fost formată în timpul depunerii RF-MS și CS a fost depus cu succes prin depunerea MAPLE. Modificări în structura moleculară a straturilor au fost, de asemenea, observate ca funcție a temperaturii substratului. În plus, este important de menționat faptul că straturile de CaP au fost mai aderente decât cele compozite de CaP_CS. Prin acest studiu, **Obiectivul specific 2.1.** a fost atins.

Capitolul 7, “Straturi compozite de fosfați de calciu dopați cu stronțiu/chitosan generate prin tehnici de plasmă și laser”

Cercetarea prezentată în cadrul acestui capitol a fost axată pe dezvoltarea unei metode bazate pe laser pentru identificarea polimerilor. În acest sens, straturi de fosfați de calciu dopați cu Sr (CaPSr) au fost depuse pe substraturi de Si la 100 W, timp de 10 h și temperaturi ale substratului de 25, 100 și 400 °C [33]. Straturile compozite de CaPSr_CS au fost obținute după depunerea MAPLE și au fost investigate prin ablație laser (laser induced ablation -LIA) cuplată cu un spectrometru de masă cuadripolar (quadrupole mass spectrometer– QMS). Investigarea LIA-QMS a evidențiat ionii moleculari caracteristici pentru CS: i) $C_6H_{11}^+$ ($m/q = 83$), ii) $C_5H_5O^+$ ($m/q = 81$), și iii) $NHCOCH_3^+$ ($m/q = 58$). Ultimul menționat indică acetilarea CS. Astfel, **Obiectivul specific 2.2.** a fost atins. Mai mult, prezența CaP a fost confirmată de înregistrarea curenților ionici ai Ca^+ ($m/q = 40$), $CaOH^+$ ($m/q = 57$), P^+ ($m/q = 31$) și PO_4^+ ($m/q = 95$). Proprietățile fizico-chimice ale straturilor au fost investigate prin microscopie electronică de baleiaj (scanning electron microscopy -SEM), EDX și FTIR. La creșterea temperaturii substratului în timpul depunerii RF-MS morfologia straturilor de CaPSr se schimbă de la structuri granulare la structuri aplatizate cu microcanale, iar raportul Ca/P nu este afectat, fiind egal cu 2 pentru toate straturile, sugerând astfel faptul că au fost formate straturi de fosfat tetracalcic dopat cu Sr. Acest aspect a fost, de asemenea, susținut de spectrele FTIR, în care nu au fost identificate benzi de absorbție caracteristice grupărilor OH.

Capitolul 8, “ Rolul Sr și al chitosanului asupra proprietăților biologice ale straturilor compozite generate prin tehnici de plasmă și laser”

Capitolul 8 prezintă rezultatele cercetării derulate în scopul evaluării influenței Sr și CS asupra proprietăților biologice ale straturilor compozite. Condițiile de depunere RF-MS și MAPLE au fost cele raportate în capitolul precedent. Cu toate acestea, pentru o evaluare adecvată, substraturile de Si au fost înlocuite cu substraturi de Ti cu suprafețe de tip oglindă sau neșlefuite, având în vedere faptul că Ti este cel mai utilizat material de fabricare a implanturilor osoase. În plus, straturi de HAp au fost dopate cu Sr pentru a evidenția rolul biologic al acestuia (Figura 7). Testele biologice (MTT, LDH și live/dead cell) au arătat faptul că toate straturile sunt biocompatibile, biocompatibilitatea cea mai mare fiind în cazul straturilor compozite HApSr_CS depuse prin încălzirea substratului în timpul depunerii RF-MS [34]. Influența Sr și CS a fost evidențiată mai bine de rezultatele testului MTT: Straturile au avut, de asemenea, proprietăți antimicrobiene împotriva *S. aureus*. Straturile au fost investigate și din punct de vedere fizico-chimic. La creșterea temperaturii: i) structurile granulare fuzionează, formându-se straturi mai compacte; ii) diferențele dintre valorile rapoartelor Ca/P și (Ca+Sr)/P au scăzut și iii) benzile de absorbție din spectrele FTIR ale straturilor de HAp caracteristice pentru modurile de vibrație ν_3 și ν_4 ale PO_4^{3-} s-au îngustat, respectiv “despicat”, indicând începutul cristalizării. **Obiectivul specific 2.3.** a fost atins în urma acestor studii.

