



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREŞTI

ȘCOALA DOCTORALĂ  
DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA MATERIALELOR



Nr. Decizie ..... din .....

## TEZĂ DE DOCTORAT

Contribuții privind posibilitățile de obținere  
a unor structuri tridimensionale masive din  
materiale pulverulente cu aplicații biomedicale

*Contributions regarding the possibilities of obtaining masive tridimensional structures from powdered materials with biomedical applications*

**Doctorand: Andreea Maidaniuc**

**Conducător de doctorat: Prof.dr.habil.ing. Florin Miculescu**

**BUCUREŞTI 2018**



## Cuprins

<b>Abstract.....</b>	<b>vi</b>
<b>Mulțumiri.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introducere.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTEA I: STUDIU TEORETIC</b>	
<b>2. Stadiul actual al procesării surselor naturale de fosfați de calciu .....</b>	<b>6</b>
2.1. Istoria utilizării oaselor animale în reconstrucția osoasă .....	6
2.2. Modificări induse de tratamentul termic asupra țesutului osos bovin .....	9
2.2.1. Deshidratarea țesutului osos .....	9
2.2.2. Degradarea și eliminarea componentei organice .....	10
2.2.3. Decarbonatarea și recristalizarea hidroxiapatitei.....	11
2.2.4. Descompunerea hidroxiapatitei .....	12
2.3. Fosfați de calciu obținuți din țesut osos bovin.....	14
2.3.1. Apatita biologică .....	14
2.3.2. Hidroxiapatita.....	15
2.3.3. Fosfatul tricalcic .....	16
2.3.4. Aplicații ale fosfațiilor de calciu în reconstrucția osoasă .....	17
2.4. Etape de fabricare a produselor poroase din fosfați de calciu .....	20
2.4.1. Proiectarea produselor pentru adiție osoasă .....	20
2.4.2. Obținerea și caracterizarea pulberilor de fosfați de calciu.....	21
2.4.3. Fabricarea produselor ceramice poroase .....	24
2.4.4. Utilizarea argintului în microcompozite cu hidroxiapatită .....	32
2.4.5. Utilizarea amidonului în amestecurile fosfațiilor de calciu .....	34
2.4.6. Sinterizarea fosfațiilor de calciu .....	38
2.5. Metode de testare a biocompatibilității fosfațiilor de calciu.....	43
2.5.1. Testarea non-clinică .....	43
2.5.2. Testarea clinică.....	45
2.6. Concluzii.....	46
<b>PARTEA A II-A : CERCETARE EXPERIMENTALĂ</b>	
<b>3. Metodologia cercetării.....</b>	<b>48</b>
3.1. Materiale.....	49
3.1.1. Obținerea produselor ceramice primare .....	49
3.1.2. Obținerea pulberilor hidroxiapatitice .....	50
3.1.3. Obținerea materialelor microcompozite pe bază de hidroxiapatită și argint .....	50
3.1.4. Obținerea corpurilor ceramice poroase din hidroxiapatită utilizând amidon ca agent de consolidare și de formare a porilor .....	51
3.2. Metode de analiză și caracterizare a materialelor .....	51
3.2.1. Microscopia electronică de baleaj (SEM) .....	51

3.2.2. Spectrofotometria aplicată pentru evaluarea culorii materialelor ceramice .....	51
3.2.3. Difracția de raze X (XRD) .....	52
3.2.4. Calorimetria cu scanare diferențiată (DSC).....	52
3.2.5. Analiza termogravimetrică (TGA) .....	52
3.2.6. Spectroscopia fotoelectronilor de raze X (XPS).....	53
3.2.7. Spectroscopia de raze X cu dispersie după energii (EDS, EDX) .....	53
3.2.8. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	54
3.2.9. Spectrometria de fluorescență a razelor X (XRF) .....	54
3.2.10. Încercarea la compresiune .....	55
3.2.11. Evaluarea unghiului de contact .....	55
3.2.12. Evaluarea biocompatibilității <i>in vitro</i> .....	56
3.2.13. Evaluarea efectului antibacterian <i>in vitro</i> .....	57
<b>4. Rezultate și discuții .....</b>	<b>58</b>
4.1. Influența parametrilor de tratament termic asupra morfologiei, structurii și compoziției produselor ceramice primare obținute din țesut osos bovin .....	58
4.1.1. Influența temperaturii de tratament .....	58
4.1.2. Influența mediului de tratament.....	62
4.1.3. Influența condițiilor de răcire .....	65
4.1.4. Influența duratei de menținere.....	67
4.1.5. Concluzii .....	69
4.2. Evaluarea caracteristicilor din volum și de suprafață ale pulberilor ceramice cu diferite dimensiuni ale particulelor obținute din țesut osos bovin tratat termic .....	70
4.2.1. Morfologia pulberilor de hidroxiapatită .....	71
4.2.2. Compoziția chimică a pulberilor ceramice – compararea și corelarea datelor obținute din suprafață și volum .....	72
4.2.3. Concluzii .....	78
4.3. Evaluarea <i>in vitro</i> a materialelor ceramice obținute după tratamentul termic al țesutului osos bovin .....	79
4.3.1. Umetabilitatea suprafetei pulberilor de hidroxiapatită după presare .....	79
4.3.2. Evaluarea citotoxicității.....	80
4.3.3. Evaluarea calitativă a supraviețuirii și proliferării celulare .....	81
4.3.4. Evaluarea cantitativă a supraviețuirii și proliferării celulare .....	81
4.3.5. Morfologia și adeziunea osteoblastelor .....	83
4.3.6. Mineralizarea matricei extracelularare .....	85
4.3.7. Concluzii .....	85
4.4. Obținerea și caracterizarea unor materiale microcompozite cu hidroxiapatită și argint .....	86
4.4.1. Caracterizarea pulberilor precursoare.....	86
4.4.2. Caracterizarea semifabricatelor microcompozite .....	88
4.4.3. Caracterizarea corpurilor sinterizate.....	89
4.4.4. Concluzii .....	94

4.5. Obținerea și caracterizarea unor structuri tridimensionale poroase din hidroxiapatită cu aplicații biomedicale.....	96
4.5.1. Stabilitatea termică a pulberilor precursoare .....	96
4.5.2. Morfologia pulberilor precursoare .....	98
4.5.3. Aspectul materialelor după formarea amestecurilor și după sinterizare.....	99
4.5.4. Morfologia compositelor gelificate și a corpurilor sinterizate .....	100
4.5.5. Modificările structurale din timpul gelificării și sinterizării.....	102
4.5.6. Grupările funcționale prezente în compositele gelificate și structurile sinterizate	103
4.5.7. Proprietățile mecanice ale compositelor gelificate și structurilor sinterizate ..	107
4.5.8. Concluzii .....	109
4.6. Posibilități de obținere a unor prototipuri de produse tip scaffold pe bază de hidroxiapatită pentru reconstrucția defectelor osoase majore .....	110
4.6.1. Descrierea tehnologiei de fabricare a produselor tip scaffold .....	110
4.6.2. Proiectarea produselor cu caracteristici adecvate pentru reconstrucția osoasă	111
4.6.3. Obținerea produselor-prototip .....	112
4.6.4. Evaluarea morfologiei și a compoziției prototipurilor .....	113
4.6.5. Prezentarea produselor obținute după prelucrare mecanică .....	115
4.6.6. Aprecierea rezistenței mecanice a produselor care pot fi obținute .....	116
4.6.7. Concluzii .....	117
<b>Concluzii și contribuții personale .....</b>	<b>118</b>
<b>Referințe.....</b>	<b>121</b>
<b>Lista tabelelor .....</b>	<b>137</b>
<b>Lista figurilor .....</b>	<b>138</b>
<b>Lista abrevierilor .....</b>	<b>142</b>
<b>Lista lucrărilor publicate .....</b>	<b>143</b>

## Abstract

Această teză de doctorat include un studiu teoretic și o serie de studii experimentale efectuate pentru a dezvolta o soluție tehnologică integrată pentru fabricarea de implanturi biomimetice personalizate destinate defectelor osoase majore. Problemele de cercetare adresate în teză sunt reprezentate de limitările produselor aloplastice pentru reconstrucție osoasă disponibile în prezent: a) forma și dimensiunile nu sunt adecvate pentru umplerea defectelor osoase cu formă complexă; b) posibilitatea de apariție a efectelor secundare și a complicațiilor după implantare, și c) prețul produselor actuale de substituție osoasă este foarte ridicat. Obiectivele tezei au fost definite pe baza cerințelor impuse unui produs ideal de reconstrucție osoasă: evitarea țesutului osos prin asigurarea unei vascularizări optime după implantare; asigurarea stabilității mecanice la locul implantat până la regenerarea osoasă; și asistarea regenerării osoase prin mecanisme de osteoconducție.

Hidroxiapatita obținută din țesut osos bovin a fost propusă ca biomaterial în cadrul tezei de doctorat datorită disponibilității, costului redus și performanțelor clinice dovedite. În cadrul tezei a fost perfecționată o rută exclusiv termică pentru procesarea țesutului osos bovin, în acord cu legislația europeană pentru dispozitive medicale derivate din țesuturi animale. Provocările referitoare la asigurarea vascularizării și stabilității mecanice au fost soluționate prin metode inovative de a asigura un echilibru între macro/microporozitatea materialului și proprietățile mecanice ale implanturilor prin utilizarea unor aditivi de sinterizare ieftini, naturali și biocompatibili. Diferite timpuri de probe tridimensionale biomimetice, obținute din pulberi, paste și componente masive prelucrate mecanic au fost evaluate în etapele finale ale cercetării experimentale, cu perspective optimiste pentru utilizarea clinică.

**Cuvinte-cheie:** scaffold osos, os bovin, fosfați de calciu, hidroxiapatită, implanturi personalizate

*This thesis includes a literature review and several experimental studies performed for developing an integrated technological solution for manufacturing personalized biomimetic implants for filling large bone defects. The key-research problems that were addressed in the thesis are the main limitations of current alloplastic products for bone reconstruction: a) size and shape are inadequate for filling complex bone defects, b) various side effects and complications may arise after implantation and c) bone substitution products are sold with high prices. The thesis objectives were defined based on the main requirements of an ideal bone substitution product: avoiding bone necrosis by ensuring adequate vascularization; ensuring bone stability during regeneration and enhancing bone regeneration by ostoconduction mechanisms.*

*Bovine bone-derived hydroxyapatite was proposed as biomaterial due to its high availability, low cost and proven clinical performance. A strictly thermal route for processing bovine bone was refined in this project, in close agreement with European regulations for animal-derived medical devices. The challenges related to tissue vascularization and mechanical stability were addressed by innovative methods of ensuring an equilibrium between the macro/microporosity and mechanical properties of the implants by creatively using low-cost, natural, and biocompatible sintering additives. Various three-dimensional biomimetic test samples from pastes, powders and mechanical processing of massive components were evaluated in the final stages of the experimental research with good perspectives for clinical application*

**Keywords:** bone scaffolds, bovine bone, calcium phosphates, hydroxyapatite, customized implants

## **Mulțumiri**

Doresc să îi mulțumesc conducătorului meu de doctorat, domnului *prof. dr. habil. ing. Florin Miculescu*, pentru îndrumare, răbdare și pentru sprijinul material și logistic oferit pe parcursul ultimilor 8 ani de colaborare.