Capitolul 9, “ Straturi de fosfați de calciu generate în plasmă la putere rf mică – proprietăți fizico-chimice “

Având în vedere rezultatele prezentate în capitolele 6, 7, și 8, ultimul pas în această teză a fost evaluarea modificărilor fizico-chimice ale straturilor de CaP generate la o putere rf de 50 W [35]. O putere mică poate să fie o soluție optimă pentru depunerea de straturi de CaP pe substraturi sensibile. Timpul de depunere a fost de 10 h, iar temperaturile substratului au fost de 25, 100 și 200 °C (Figura 7). Analiza SEM a evidențiat faptul că atunci când substratul nu a fost încălzit stratul este predominant poros, în timp ce creșterea temperaturii determină formarea unor straturi mai compacte, cu microcavități. Raportul Ca/P a fost egal cu 1.8 pentru toate straturile. Îngustarea benzii ν_3 și “despicarea” benzii ν_4 a fost observată în spectrele FTIR ale straturilor depuse în urma încălzirii substraturilor. Analiza de deconvoluție a spectrelor FTIR a evidențiat diferențe în structura moleculară a CaP, diferențe generate de modificarea

temperaturii substratului. Chimia suprafeței a fost, de asemenea, modificată în funcție de temperatura substratului, aspect ce rezultă din analiza XPS. Astfel, obiectivul **Obiectivul specific 2.4.** a fost atins.

Teza de doctorat se încheie cu trei capitole ce prezintă concluziile - **Capitolul 10**, perspectivele viitoare - **Capitolul 11** și lista de publicații – **Capitolul 12**.

Tehnicile pe bază de plasmă utilizate pentru generarea de straturi subțiri sunt foarte versatile deoarece permit varierea unui număr mare de parametrii. Rezultatele obținute în urma cercetărilor efectuate în timpul studiilor doctorale demonstrează faptul că acești parametrii influențează proprietățile fizico-chimice și biologice ale straturilor.

Având în vedere aceste aspecte, diferite perspective de viitor pot fi luate în calcul. În primul rând, considerând rezultatele obținute până acum, cercetarea trebuie îndreptată către studierea amănunțită a proprietăților biologice, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Astfel, straturile compozite cu potențialul cel mai mare în ceea ce privește viabilitatea celulară și proprietățile antimicrobiene, straturile de HApSr_CS depuse pe substraturi de Ti încălzite în timpul depunerii RF-MS, trebuie testate *in vitro* pentru evaluarea efectelor asupra osteoblastelor și osteoclastelor, celulele implicate în formarea și resorbția țesutului osos. În plus, alte teste, ce simulează mediul *in vivo*, vor fi de asemenea efectuate. Nu în ultimul rând, pentru a înainta în demersul necesar aprobării acestor straturi pentru utilizarea clinică, acestea vor fi evaluate și *in vivo*. Este important de menționat faptul că, pentru utilizarea clinică a straturilor HApSr_CS, instalațiile RF-MS și MAPLE la nivel de laborator nu sunt adecvate. În acest scop, o variantă optimă poate fi utilizarea unor instalații la nivel industrial pentru generarea acestor straturi. Pentru a asigura menținerea proprietăților biologice ale straturilor obținute cu noile instalații, experimente suplimentare sunt necesare. Astfel, această perspectivă de viitor necesită o perioadă îndelungată de timp, având drept scop obținerea unui produs final.

La nivel de laborator, cercetarea va continua cu depunerea de straturi de CaP/polimer, prin diversificarea compoziției acestora. Spre exemplu, studierea modificărilor proprietăților fizico-chimice și biologice ale straturilor de CaPs depuse prin tehnica RF-MS, determinate de modificarea dopantului și a concentrației acestuia. Mai mult decât atât, luând în considerare modificarea proprietăților biologice în funcție de dopant, cercetările viitoare se vor axa și pe depunerea straturilor de CaPs co-substituiți, în vederea evaluării efectului sinergic. De

asemenea, alți polimeri vor fi luați în considerare pentru depunerea acestora prin tehnica MAPLE, în mod special biopolimerii.

O altă direcție de cercetare presupune studierea straturilor de CaP/polimer depuse utilizând alte surse de plasmă, în mod special a surselor care lucrează la presiune atmosferică, precum cele utilizate în tehnica *plasma spraying*.

Cercetările derulate în perioada studiilor doctorale evidențiază potențialul tehnicilor pe bază de plasmă pentru dezvoltarea unor materiale și a unor tratamente noi pentru domeniul biomedical. Rezultatele au fost diseminate în 5 lucrări științifice cu un factor de impact cumulat de 20.908:

1. Zarif, M.E.; Yehia, S.A.; Biță, B.; Sătulu, V.; Vizireanu, S.; Dinescu, G.; Holban, A.M.; Marinescu, F.; Andronescu, E.; Grumezescu, A.M.; et al. Atmospheric Pressure Plasma Activation of Hydroxyapatite to Improve Fluoride Incorporation and Modulate Bacterial Biofilm. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 13103, doi:10.3390/IJMS222313103;
 2. Zarif, M.E.; Yehia-Alexe, S.A.; Bită, B.; Negut, I.; Locovei, C.; Groza, A. Calcium Phosphates–Chitosan Composite Layers Obtained by Combining Radio-Frequency Magnetron Sputtering and Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation Techniques. *Polymers (Basel)*. 2022, 14, 5241, doi:10.3390/polym14235241;
 3. Zarif, M.E.; Bită, B.; Yehia-Alexe, S.A.; Negut, I.; Groza, A. Spectral Analysis of Strontium-Doped Calcium Phosphate/Chitosan Composite Films. *Polymers (Basel)*. 2023, 15, 4245, doi:10.3390/polym15214245;
 4. Zarif, M.E.; Bită, B.; Yehia-Alexe, S.A.; Negut, I.; Gradisteanu Pircalabioru, G.; Andronescu, E.; Groza, A. Biological and Physicochemical Analysis of Sr-Doped Hydroxyapatite/Chitosan Composite Layers. *Polymers (Basel)*. 2024, 16, 1922, doi:10.3390/polym16131922.
 5. Zarif, M.E.; Groza, A.; Yehia-Alexe, S.-A.; Bită, B.; Andronescu, E. The Influence of the Substrate Temperature on the Physicochemical Properties of Calcium Phosphate Layers Deposited by Low Power Radio-Frequency Magnetron Sputtering Discharge. *U.P.B. Sci. Bull., Ser. B*, 2025, 87, 5–20;
și la 9 conferințe internaționale:
1. 10th International Conference on Advanced Materials, Bucharest, Romania, (poster presentation): “Sr-doped Hydroxyapatite/ Chitosan composite layers deposited on titanium