Mulțumirile mele se adresează și membrilor comisiei de îndrumare: domnilor *prof. dr. habil. ing. Iulian Vasile Antoniac*, *conf. dr. ing. Cosmin Cotruș* și *s.l. dr. ing. Octavian Trante* de la Facultatea de Știință și Ingineria Materialelor din cadrul Universității Politehnica București, pentru sfaturile, sugestiile și propunerile oferite pe parcursul programului de cercetare științifică și la presusținerea lucrării; toate acestea au contribuit la îmbunătățirea calității acestei teze de doctorat. Totodată, doresc să îi mulțumesc domnului *conf. dr. ing. Sorin Ciucă* de la Facultatea de Știință și Ingineria Materialelor pentru sugestiile valoroase referitoare la conținutul tezei.

Cercetarea experimentală aferentă tezei a presupus atât pregătirea, cât și caracterizarea unui număr semnificativ de probe și materiale. Le sunt profund recunoscătoare pentru efectuarea testărilor și caracterizărilor, precum și pentru sfaturile valoroase referitoare la interpretarea rezultatelor și elaborarea textelor științifice, domnilor: *CS I dr. ing. George E. Stan* de la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Materialelor, *conf. dr. habil. ing. Ștefan Ioan Voicu* de la Facultatea de Chimie Aplicată și Știință Materialelor din cadrul Universității Politehnica București, *conf. dr. ing. Marian Miculescu*, *conf. dr. ing. Dan Batalu* și doamnei *conf. dr. habil. ing. Ioana Csaki* de la Facultatea de Știință și Ingineria Materialelor.

De asemenea, doresc să le mulțumesc colegelor mele, *ing. Aura-Cătălina Mocanu*, și *ing. Cătălina-Andreea Dascălu* pentru ajutorul oferit la pregătirea probelor pentru cercetarea experimentală și pentru tot sprijinul oferit pe parcursul tezei de doctorat, precum și membrilor colectivului Facultății de Știință și Ingineria Materialelor care ne-au pus la dispoziție infrastructura necesară pentru efectuarea cercetării experimentale.

Pentru sprijinul finanțier și timpul oferit pentru deplasarea la conferințele științifice la care am prezentat rezultatele cercetărilor din cadrul tezei, doresc să mulțumesc S.C. Nuclear NDT Research and Services S.R.L., cu care colaborez încă din timpul studiilor de licență,. De asemenea, doresc să mulțumesc întregului colectiv Nuclear NDT pentru suportul moral și sfaturile inginerești, îndeosebi colegilor mei: *dr.fiz. Marian Soare*, *ing. Adrian Ernuțeanu*, *ing. chim. Paula Popa* și *fiz. Silviu Coroamă*.

Le sunt recunoscătoare prietenilor mei: *Anca Mitrea*, *Raluca Pastia*, *Andreea Cazacu*, *Alin Purcaru*, *Mihai Tigănilă*, *Alexandru Zainea* și *Radu Andrașescu*, pentru suportul moral oferit în ultimii ani, pentru discuțiile referitoare la interpretarea statistică a rezultatelor și pentru corectarea textelor din lucrările publicate pe parcursul studiilor universitare de doctorat.

În final, doresc să îi mulțumesc logodnicului meu, *Cătălin Alvădanei*, pentru ajutorul oferit la proiectarea prototipurilor prezentate în teza de doctorat și pentru răbdarea și dedicarea cu care m-a susținut în toți acești ani, familiei mele pentru susținerea necondiționată, și bunului Dumnezeu, care m-a ghidat astfel încât să cunosc oamenii potriviti la momentul potrivit pentru a putea finaliza cu succes lucrarea.

Dedic această teză de doctorat tuturor profesorilor mei.

# 1. Introducere

Oasele asigură rezistența mecanică a organismelor animale. Țesutul osos este considerat un material compozit, alcătuit dintr-o fază organică din colagen, o fază minerală din fosfat de calciu și o cantitate redusă de apă. Prin interacțiunea permanentă a acestor componente cu fluidele din organism, țesutul osos este capabil să se regenereze prin procese de remineralizare și resorbție. În acest mod se asigură creșterea oaselor și repararea lor în cazul în afectării integrității.

În cazul accidentării sau îmbolnăvirii oaselor, și apariției unor defecte osoase, este necesară accelerarea regenerării. Dacă defectele osoase au dimensiuni mari (de ordinul centimetrilor), țesutul osos nu are capacitatea de a se regenera în condiții optime, iar restabilirea integrității acestuia se realizează cu ajutorul unor materiale de adiție osoasă. În mod ideal, acestea trebuie să asigure: 1) vascularizarea țesutului în zona defectului osos și evitarea necrozei osului la capetele defectului; 2) stabilitatea osului în condițiile biomecanice locale; 3) accelerarea regenerării osoase prin mecanisme de osteoconducție și osteoinducție.

În prezent, cel mai utilizat material pentru repararea acestor defecte este grefa osoasă autogenă sau autogrefa osoasă, o cantitate de țesut osos prelevată de la pacient dintr-o zonă cu solicitări mecanice reduse (din creasta iliacă, osul mandibular, etc). Fiind prelevată direct de la pacient, autogrefa osoasă este complet compatibilă cu țesutul osos a cărui integritate trebuie restabilită. Cu toate acestea, autogrefa poate fi prelevată doar într-o cantitate limitată, uneori insuficientă pentru repararea defectelor mari. De asemenea, prelevarea grefei reprezintă o intervenție chirurgicală suplimentară, pe lângă cea de reconstrucție a defectului osos, ceea ce induce pacientului un disconfort ridicat [1].

Cercetarea din domeniul biomaterialelor testează în permanență produse din biomateriale aloplastice destinate reconstrucției osoase. Acestea sunt disponibile în cantități mari, prezintă proprietăți variate și elimină riscurile specifice grefelor naturale [2, 3]. Însă, deși aceste materiale și produse ar trebui să fie economice și similare cu țesutul-gazdă, majoritatea soluțiilor aloplastice propuse în prezent pentru reconstrucția osoasă sunt scumpe, nu prezintă o integrare osoasă corespunzătoare, au o activitate biologică imprevizibilă și nu pot fi utilizate în reconstrucția defectelor osoase mari.

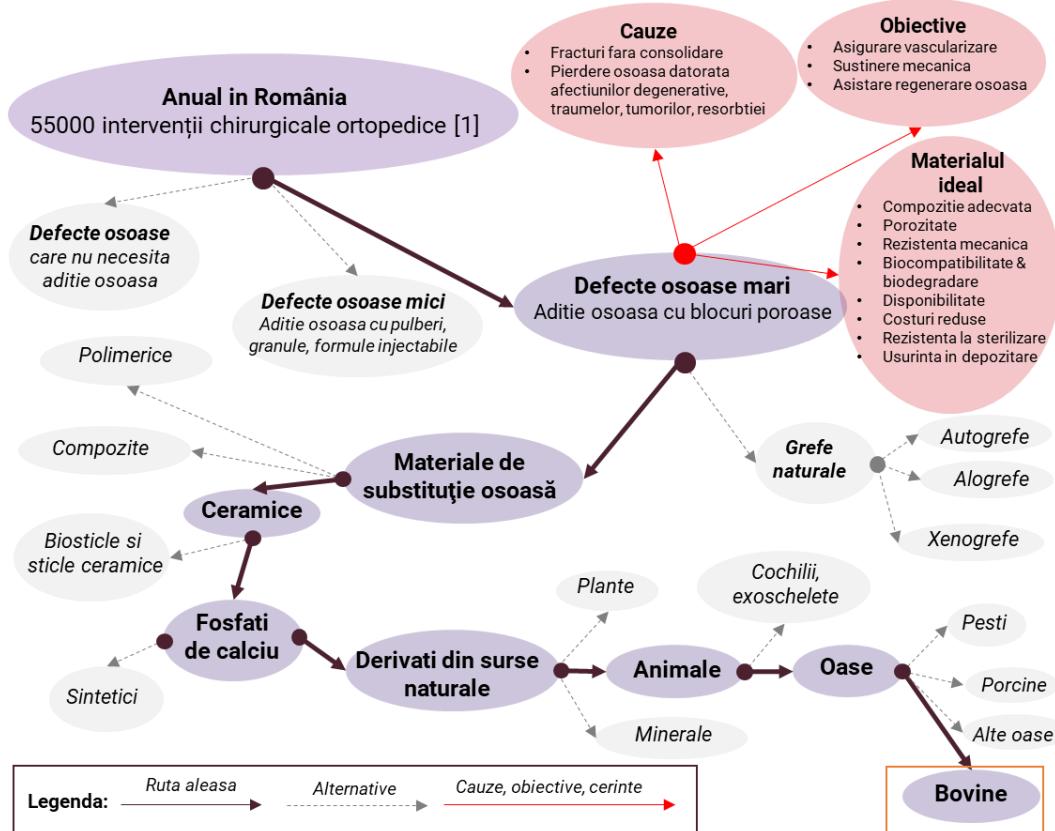
Potrivit literaturii de specialitate, un produs ideal pentru reconstrucția țesutului osos trebuie să respecte structura și funcțiile țesutului natural, să fie disponibil într-o gamă largă de forme și dimensiuni, să fie compatibil și degradabil în mediul biologic. De asemenea, materialul destinat reconstrucției osoase trebuie să aibă o compoziție chimică asemănătoare cu cea a osului original, o porozitate care să permită vascularizarea în zona implantului și creșterea de țesut nou, dar și proprietăți mecanice adecvate zonei în care are loc implantarea, pentru a susține țesutul afectat pe parcursul regenerării. Simultan cu regenerarea țesutului osos afectat, materialul de substituție trebuie să se degradeze cu o viteză adecvată, iar substanțele eliberate în urma degradării trebuie să poată fi metabolizate de organismul uman fără efecte secundare. De asemenea, pentru a putea fi utilizat în aplicații clinice, produsul ar trebui să poată fi procesat cu costuri reduse, să fie rezistent la sterilizare și ușor de depozitat [4].

Pornind de la aceste cerințe, în această teză de doctorat este propusă o soluție tehnologică integrată pentru fabricarea unor implanturi biomimetice personalizate folosite în substituția osoasă și dedicate rezolvării chirurgicale rapide și complete a defectelor osoase de dimensiuni mari.

În cadrul tezei au fost efectuate studii și cercetări cu privire la produsele de reconstrucție osoasă utilizate în chirurgia reparatorie, biomaterialele de origine naturală, și tehnologiile utilizate pentru a procesa implanturi biomimetice personalizate. Strategia de cercetare aplicată în vederea elaborării tezei de doctorat a constat în: (a) efectuarea unui studiu bibliografic pentru

identificarea principalelor cerințe impuse biomaterialelor și produselor biomimetice de origine naturală și tehnologiile utilizate pentru procesarea implanturilor biomimetice personalizate și (b) efectuarea unor cercetări experimentale pentru obținerea de produse ceramice primare, pulberi ceramice, și probe-test din pulberi și paste, prin tratamente termice și prelucrări mecanice aplicate unor precursori de origine naturală.

Materialul selectat pentru obținerea acestor produse este hidroxiapatita derivată din os bovin, un material ceramic biomimetic cu performanțe clinice dovedite [5], care respectă arhitectura naturală și microporozitatea țesutului osos. Materialul este disponibil în cantități mari, poate fi prelucrat prin procedee simple și economice, este rezistent la sterilizare și poate fi depozitat pentru perioade lungi de timp.



[1] Raport Anual al Registrului Național de Endoprotezare, octombrie 2013, [www.rne.ro](http://www.rne.ro)

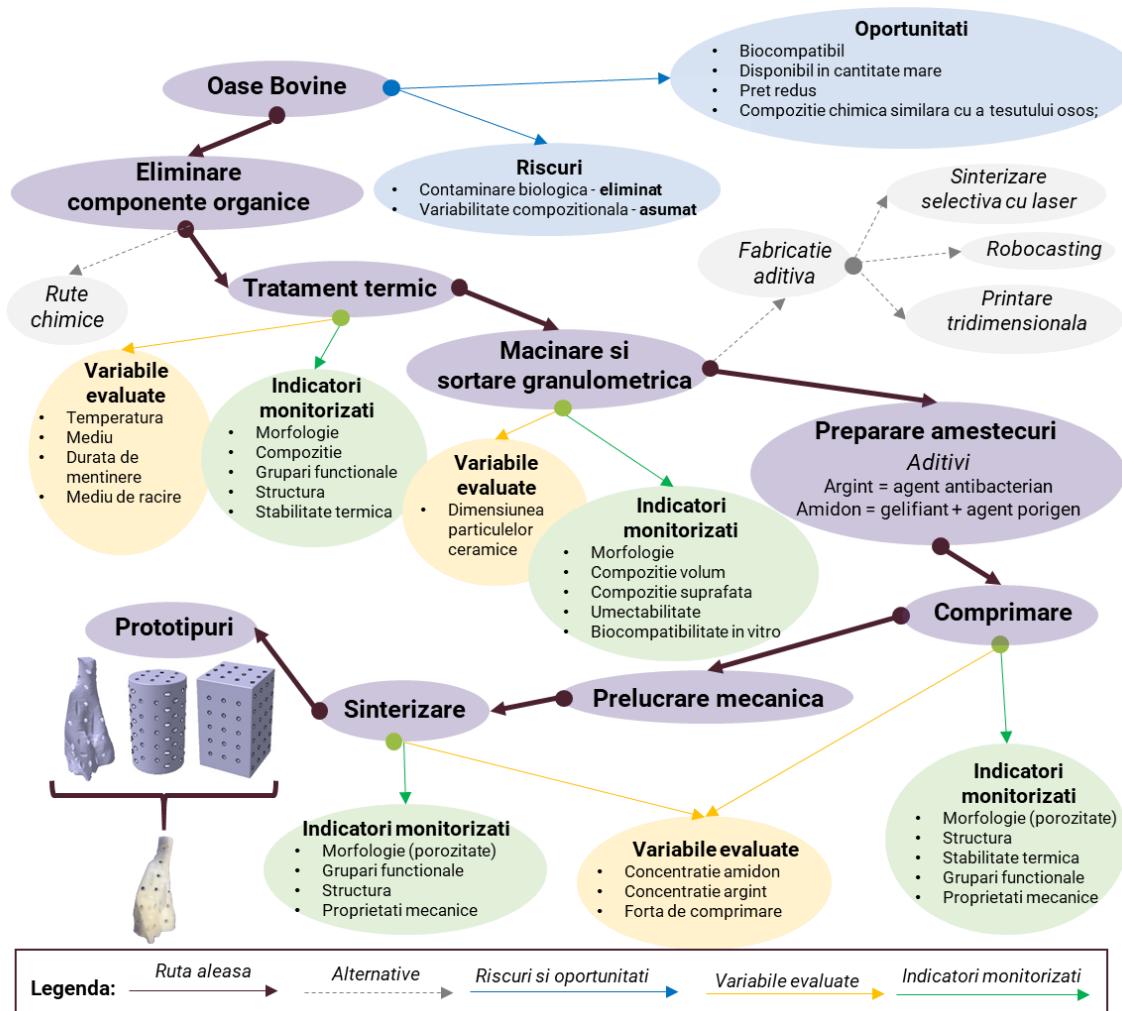
**Figura 1. 1.** Reprezentare schematică a contextului tezei de doctorat și a selecției materialului utilizat

Hidroxiapatita a fost obținută prin procesarea țesutului osos bovin în vederea obținerii de produse ceramice primare. Procesarea s-a realizat prin rute exclusiv termice, care elimină riscul contaminării biologice în acord cu legislația europeană în vigoare și care, prin controlul atent al parametrilor de tratament termic (temperatura, mediul, durata de menținere și condițiile de răcire), îmbunătățesc proprietățile materialului ceramic rezultat. Se poate obține astfel o hidroxiapatită non-stoichiometrică, în a cărei compoziție, alcătuitură dintr-o matrice de fosfat de calciu, se regăsesc elemente chimice și grupări funcționale esențiale pentru regenerarea osoasă, precum magneziul, sodiul și grupările carbonat [6]. Monitorizarea caracteristicilor materialelor rezultate în urma tratamentului termic s-a realizat prin metode adecvate de testare și caracterizare a stabilității termice, morfologiei, compoziției, arhitecturii grupărilor funcționale și structurii cristaline.

Produsele ceramice primare obținute după tratamentele termice aplicate țesutului osos bovin au fost prelucrate prin măcinare și sortare granulometrică, procedee care permit obținerea

facilă a unor pulberi cu diferite dimensiuni ale particulelor. Luând în considerare influența majoră a dimensiunii particulelor ceramice asupra performanțelor produselor ceramice fabricate fie prin procedee convenționale fie prin printare tridimensională, în această etapă s-a urmărit caracterizarea complexă a pulberilor hidroxiapatitice, testarea biocompatibilității *in vitro* și corelarea caracteristicilor de volum cu cele de suprafață. Cercetările efectuate pentru a realiza aceste corelații au dus la **dezvoltarea unei metode originale de evaluare a compoziției chimice a particulelor de la suprafață către volum, utilizând rezultate obținute de patru metode complementare de analiză spectrală**.

După obținerea și caracterizarea pulberilor ceramice, s-a urmărit fabricarea de probe-test biomimetică din pulberi și paste, procesarea unor componente masive și evaluarea proprietăților mecanice prin metode adecvate. Pentru a obține probele-test cu caracteristicile proiectate, au fost evaluate proceduri de sinterizare adaptate pulberilor de hidroxiapatită derivată din țesut osos bovin, descrisă anterior ca un material cu comportament impredictibil la sinterizare [7].



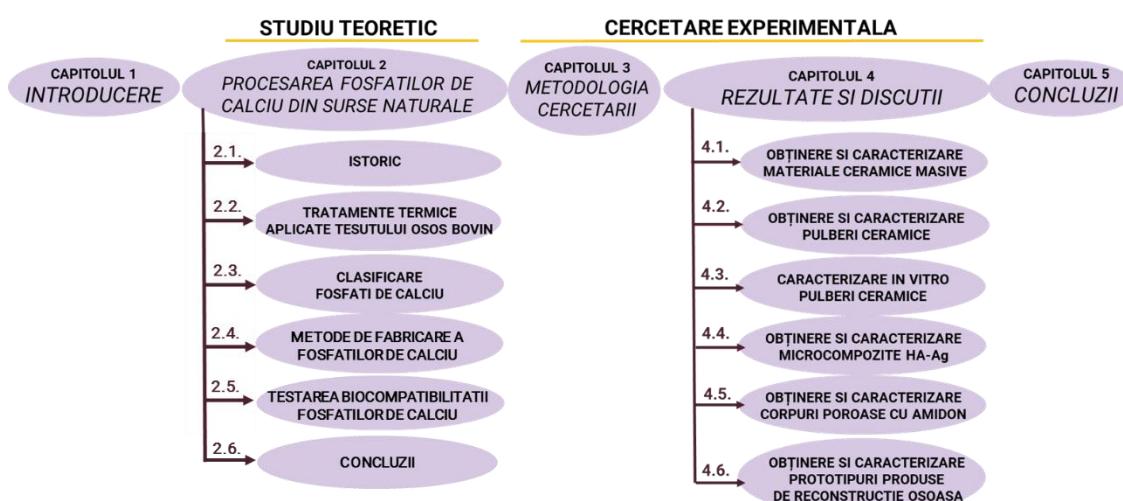
**Figura 1. 2.** Reprezentare schematică a strategiei experimentale aplicate în cadrul tezei de doctorat

Adaptările originale aduse procedurilor de sinterizare au vizat asigurarea macroporozității probelor-test prin: a) controlul distribuției dimensiunii particulelor și b) prin utilizarea amidonului, un polimer natural extras din plante, cu dublu rol: ca agent de consolidare al amestecului pentru sinterizare, datorită capacitatea sa de gelificare, și ca agent de formare a porilor prin degradare termică în timpul sinterizării. De asemenea, în amestecurile

de sinterizare au fost încorporate cantități variabile de argint, un metal cunoscut în ingineria biomaterialelor pentru proprietățile sale antibacteriene. Pe parcursul evaluării hidroxiapatitei sinterizate cu argint a fost observat efectul benefic al acestuia asupra detensionării structurii ceramice, contribuind astfel la îmbunătățirea rezistenței mecanice a probelor ceramice sinterizate. **Utilizarea amidonului și a argintului, cu scopurile menționate, pentru obținerea materialelor ceramice poroase din hidroxiapatită de origine bovină reprezintă două dintre contribuțiile originale ale prezentei teze de doctorat.**

Tehnologia pentru fabricarea unor implanturi biomimetice personalizate, scopul acestei lucrări de doctorat, a fost dezvoltată prin implementarea celor mai bune practici evaluate în cadrul etapelor anterioare. Problema tehnică pe care o rezolvă această tehnologie constă în adaptarea succesiunii fazelor și a parametrilor fazici ai unui procedeu specific producării unei structuri poroase tip „scaffold”, din hidroxiapatită, pentru repararea defectelor osoase majore astfel încât să se asigure îndeplinirea în mod predictibil a cerințelor de porozitate și rezistență mecanică ale produsului final.