- substrates for bone tissue engineering applications” **Zarif M.E.**; Bită. B.; Yehia-Alexe S.A.; Negut I.; Gradisteanu Pircalabioru G.; Groza A. (2024);
2. 2nd International Conference on Laser, Plasma, and Radiation -Science and Technology 2024 (poster presentation): “Physicochemical investigations of strontium-doped calcium phosphate/chitosan composite films deposited by plasma and laser techniques” **Zarif M.E.**; Bită. B.; Yehia-Alexe S.A.; Negut I.; Groza A. (2024);
 3. 6th International Conference on Emerging Technologies in Materials Engineering, Bucharest, Romania, (poster presentation): “Calcium phosphate/ chitosan coatings obtained by radiofrequency magnetron sputtering and matrix-assisted pulsed laser evaporation techniques for bone tissue engineering applications” **Zarif M.E.**; Yehia-Alexe S.A.; Bită. B.; Negut I.; Locovei. C.; Groza A. (2023);
 4. 22nd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sinaia, Romania (oral presentation): “Atmospheric plasma treatment to modulate biofilm formation and fluoridation of enamel-like hydroxyapatite model” **Holban A.M.**, Vizireanu S., Zarif M., Grumezescu A.M., Birca A., Farcasiu Alexandru Titus, Marinescu Florica, Chifiriuc Mariana Carmen (2022);
 5. 22nd Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sinaia, Romania (poster presentation): “Radiofrequency magnetron sputtering deposition of calcium phosphate coatings – chemical and phase composition”, **Zarif M.E.**, Yehia S.A., Biță B., Groza A., Grumezescu A., Andronescu E. (2022);
 6. Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering” (oral presentation): “Calcium Phosphate Coatings Obtained by Radiofrequency Magnetron Sputtering For Bone Tissue Engineering Applications”, **Zarif M.E.**, Yehia S.A., Biță B., Groza A., Grumezescu A., Andronescu E. (2022);
 7. International Scientific Conference “Applications of chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (oral presentation): “Atmospheric plasma treatment to modulate bacterial biofilms” **Zarif M.E.**, Yehia S.A., Satulu V., Dinescu G., Vizireanu S., Holban A., Marinescu F., Grumezescu A., Andronescu E., Farcasiu T. (2021);
 8. International Conference on Plasma Physics and Applications, Magurele, Romania (oral presentation): “Atmospheric plasma fluoridation for application in dentistry” **Zarif M.E.**,
-

Yehia S.A., Bitu B.I., Satulu V., Vizireanu S., Dinescu G., Grumezescu A.M., Farcasiu A.T., Holban A.M. (2021);

9. International Scientific conference Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (oral presentation): “Morphological, structural, and chemical characterization of hydroxyapatite obtained through different synthesis routes” **Zarif M.E.**, Holban A.M., Vizireanu S., Dinescu G., Grumezescu A.M., Andronescu E. (2021);

Referințe

1. Cacciotti, I. Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite. In *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 1–68.
 2. Filip, D.G.; Surdu, V.-A.; Paduraru, A.V.; Andronesu, E. Current Development in Biomaterials—Hydroxyapatite and Bioglass for Applications in Biomedical Field: A Review. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 248, doi:10.3390/jfb13040248.
 3. Ressler, A.; Žužić, A.; Ivanišević, I.; Kamboj, N.; Ivanković, H. Ionic Substituted Hydroxyapatite for Bone Regeneration Applications: A Review. *Open Ceram.* **2021**, *6*, 100122, doi:10.1016/j.oceram.2021.100122.
 4. Akhtar, K.; Khan, S.A.; Khan, S.B.; Asiri, A.M. Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. In *Handbook of Materials Characterization*; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 113–145 ISBN 9783319929552.
 5. González, A. 1.5 X-Ray Crystallography: Data Collection Strategies and Resources. In *Comprehensive Biophysics*; Elsevier, 2012; Vol. 1, pp. 64–91 ISBN 9780080957180.
 6. López, E.O.; Mello, A.; Farina, M.; Rossi, A.M.; Rossi, A.L. Nanoscale Analysis of Calcium Phosphate Films Obtained by RF Magnetron Sputtering during the Initial Stages of Deposition. *Surf. Coatings Technol.* **2015**, *279*, 16–24, doi:10.1016/j.surfcoat.2015.08.021.
 7. Achilli, E.; Annoni, F.; Armani, N.; Patrini, M.; Cornelli, M.; Celada, L.; Micali, M.; Terrasi, A.; Ghigna, P.; Timò, G. Capabilities of Grazing Incidence X-Ray Diffraction in the Investigation of Amorphous Mixed Oxides with Variable Composition. *Materials (Basel)*. **2022**, *15*, 2144, doi:10.3390/ma15062144.
 8. Gupta, B.D.; Semwal, V.; Pathak, A. Nanotechnology-Based Fiber-Optic Chemical and Biosensors. In *Nano-Optics*; Elsevier, 2020; pp. 163–195 ISBN 978-0-12-818392-2.
 9. Thygesen, L.G.; Løkke, M.M.; Micklander, E.; Engelsen, S.B. Vibrational Microspectroscopy of Food. Raman vs. FT-IR. *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14*, 50–57, doi:10.1016/S0924-2244(02)00243-1.
 10. Bekas, D.G.; Tsirka, K.; Baltzis, D.; Paipetis, A.S. Self-Healing Materials: A Review of Advances in Materials, Evaluation, Characterization and Monitoring Techniques.
-

- Compos. Part B Eng.* **2016**, 87, 92–119, doi:10.1016/j.compositesb.2015.09.057.
11. Mei, L.; Guan, G. Profilometry and Atomic Force Microscopy for Surface Characterization. *Nano TransMed* **2023**, 2, e9130017, doi:10.26599/NTM.2023.9130017.
 12. Mestieri, L.B.; Zaccara, I.M.; Pinheiro, L.S.; Barletta, F.B.; Kopper, P.M.P.; Grecca, F.S. Cytocompatibility and Cell Proliferation Evaluation of Calcium Phosphate-Based Root Canal Sealers. *Restor. Dent. Endod.* **2020**, 45, 1–7, doi:10.5395/rde.2020.45.e2.
 13. Chraniuk, M.; Panasiuk, M.; Hovhannisyan, L.; Żołędowska, S.; Nidzworski, D.; Ciołek, L.; Woźniak, A.; Jaegermann, Z.; Biernat, M.; Gromadzka, B. The Preliminary Assessment of New Biomaterials Necessitates a Comparison of Direct and Indirect Cytotoxicity Methodological Approaches. *Polymers (Basel)*. **2022**, 14, 4522, doi:10.3390/polym14214522.
 14. Anghel, S.D. Capitolul I - Plasma Și Parametrii Ei. In *Fizica plasmei și aplicații*; Universitatea Babes-Bolyai, Cluj-Napoca.
 15. Lee, J.; Lee, C.W.; Yong, H.I.; Lee, H.J.; Jo, C.; Jung, S. Use of Atmospheric Pressure Cold Plasma for Meat Industry. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2017**, 37, 477–485, doi:10.5851/kosfa.2017.37.4.477.
 16. Xiang, Q.; Liu, X.; Li, J.; Ding, T.; Zhang, H.; Zhang, X.; Bai, Y. Influences of Cold Atmospheric Plasma on Microbial Safety, Physicochemical and Sensorial Qualities of Meat Products. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, 55, 846–857, doi:10.1007/s13197-017-3020-y.
 17. Bhattacharjee, B.; Bezbaruah, R.; Rynjah, D.; Newar, A.; Sengupta, S.; Pegu, P.; Dey, N.; Bora, S.; Barman, D. Cold Atmospheric Plasma: A Noteworthy Approach in Medical Science. *Sci. Pharm.* **2023**, 2, 46–76, doi:10.58920/sciphar02020046.
 18. Domonkos, M.; Tichá, P.; Trejbal, J.; Demo, P. Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology in Medicine, Agriculture and Food Industry. *Appl. Sci.* **2021**, 11, 4809, doi:10.3390/app11114809.
 19. Ruchel Khanikar, R.; Bailung, H. Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology for Biomedical Application. In *Plasma Science and Technology*; IntechOpen, 2022; Vol. i, p. 13.
 20. Palumbo, F.; Lo Porto, C.; Fracassi, F.; Favia, P. Recent Advancements in the Use of
-