Teza de doctorat este împărțită în 5 capitole și organizată în două părți – studiu teoretic și contribuții personale (fig. 1.3), după cum urmează:



**Figura 1. 3.** Structura lucrării de doctorat

*Capitolul 1. Introducere* prezintă contextul lucrării de doctorat, descrie soluțiile actuale din domeniul materialelor și produselor destinate substituției osoase și limitările lor, definește soluția propusă pentru soluționarea problemelor curente asociate substituției osoase și metodele de rezolvare a limitărilor produselor actuale, enumera contribuțiile originale și descrie structura lucrării de doctorat.

**Partea I. Studiul teoretic** cuprinde un capitol de recenzie a literaturii științifice din domeniul lucrării de doctorat.

*Capitolul 2. Stadiul cunoașterii* prezintă tendințele actuale referitoare la utilizarea fosfaților de calciu de origine naturală în substituția osoasă. Textul capitolului este organizat în acord cu succesiunea proceselor de obținere a unui produs destinat substituției osoase, care include selecția și procesarea materiilor prime, obținerea și caracterizarea pulberilor ceramice, obținerea unor produse semifabricate și tratamentul termic pentru obținerea produselor finale.

**Partea II-a. Cercetarea experimentală** este reprezentată de o serie de studii proprii referitoare la dezvoltarea unor produse personalizate pentru substituția osoasă, organizate în trei capitole, astfel:

*Capitolul 3. Metodica de cercetare* cuprinde descrierea materiilor prime și probelor analizate, a procedurilor de lucru aplicate pentru prepararea probelor, a metodelor de

caracterizare și investigare a materialelor și a metodelor de analiză și interpretare a datelor obținute în urma caracterizării materialelor.

*Capitolul 4. Rezultate și discuții* descrie studiile proprii referitoare la: 1) obținerea și caracterizarea unor produse ceramice primare prin tratamentul termic al țesutului osos bovin; 2) obținerea și caracterizarea unor pulberi hidroxiapatitice de origine bovină; 3) evaluarea *in vitro* a proprietăților biologice ale pulberilor hidroxiapatitice; 4) obținerea și caracterizarea unor probe-test microcompozite din hidroxiapatită utilizând argint ca agent antibacterian; 5) obținerea și caracterizarea unor probe-test din hidroxiapatită utilizând amidon ca agent de consolidare și formare a porilor; și 6) obținerea unor implanturi-prototip utilizând o tehnologie care include toate procedurile de obținere evaluate anterior.

*Capitolul 5. Concluzii finale* prezintă concluziile aferente studiilor teoretice și experimentale, rezumă contribuțiile personale și perspectivele de cercetare ulterioare tezei de doctorat.

Rezultatele inovatoare ale cercetării aferente tezei de doctorat au fost prezentate în 10 comunicări orale sau postere în cadrul unor conferințe internaționale și publicate în 7 articole științifice din domeniul ingineriei materialelor, în reviste de specialitate de circulație internațională (5 cotate ISI Thompson Reuters cu factor de impact cuprins între 1.07 – 5.95). Tehnologia de fabricare a implanturilor biomimetice propusă în această teză de doctorat este în curs de brevetare la nivel național, fiind premiată la saloane și expoziții internaționale de invenții și inovații.

# **PARTEA I: STUDIU TEORETIC**

## **2. Stadiul actual al procesării surselor naturale de fosfați de calciu pentru reconstrucția osoasă**

### **2.1. Istoria utilizării oaselor animale în reconstrucția osoasă**

Termenul „biomaterial” a fost utilizat pentru prima oară cu sensul de „*material natural sau sintetic (precum un metal sau polimer) care este adecvat pentru implantarea în țesut viu, în special ca parte a unui dispozitiv medical (precum o articulație artificială)*”<sup>1</sup> la începutul anilor 1960. După o perioadă relativ scurtă în care acest termen a fost popularizat în rândul specialiștilor, Societatea Europeană de Biomateriale și-a asumat rolul de a furniza o definiție oficială a termenului și a organizat, în 1986, o conferință dedicată, Consensus Conference on Definitions in Biomaterials. Definiția biomaterialului, agreată în această conferință, este: „*material nonviabil, utilizat în practica medicală, proiectat să interacționeze cu sistemele biologice*”<sup>2</sup>. Alte două conferințe Consensus au fost organizate în 1991 și 2005 pentru a actualiza această definiție. Definiția biomaterialului, la nivelul anului 2017, este tradusă ca „*un material proiectat să se integreze în sistemele biologice pentru a evalua, trata, augmenta sau înlocui orice țesut, organ sau funcțiune a organismului*”<sup>3</sup> [8, 9].

În prezent, biomaterialele sunt clasificate în funcție de tipul lor în biometale, biopolimeri, bioceramice sau biocompozite. Biomaterialele pot fi clasificate și în funcție de răspunsul pe care îl generează în organismele vii: din acest punct de vedere, ele pot fi bioinerte, bioactive sau bioresorbabile.

Uzual, două categorii de biomateriale – bioceramicele și biocompozitele de tip ceramică-polimer, sunt utilizate pentru fabricarea blocurilor poroase pentru substituție osoasă. Dintre bioceramice, fosfații de calciu, și în special hidroxiapatita (HA) și beta-fosfatul tricalcic ( $\beta$ -TCP), au fost intens testate datorită potențialului lor de a asista și stimula regenerarea osoasă [10].

Potențialul regenerativ al materialelor pentru reconstrucție osoasă este guvernat de trei mecanisme fundamentale: osteoconducție, osteoinducție și osteogeneză. Osteoconducția este definită ca fiind un proces de „permisie pasivă a osului să crească și să se modeleze peste o suprafață”[11]. Creșterea osului are loc prin migrarea celulelor osoase din țesutul-gazdă pe materialul osteoconducțiv, urmată de adeziunea și proliferarea acestora. Osteoinducția este definită ca un „act sau proces de stimulare a osteogenezei”; în multe dintre cazuri, aceasta se realizează prin utilizarea unor celule precursoră, care se vor diferenția în osteoblaste și vor contribui la formarea de țesut osos nou. Osteogeneza are loc atunci când celulele osteoblaste din țesutul osos contribuie la formarea de nou țesut osos. Materialele sintetice nu contribuie la osteogeneză, însă pot asista la regenerarea țesutului osos prin osteoconducție, osteoinducție și/sau osteopromovare [12, 13].

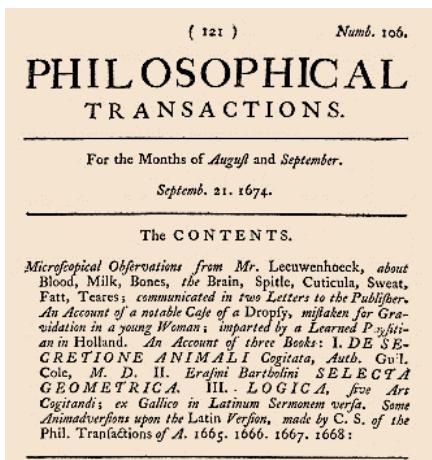
---

<sup>1</sup>Traducerea definiției furnizate de dicționarul Merriam-Webster, <https://www.merriam-webster.com/dictionary/biomaterial>, accesat la 29.04.2018.

<sup>2</sup>“a nonviable material used in a medical device, intended to interact with biological systems”

<sup>3</sup>“a material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment, or replace any tissue, organ or function of the body”

Cercetarea din domeniul procesării țesuturilor biologice pentru obținerea biomaterialelor pentru reconstrucție osoasă a început cu investigarea microscopică a acestor țesuturi. Istoria acestor investigații a fost descrisă de Serghei Dorozhin în mai multe articole și capitole recente referitoare la istoria fosfaților de calciu, principalele substanțe minerale existente în țesuturile calcificate [14-16]. O mențiune notabilă din istoriile lui Dorozhkin este preocuparea lui Antoine Phillips van Leeuwenhoek (“părintele microbiologiei” - un cercetător și comerciant olandez ale cărui lucrări au fost publicate de revista Philosophical Transactions la sfârșitul anilor 1600) pentru microstructura oaselor și dinților (fig. 2.1), dar și a cojilor de ouă și a scoicilor [17, 18].



**Figura 2. 1.** Fragment din articolul „Microscopical observations about Blood, Milk, Bones, the Brain, Spittle Cuticula, Fatt, Tears”, publicat în 1674 de A.Phillips van Leeuwenhoek [17]



**Figura 2. 2.** Fragment din articolul “Surgical bone grafting with „Os purum”, „Os novum” and „Boiled bone”” publicat în 1937 de S. Orell [19]

Istoria primelor materiale pentru medicină derivate din țesuturi osoase animale, este prezentată în detaliu într-un capitol publicat în 2015 [20]. Aceste materiale, dezvoltate la câteva sute de ani după investigarea microstructurii țesuturilor calcificate, erau preparate prin macerarea unor fragmente de os provenite de la diferite vertebrate. O mențiune notabilă din capitol este lucrarea “Metodă de macerare a osului” (eng. “A Method for Bone Maceration”), publicată în 1957 de Maatz și Bauermeier, în care macerarea este descrisă ca un proces de înmuuire a țesutului, fără putrefacție, desfășurată prin imersarea osului într-un lichid, la temperatură constantă [21]. Studiul lui Maatz și Bauermeier se baza pe cercetările lui Landerer, care în 1893 a înlocuit diafiza unui deget utilizând fragmente macerate din os de câine, și pe cercetările lui Svante Orell, care în 1934 a reflectat asupra utilizării fragmentelor de os conservat în chirurgia osoasă (fig. 2.2).

Cercetările lui Orell s-au concretizat în fabricarea la scară industrială a unor materiale pentru substituție osoasă, comercializate sub denumirile *Os purum* și *Os novum*. *Os purum* era preparat prin imersarea oaselor de bou în soluție de sare, hidroxid de potasiu și acetonă [19]. Produsul era folosit inclusiv de medici români; A. Cosăcescu notează în cartea “Afecțiuni osoase. Inflamații. Fracturi.” publicată în 1948 la Sibiu că “*Os purum s-a bucurat de o favoare deosebită; întrebuințarea lui a dovedit însă că în afară de ușurința de procurare, materialul nu ar avea nicio altă calitate; materialul este mai puțin activ decât transplantul viu, rezorbția lui este mai înceată decât a autogrefei*” [22].

Dezvoltarea unui material care să atingă performanțele autogrefei, “standardul de aur” în grefarea osoasă, a continuat între anii 1960-1980 cu perfecționarea altor metode de macerare

(precum imersarea în cloroform, metanol sau peroxid de hidrogen) a oaselor animale [23]. Cele mai populare produse din acea perioadă au fost “Kiel Bone” și “Boplant” [20, 24, 25], însă succesul lor a cunoscut o pantă descendantă în 1982 când McMurray și colab. au evaluat negativ utilitatea produsului Kiel Bone în spondilosinteze [24].

În aceeași perioadă, în 1974, Roy și Linnehan au raportat obținerea hidroxiapatitei din schelet de coral aplicând o metodă de sinteză hidrotermică [26]. Aceasta a inspirat cercetătorii să dezvolte și să perfecționeze numeroase metode de preparare a fosfaților de calciu din surse naturale de carbonat de calciu și fosfat de calciu disponibile în mediile marin și terestru. Gama de precursori naturali pentru prepararea fosfaților de calciu include diverse materiale și substanțe naturale precum marmura [27] sau lemnul [28] și o largă varietate de surse provenite de la organisme animale - cochilii și exoschelete marine [29] și oasele unor pești, păsări și mamifere [30-36].

Considerat mai practic din punct de vedere al dimensiunii, disponibilității și similarității cu osul uman [20], osul bovin a reprezentat după anii 1980 principala sursă naturală de fosfați de calciu cu aplicații biomedicale. Însă în anii 1990, țările europene s-au confruntat cu o epidemie de encefalopatie spongiformă bovină care a dus la restricții severe privind utilizarea făinii de oase ca îngrășământ și adjuvant în hrana animalelor. Pentru a se evita riscurile de contaminare microbiologică a produselor derivate din oase bovine au fost adoptate măsuri legislative<sup>4</sup> care să asigure obținerea în condiții sigure a materialelor derivate din țesut osos animal pentru aplicații biomedicale. Pentru aceasta este necesară garantarea (prin proceduri eficiente de audit al abatoarelor și prin măsuri stringente de biosecuritate) că precursorii materialelor sunt lipsiți de boli transmisibile. În prezent, procesarea țesuturilor osoase la temperaturi mai mari de 800°C este considerată o măsură eficientă de eliminare a riscurilor de contaminare microbiologică a materialelor derivate din țesuturi osoase bovine [37, 38].

După 1990, cercetarea din domeniu s-a concretizat în omologarea a numeroase produse pentru reconstrucție osoasă preparate din țesut osos bovin. Acestea au devenit accesibile pentru utilizarea în aplicațiile chirurgicale atât în formă nesinterizată (BioOss® - Geitslich, Elveția; Laddec® și Lubbock® - Ost-Developpement, Franța; Oxbone® - Bioland biomateriaux, Franța; Tutoplast® - Tutogen Medical, Germania) cât și sinterizată (BonAP®; Cerabone® - aap Implantate, Germania; Endobon® - Merck, Germania; Navigraft® - Zimmer Dental, SUA; Osteograf® - Ceramed, SUA; PepGen P-15® - Dentsply Friadent, Germania; Pyrost® - Osteo AG, Germania) [39].

În România au existat preocupări pentru studiul fosfaților de calciu cu aplicații medicale în majoritatea laboratoarelor și grupurilor de cercetare din cadrul universităților și institutelor de profil, însă aceste preocupări vizează îndeosebi fosfații de calciu sintetici. Se menționează, fără a considera această listă exhaustivă, contribuțiile echipelor din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Materialelor și Institutului Național pentru Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației din Măgurele [40-42] Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare în Optoelectrică [43, 44], Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Textile și Pielărie din București și Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș din Timișoara [45], Universității din București [5], Universității Tehnice și Universitatea Babeș-Bolyai din Cluj Napoca [46], Universitatea Transilvania din Brașov [47], Universitatea Valahia din Târgoviște [48] și Universitatea Politehnica din București [1, 49-51].

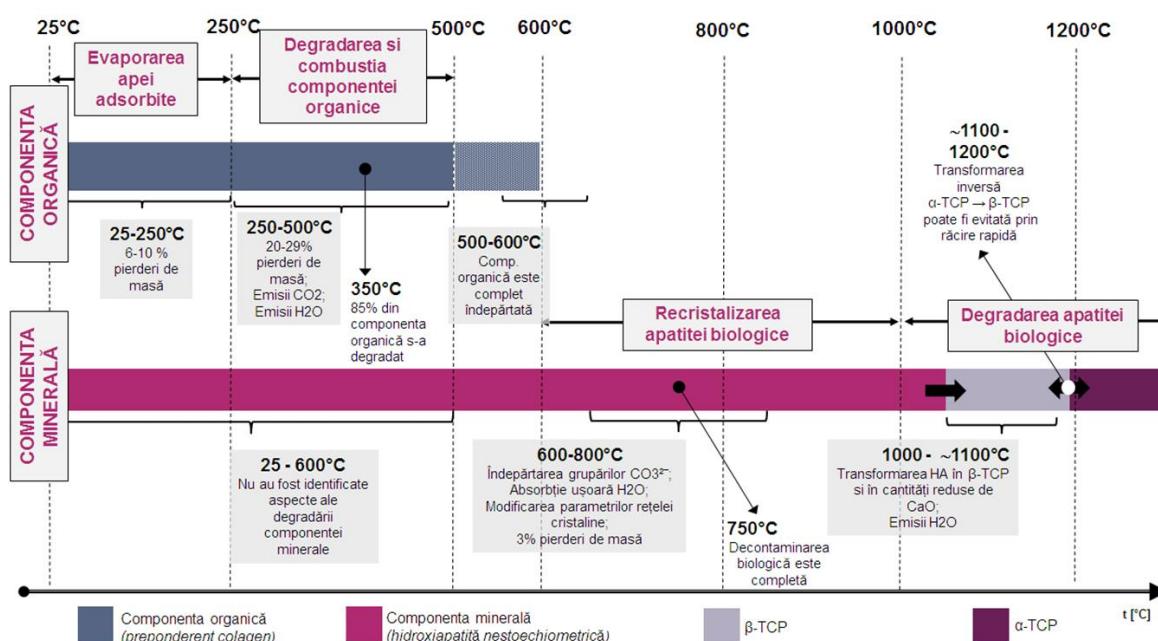
---

<sup>4</sup>REGULAMENTUL (UE) NR. 722/2012 AL COMISIEI EUROPENE din 8 august 2012 privind cerințe speciale în ceea ce privește cerințele prevăzute în Directivele 90/385/CEE și 93/42/CEE ale Consiliului cu privire la dispozitivele medicale implantabile active și la dispozitivele medicale fabricate utilizând țesuturi de origine animală <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/RO/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0722&from=RO>

## 2.2. Modificări induse de tratamentul termic asupra țesutului osos bovin

Tratamentul termic este una dintre cele mai directe metode de îndepărțare a componentei organice a țesuturilor dure. Procesele de degradare sunt influențate puternic de parametrii de tratament - temperatura de tratament, viteza de încălzire, timpul de menținere, atmosfera de tratament și modul de răcire, însă în literatură sunt prezente semnificativ mai multe informații referitoare la influența temperaturii de tratament și atmosferei în care are loc încălzirea.

Modificările culorii, structurii cristaline, morfologiei și compoziției țesutului osos au fost documentate pentru temperaturi de tratament cuprinse între 400-1400°C, deși relativ puține informații sunt disponibile pentru temperaturi mai mari de 1000°C. Majoritatea studiilor au dus la obținerea unor apatite biologice cu caracteristici asemănătoare chiar și în condiții diferite de tratament termic [52-58]. Variabilitatea produselor obținute este dată variațiile de compoziție, structură și morfologie ale materiilor prime.



**Figura 2. 3.** Reprezentare schematică a modificațiilor induse de tratamentul termic în țesutul osos.  
Adaptare după ref.

Principalele transformări suferite de țesutul osos în timpul tratamentelor termice sunt [37, 59, 60]: (a) *deshidratarea țesutului*, în care apa adsorbită la suprafața materialului se evaporă fără a afecta parametrii rețelei cristaline a componentei minerale; (b) *combustia componentelor organice* din os și *evaporarea apei înglobate* în structura cristalină a componentei minerale, cu modificarea parametrilor rețelei cristaline; (c) *recristalizarea componentei minerale* a țesutului osos și (d) *descompunerea termică parțială* a hidroxiapatitei nestoechiometrice (fig. 2.3.).

### 2.2.1. Deshidratarea țesutului osos

În țesutul osos, apa se regăsește în formă adsorbită la suprafață sau înglobată în structura cristalină a apatitei biologice. Evaporarea apei adsorbite nu influențează parametrii rețelei cristaline a apatitei și are loc în intervalul 25 – 250°C atât pentru osul compact cât și pentru cel spongios [60]. Ușoare variații ale acestui interval sunt datorate speciei de os, mediului de

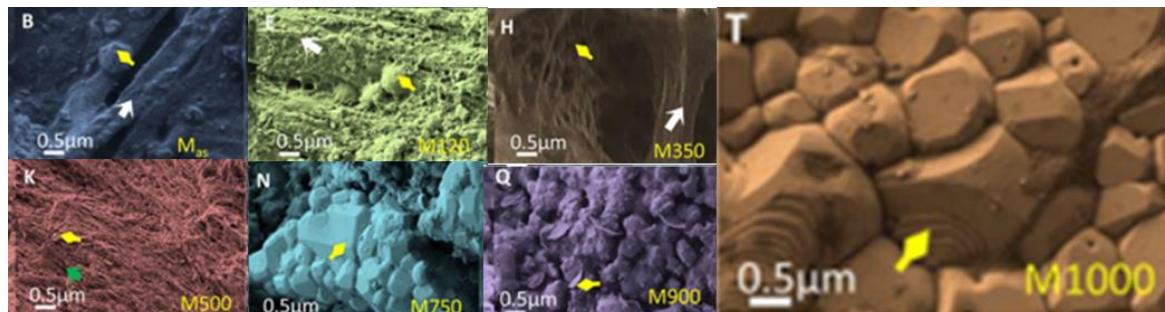
tratament termic, metodei de pregătire [56, 61-67] sau stării de sănătate a țesutului [68, 69]. Fenomenul se desfășoară concomitent cu începutul degradării componentei organice a osului.