-
- Aerosol-Assisted Atmospheric Pressure Plasma Deposition. *Coatings* **2020**, *10*, 440, doi:10.3390/coatings10050440.
21. Braný, D.; Dvorská, D.; Halašová, E.; Škovierová, H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21082932.
 22. Cha, S.; Park, Y.-S. Plasma in Dentistry. *Clin. Plasma Med.* **2014**, *2*, 4–10, doi:10.1016/j.cpme.2014.04.002.
 23. Li, H.; Zhang, X.; Zhu, X.; Zheng, M.; Liu, S.; Qi, X.; Wang, K.; Chen, J.; Xi, X.; Tan, J.; et al. Translational Plasma Stomatology: Applications of Cold Atmospheric Plasmas in Dentistry and Their Extension. *High Volt.* **2017**, *2*, 188–199, doi:10.1049/hve.2017.0066.
 24. Oluwatosin Abegunde, O.; Titilayo Akinlabi, E.; Philip Oladijo, O.; Akinlabi, S.; Uchenna Ude, A. Overview of Thin Film Deposition Techniques. *AIMS Mater. Sci.* **2019**, *6*, 174–199, doi:10.3934/matricsci.2019.2.174.
 25. Ohring, M. Thin-Film Evaporation Processes. In *Materials Science of Thin Films*; Elsevier, 2002; pp. 95–144.
 26. Ohring, M. Chemical Vapor Deposition. In *Materials Science of Thin Films*; Academic Press, 2001; pp. 277–355 ISBN 9780080491783.
 27. Martín-Palma, R.J.; Lakhtakia, A. Vapor-Deposition Techniques. In *Engineered Biomimicry*; Elsevier, 2013; pp. 383–398 ISBN 9780124159952.
 28. Wang, W.; Xue, C.; Mao, X. Chitosan: Structural Modification, Biological Activity and Application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 4532–4546, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042.
 29. Yan, D.; Li, Y.; Liu, Y.; Li, N.; Zhang, X.; Yan, C. Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. *Molecules* **2021**, *26*, 7136, doi:10.3390/molecules26237136.
 30. Ardean, C.; Davidescu, C.M.; Nemeș, N.S.; Negrea, A.; Ciopec, M.; Duteanu, N.; Negrea, P.; Duda-Seiman, D.; Musta, V. Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7449, doi:10.3390/ijms22147449.
 31. Zarif, M.E.; Yehia, S.A.; Biță, B.; Sătulu, V.; Vizireanu, S.; Dinescu, G.; Holban, A.M.;
-

- Marinescu, F.; Andronescu, E.; Grumezescu, A.M.; et al. Atmospheric Pressure Plasma Activation of Hydroxyapatite to Improve Fluoride Incorporation and Modulate Bacterial Biofilm. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13103, doi:10.3390/ijms222313103.
32. Zarif, M.E.; Yehia-Alexe, S.A.; Bitu, B.; Negut, I.; Locovei, C.; Groza, A. Calcium Phosphates–Chitosan Composite Layers Obtained by Combining Radio-Frequency Magnetron Sputtering and Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation Techniques. *Polymers (Basel)*. **2022**, *14*, 5241, doi:10.3390/polym14235241.
33. Zarif, M.E.; Bitu, B.; Yehia-Alexe, S.A.; Negut, I.; Groza, A. Spectral Analysis of Strontium-Doped Calcium Phosphate/Chitosan Composite Films. *Polymers (Basel)*. **2023**, *15*, 4245, doi:10.3390/polym15214245.
34. Zarif, M.E.; Bitu, B.; Yehia-Alexe, S.A.; Negut, I.; Gradisteanu Pircalabioru, G.; Andronescu, E.; Groza, A. Biological and Physicochemical Analysis of Sr-Doped Hydroxyapatite/Chitosan Composite Layers. *Polymers (Basel)*. **2024**, *16*, 1922, doi:10.3390/polym16131922.
35. Zarif, M.-E.; Groza, A.; Yehia-Alexe, S.-A.; Bitu, B.; Andronescu, E. The Influence of the Substrate Temperature on the Physicochemical Properties of Calcium Phosphate Layers Deposited by Low Power Radio-Frequency Magnetron Sputtering Discharge. *U.P.B. Sci. Bull., Ser. B* **2025**, *87*, 5–20.