Pierderea de masă asociată evaporării apei adsorbite este de 6–10% [61, 63, 64, 70, 71], valoare care coincide cu compoziția cunoscută a osului, care conține aproximativ 10% apă. Analizele dilatometrice au identificat contractii în intervalul 120 – 185°C, asociate cu scăderea temperaturii mediului de tratament cu aproximativ 15°C .

Aspectul morfologic al țesutului osos tratat termic la 120°C este prezentat în fig. 2.4. Fibrele de colagen, parțial degradate comparativ cu aspectul inițial al țesutului, sunt marcate cu săgeți albe. Nu au fost observate modificări ale morfologiei particulelor de componentă minerală, marcate în imagine cu săgeți galbene [72].

## 2.2.2. Degradarea și eliminarea componentei organice

Cel de-al doilea fenomen termic major caracteristic țesutului osos este reprezentat de degradarea, combustia și eliminarea componentei organice, alcătuită în proporție de 90% din colagen de tipul I, o substanță prezentă din abundență în țesuturile animale [70, 73].



**Figura 2.4.** Aspectul morfologic al zonei mediane a femurului bovin tratat termic la temperaturi de 120 - 1000°C. Temperatura de tratament termic este marcată cu galben pe fiecare imagine (unde  $M_{as}$  = țesut netratat termic). Săgețile albe indică fibrele de colagen; Săgețile verzi indică urmele rămase după îndepărțarea colagenului; Săgețile galbene indică matricea sau particulele de componentă anorganică. Selecție din ref. [74]

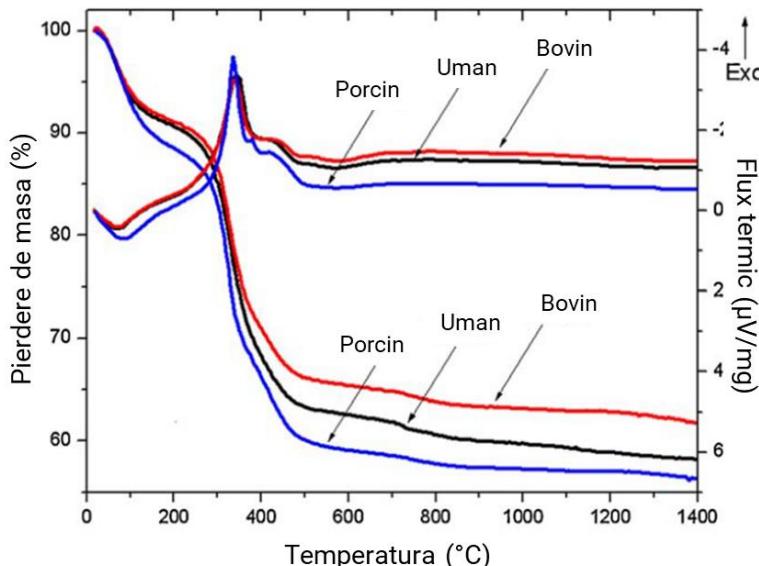
O serie de analize termice efectuate pe colagen izolat au explicitat procesul de degradare a acestuia, fără a include combustia materialului. Prin degradare se înțelege fragmentarea parțială a moleculelor de colagen și desfășurarea unor reacții de oxidare, care produc molecule de oxizi precum  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_2$  sau  $\text{SO}_2$  [70]. Degradarea colagenului începe cu denaturarea acestuia, fenomen raportat la 60 – 80°C. Denaturarea constă în ruperea legăturilor de hidrogen dintre catenele colagenului, desfacerea structurii de triplu helix și formarea unui polimer amorf, denumit gelatină [73]. Degradarea continuă cu topirea și combustia fazei organice, însă cele două fenomene sunt dificil de diferențiat în rezultatele analizelor termice [75].

O analiză comparativă între țesutul osos (uman) și un material de referință din colagen de tipul I a arătat că faza organică din țesutul osos este mai stabilă din punct de vedere termic față de colagenul izolat deoarece reorganizarea legăturilor chimice ca urmare a denaturării facilitează noi interacțiuni la interfața dintre colagen și apatita biologică [37, 70].

În analizele de calorimetrie diferențială cu scanare (DSC) ale țesuturilor osoase, evenimentul termic asociat degradării colagenului a fost identificat între 250 – 500°C, până la aceste temperaturi având loc și evaporarea apei adsorbite. Intervalul este puternic influențat de mediul în care are loc tratamentul termic, descompunerea fiind mai rapidă în aer [65, 67, 71, 76, 77].

Degradarea și îndepărțarea completă a componentei organice a țesutului osos este însoțită de pierderi de masă de aproximativ 20–29% [61, 63, 64, 70], care corespund

compoziției chimice cunoscute a osului. Cuplarea spectrometriei de masă cu analizele termogravimetrice a permis identificarea dioxidului de carbon drept gaz principal în emisiile din această etapă a degradării țesutului osos [65, 68].



**Figura 2.5.** Stabilitatea termică a țesutului osos compact (uman, bovin și porcin) la încălzirea în aer între temperatură camerei și 1400°C. Traducere din ref. [67]

Tot în acest interval au fost identificate pierderi de apă, care au fost asociate fie descompunerii fazei organice a țesutului osos [65] fie evaporării apei înglobate în apatita biologică [64, 69], deși este acceptat că apatita biologică nu este supusă modificărilor termice până la degradarea completă a componentei organice. Pierderile de masă variază în funcție de locul prelevării [62, 69], de tipul de țesut (compact sau spongios) [64] sau de starea de sănătate a țesutului [68, 69].

A fost estimat că 85% din componenta organică este îndepărtată până la 350°C [62], iar la 550 – 600°C degradarea este completă [61, 63]. Transformările de fază și modificările structurale observate în acest interval atestă faptul că faza minerală a țesutului osos nu este afectată până la aprox. 500°C, componenta organică acționând ca un „scut termic” până la această temperatură [37].

### 2.2.3. Decarbonatarea și recristalizarea hidroxiapatitei

Continuarea tratamentului termic după eliminarea completă a componentei organice duce la reorganizarea structurală a componentei minerale. În analizele DSC, acest fenomen este identificat ca un palier constant, prezent în mod ușual între 600 - 800°C în analizele efectuate în mediu oxidant (ex. aer) și continuând până la peste 1000°C atunci când tratamentul termic are loc în atmosferă inertă (ex. argon) [38].

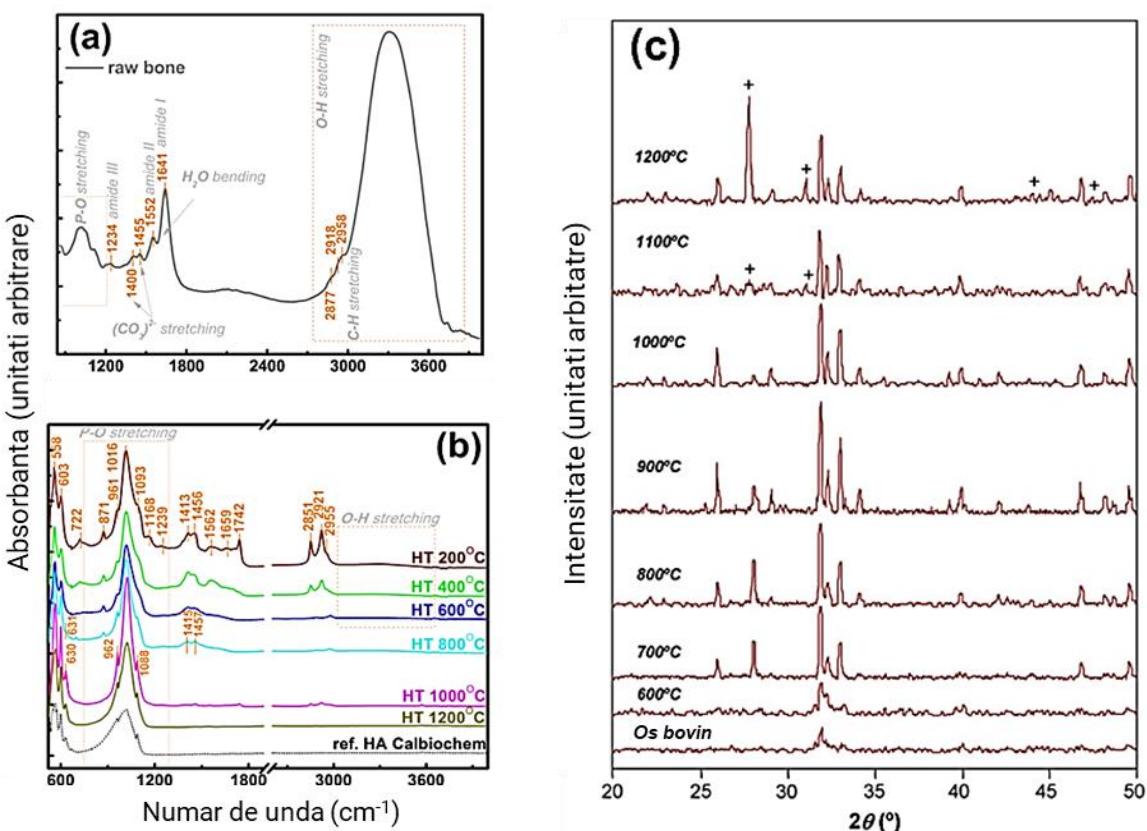
Începând cu 500-600°C, apatita biologică suferă o serie de modificări compozitionale și morfologice și parurge un proces de recristalizare în trei etape. Analizele dilatometrice au identificat o contractie masivă a țesutului osos, care începe la ~600°C și poate continua până la peste 1200°C la tratamentele termice efectuate în atmosferă inertă [78]. Analizele de difracție de radiații X (XRD) efectuate pe diferite specii de os [79] au confirmat că la încălzirea țesutului osos la 600°C are loc o modificare a dimensiunilor parametrilor rețelei cristaline a apatitei biologice, în comparație cu osul nefratat termic. Deși pentru hidroxiapatita stoichiometrică s-a raportat că recristalizarea decurge între 600-800°C, pentru apatita derivată din țesut osos bovin aceasta decurge până la temperaturi mai mari. Din punct de vedere morfologic, pentru

apatita derivată din os bovin au fost observate trei fenomene: difuzie la nivelul rețelei cristaline (500 - 750°C), difuzie la suprafață (750 - 900°C) și difuzie la limita de grăunte (900 - 1000°C) [74].

Între 600 – 900°C (peste 1000°C la încălzirea în argon [65]) au fost identificate pierderi de masă de 2–3% asociate decarbonatării apatitei biologice [56, 62-65, 70]. Analizele de spectrometrie de masă au confirmat dioxidul de carbon ca gaz majoritar al emisiilor [65, 68]. Eliberarea excesivă a grupărilor carbonat din structura hidroxiapatitei poate contribui la scăderea stabilității termice. Este de asemenea posibilă obținerea de oxid de calciu ca produs rezidual al descompunerii apatitei, a cărui prezență în cantități mari nu este dorită în material deoarece îi afectează atât biocompatibilitatea cât și proprietățile mecanice [80, 81].

## 2.2.4. Descompunerea hidroxiapatitei

Rezultatele analizelor de difracție de raze X la temperaturi înalte (HTXRD) au arătat că principalele solide produse la descompunerea fazei minerale a țesutului osos au fost  $\beta$ -TCP și HA în speciile de țesut cu conținut crescut de colagen, respectiv CaO și HA în oasele cu conținut redus de materie organică [65]. HA și  $\beta$ -TCP sunt principalele faze prezente în materialele tratate la temperaturi mai mari de 1000°C (în fig. 2.6c conținutul de  $\beta$ -TCP a fost estimat la 20%) [63].



**Figura 2.6.** Analiza structurală a țesutului osos tratat termic.

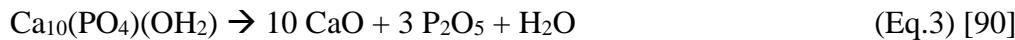
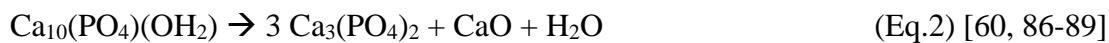
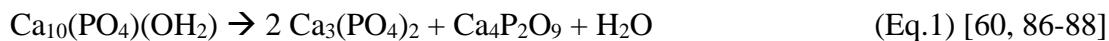
(a) Spectru FT-IR al țesutului osos bovin nefiltrat termic [82]. (b) Spectru FT-IR al țesutului osos bovin tratat termic la 200-1200°C [82]; (c) Rezultate XRD pentru țesutul osos bovin nefiltrat (bovine bone) și tratat termic la 600-1200°C. Se observă apariția  $\beta$ -TCP (marcată cu +) la 1100-1200°C [63]

Transformarea HA în  $\beta$ -TCP are loc la temperaturi diferite, în funcție de compoziția chimică a hidroxiapatitei și îndeosebi de atmosfera în care are loc încălzirea [38, 56]. În aer, descompunerea termică a hidroxiapatitei preparate din țesut osos începe la ~800°C, cu

formarea inițială a oxihidroxiapatitei și a oxiapatitei, urmând ca oxiapatita să fie descompusă în diverse forme de TCP și CaO [83, 84]. În argon, transformarea parțială a HA în  $\beta$ -TCP are loc în intervalul 1000 – 1200°C, cu un maxim endoterm la ~1150°C și o ușoară contractie a materialului în intervalul 1050 – 1250°C. În azot, descompunerea apatitei începe la aproximativ 1000°C, simultan cu conversia în TCP având loc și formarea de CaO și eliberarea de molecule de apă [63].

Deficitul de calciu din apatita biologică poate duce la formarea unor cantități reduse de fosfat tetracalcic (TTCP), iar prezența ionilor de magneziu în hidroxiapatita biologică favorizează formarea beta-fosfatului tricalcic și destabilizează structura apatitică, fenomen explicat de tensiunea mare indușă la introducerea în rețea a unor ioni de dimensiuni mai mici, care induc defecte de rețea și favorizează descompunerea hidroxiapatitei la încălzire [79].

Formarea fazei cristaline de oxid de calciu (CaO – a cărui prezență nu este dorită) pe parcursul procesării termice a hidroxiapatitei este considerată rară. Literatura de specialitate propune trei posibile reacții de descompunere termică a hidroxiapatitei [85]:



Kim et al. [90] au asociat conversia parțială a HA în CaO cristalin cu dehidroxilarea severă a materialului. Absența  $\text{P}_2\text{O}_5$  ca fază cristalină din materialele decrise în literatură este explicată de temperatura sa joasă de sublimare (~300°C). Diagrama de echilibru CaO– $\text{P}_2\text{O}_5$  [60, 89, 91, 92] sugerează că faze precum CaO sau  $\text{P}_2\text{O}_5$  nu apar ușor în sistem la temperaturi mai mici de 1720°C. Cu toate acestea s-a observat prezența CaO chiar și la 1000°C în materiale de tipul HA cu rapoarte molare Ca/P mai mari decât valoarea stoechiometrică teoretică (*i.e.*, 1.67) [85, 93, 94].

Transformarea  $\beta$ -TCP în alfa-fosfat tricalcic ( $\alpha$ -TCP) a fost raportată la temperaturi de peste 1125°C. Transformarea este reversibilă la răcire lentă dar fenomenul poate fi evitat sau redus prin răcire rapidă [83]. Urme de oxid de calciu și de oxid de magneziu au fost identificate [79] în oase provenite de la diverse specii, tratate termic la 1400°C, însă compușii nu au fost considerați produși de descompunere ai hidroxiapatitei.

Deși după tratamentul termic al țesutului dur bovin a fost raportată obținerea de materiale ceramice de tip fosfat de calciu bifazic (cu compozиtii fazice influențate de parametrii de tratament) transformarea beta-fosfatului tricalcic în alfa-fosfat tricalcic nu a fost observată până la temperatura de 1200°C [5, 82]. Literatura de specialitate nu clarifică metodele de adaptare a raportului hidroxiapatită (bioactivă)/beta-fosfat tricalcic (resorbabil) din fosfați de calciu bifazici prin rute exclusiv termice deoarece fenomenul depinde, pe lângă parametrii de tratament, de substituțiile din structura țesutului osos, de tipurile de elemente chimice înglobate în structură și de interacțiunile acestora din cadrul componentei minerale a țesutului osos pe parcursul procesării termice.

## 2.3. Fosfați de calciu obținuți din țesut osos bovin

Fosfați de calciu sunt principalele componente ale oaselor și dinților, având un rol major în desfășurarea proceselor fiziologice uzuale. Numeroase publicații oferă informații despre istoria utilizării fosfaților de calciu sintetici (care a început în anii 1920 [95] și care a cunoscut o evoluție considerabilă în anii 1970 [96, 97]) sau despre succesele majore ale acestor materiale [98]: acoperirile din fosfați de calciu au contribuit la creșterea ratei clinice de supraviețuire a componentelor femurale ale implanturilor de șold [99] sau la reducerea riscurilor de slăbire a cuierelor utilizate cu fixatoarele externe [100].

**Tabel 2. 1.** Recenzii recente din principalele subdomenii ale cercetării fosfaților de calciu [98]

Subiectul cercetării	Referințe
Fosfați de calciu (recenzii generale)	[3, 4, 101, 102]
Fosfați de calciu bifazici	[103, 104]
Cimenturi și paste din fosfați de calciu	[105-109]
Acoperiri	[110-114]
Precipitarea nanoparticulelor și fosfaților de calciu amorfi	[108, 115-120]
Sinterizare și producția scaffold-urilor	[7, 108, 121]
Osteoinductivitate	[122, 123]
Transport de medicament/gene	[115, 124-127]
Substituție ionică, schimb ionic, substanțe bioanorganice	[102, 106, 128-130]
Particule cu geometrie controlată	[116, 131, 132]

Deși oarecum umbrită de evoluția spectaculoasă a polimerilor pentru aplicații medicale, utilizarea fosfaților de calciu este o soluție viabilă, iar avantajul major al similitudinii cu țesuturile osoase nu trebuie ignorat într-o perioadă în care nevoia de materiale pentru substituție și regenerare osoasă este în continuă creștere [98]. În prezent, cercetarea din domeniul fosfaților de calciu sintetici este vastă, incluzând subiecte precum clasificarea și diferențierea diferenților fosfați de calciu biocompatibili, aplicațiile acestora sau interacțiunea cu mediul biologic. Tabelul 2.1, întocmit de Habraken et. al [98], cuprinde o listă de recenzii publicate începând cu anul 2000 din principalele subdomenii ale cercetării fosfaților de calciu.

### 2.3.1. Apatita biologică

Cel mai important reprezentant al fosfaților de calciu este componenta minerală din țesutul osos al vertebratelor, denumită deseori „apatită biologică” sau „dahlit”, cu formula chimică aproximativă  $\text{Ca}_{8.3}\square(\text{PO}_4)_{4.3}(\text{CO}_3,\text{HPO}_4)_{1.7}\text{OH}_{(0.3)}\square_{1.7}$ , unde  $\square$  = vacanță, comparativ cu formula hidroxiapatitei stoechiometrice  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [133].

Țesutul osos este considerat un material compozit format dintr-o fază polimerică și una ceramică. Colagenul, cea mai întâlnită proteină din corp, reprezintă aproximativ 90% din componenta organică a osului și oferă țesutului elasticitate și rezistență la soc. Cea de-a doua componentă, minerală, are rolul de a rigidiza și a durifica matricea organică și se prezintă sub forma cristalelor de fosfat de calciu [38, 84, 134, 135]. Unitățile fundamentale ale osului se prezintă sub forma unor fibre de colagen mineralizate, cu o grosime de 80-100 nm. Cristalele de apatită biologică din os au formă de placete alungite cu grosime de 2-4 nm. Cristalele sunt dispuse paralel în fibrele organice, formate la rândul lor din auto-asamblarea unui triplu helix de colagen [136, 137] (fig. 2.7).

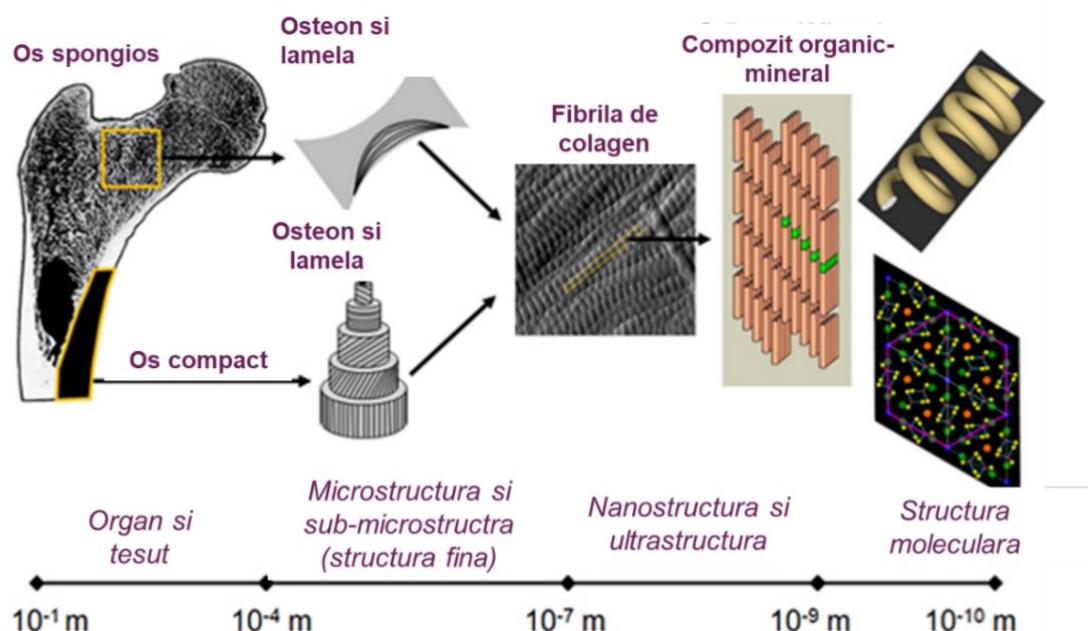


Figura 2. 7. Organizarea ţesutului osos<sup>5</sup>

Spre deosebire de apatita geologică, care prezintă o structură cristalină hexagonală, apatita din oasele vertebratelor cristalizează în sistem monoclinic și conține numeroase substituții [138]:  $\text{Ca}^{2+}$  poate fi substituit de cationi precum  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$ ;  $\text{PO}_4^{3-}$  poate fi înlocuit de atomi precum  $\text{CO}_3^{2-}$  (substituție de tip B);  $(\text{OH})^-$  poate fi substituit de  $\text{CO}_3^{2-}$  (substituție de tip A),  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  sau poziția sa poate fi lăsată vacanță.

Calciul, fosforul și oxigenul rămân principalele elemente chimice prezente în apatita biologică, iar raportul Ca/P este mai mic sau apropiat de cel al hidroxiapatitei stoechiometrice. Stabilirea compoziției chimice a apatitelor osoase cu o acuratețe satisfăcătoare este dificilă datorită performanțelor tehniciilor de analiză actuale; de exemplu, măsurarea concentrației de ioni fosfat și ioni hidroxil din probele de apatită biologică este însotită de incertitudini semnificative. Una dintre cele mai serioase provocări este stabilirea concentrației numeroaselor elemente chimice prezente ca urme elementale. Soluționarea acestei provocări este cu atât mai importantă cu cât proprietățile fiziolegice, chimice sau structurale ale nanocristalelor de os mineral nu sunt date de structura cristalină a apatitei ci de substituțiile și vacanțele specifice acesteia [6, 136, 139].

Apatita biologică este caracterizată de o cristalinitate redusă, care se află în legătură cu dimensiunile mici ale cristalelor și cu tensiunile reziduale din structura cristalină [98]. Pe baza acestor informații, descrierea componentei minerale a osului, în conformitate cu stadiul actual al cunoașterii, a fost enunțată ca „*o apatită slab cristalină, cu numeroase substituții, care conține cristalite de foarte mici dimensiuni*” [98, 138]

### 2.3.2. Hidroxiapatita

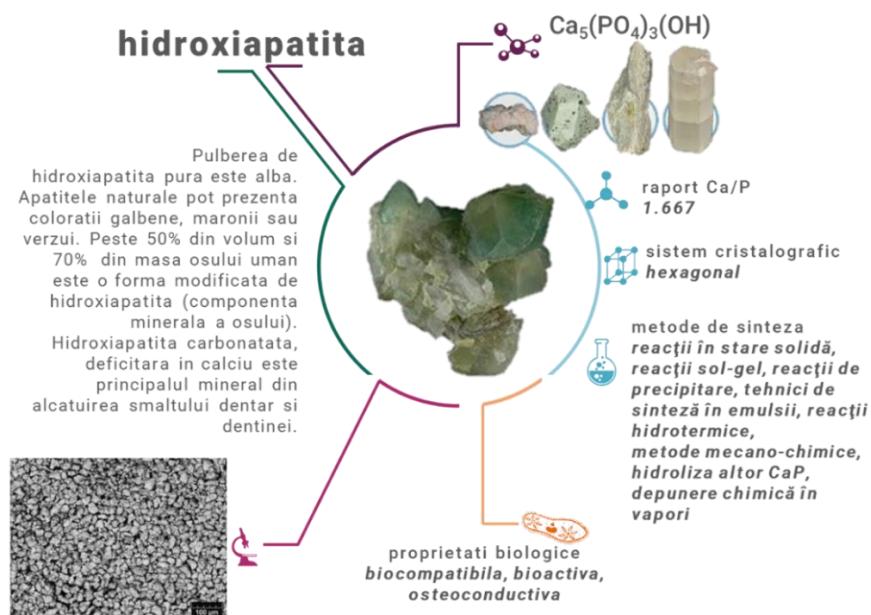
Hidroxiapatita (HA) este, împreună cu fosfatul tricalcic (TCP), cel mai popular fosfat de calciu utilizat în aplicării de reconstrucție osoasă datorită caracterului său bioactiv și similarității cu componenta minerală a ţesutului osos [137]. Hidroxiapatita sintetică poate fi preparată prin reacții în stare solidă, reacții sol-gel, reacții de precipitare, tehnici de sinteză în

<sup>5</sup> Traducere a imaginii furnizate de Bone Biology and Mechanics Lab din cadrul Indiana University – Purdue University din Indianapolis, SUA. Disponibilă online la [www.iupui.edu/~bbml/boneintro.html](http://www.iupui.edu/~bbml/boneintro.html) - accesat 24.02.2018

emulsii, reacții hidrotermale, metode mecano-chimice, hidroliza altor fosfați de calciu sau depunere chimică în vaporii [104, 140, 141]. Alegerea metodei de sinteză influențează proprietățile fizico-chimice, cristalinitatea și afinitățile biologice.

Hidroxiapatita stoichiometrică are formula chimică  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , însă aceasta este scrisă în mod ușual  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  pentru a sublinia că celula sa cristalină conține două entități. Raportul molar Ca/P (egal cu 1.667), este frecvent raportat ca indicator pentru identificarea HA și altor fosfați de calciu [4, 39, 58, 135].

Hidroxiapatita stoichiometrică se regăsește în două forme de cristalizare: hexagonală, cu  $a = b = 9.432 \text{ \AA}$ ,  $c = 6.881\text{\AA}$  și  $\gamma = 120^\circ$ , și monoclinică, cu  $a = 9.421 \text{ \AA}$ ,  $b = 2a$ ,  $c = 6.881\text{\AA}$  și  $\gamma = 120^\circ$ . Ambele forme au aceeași compoziție chimică însă principala diferență este dată de orientarea grupărilor hidroxil în structura cristalină [137].



**Figura 2. 8.** Descriere generală a hidroxiapatitei

Datorită similarității cu țesutul osos, hidroxiapatita a fost evaluată ca fiind biocompatibilă și osteoconductivă, fiind capabilă să susțină adeziunea și proliferarea osteoblastelor, permitând în mod pasiv creșterea și remodelarea osoasă. De asemenea, a fost raportat că hidroxiapatita este capabilă să promoveze formarea țesutului osos *in vivo*, deci este considerată osteoinductivă [122]; cu toate acestea subiectul osteoinductivității hidroxiapatitei este încă supus dezbatării.

Întrucât mecanismele osteoinductivității nu sunt pe deplin înțelese, fenomenul fiind influențat de compoziția chimică, cristalinitatea, stoichiometria, solubilitatea, compoziția suprafeței, micro-porozitatea și rugozitatea materialului, și niciun alt biomaterial actual nu este mai osteoinductiv decât autogrefa osoasă, cercetătorii încearcă stimularea osteogenezei prin introducerea în corpurile poroase ceramice (scaffold-uri) a unor entități active din punct de vedere biologic, precum proteine morfogenetice osoase, factori de creștere și celule osteogenice [98].

### 2.3.3. Fosfatul tricalcic

Fosfatul tricalcic (TCP) are formula chimică  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  și este un fosfat de calciu bioactiv care se dizolvă rapid în mediul fiziologic, ceea ce permite dezvoltarea țesutului osos

după implantare. TCP se regăsește în patru forme polimorfe, dintre care cele mai cunoscute sunt formele  $\alpha$  și  $\beta$  [4].

$\beta$ -TCP (fig. 2.9) este resorbabil și bioactiv, cu o cristalinitate și compoziție chimică asemănătoare componentei minerale a țesutului osos [142], și poate fi preparat prin calcinarea țesuturilor osoase [137]. Materialul și-a demonstrat biocompatibilitatea *in vivo*, testarea  $\beta$ -TCP pe model animal în zona lombară a coloanei vertebrale ducând la obținerea unor rezultate comparabile cu autogrefele osoase [143].

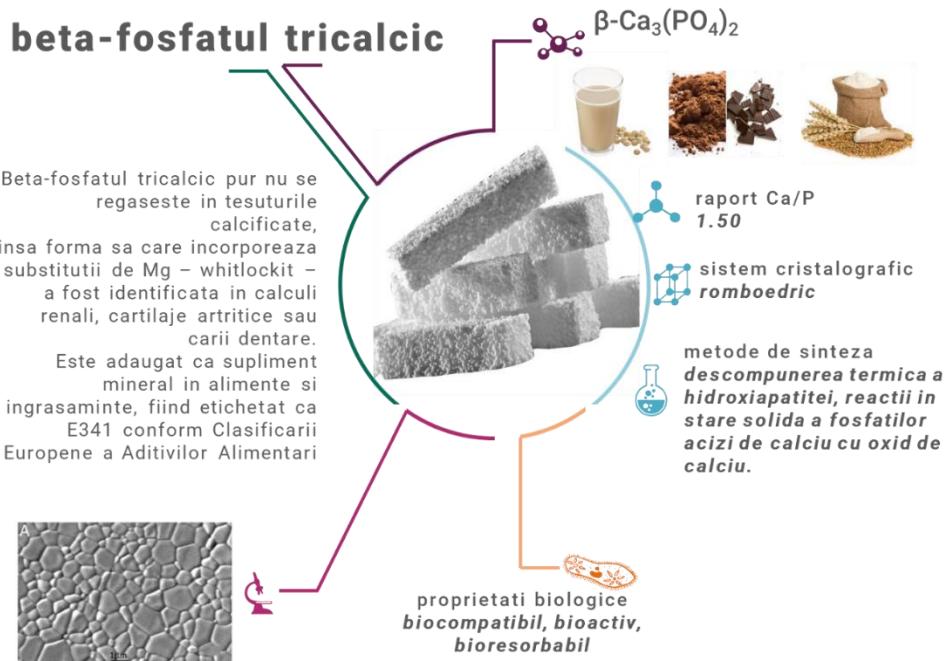


Figura 2. 9. Descriere generală a  $\beta$ -TCP

$\alpha$ -TCP este o formă polimorfă metastabilă de TCP, care are o solubilitate mai mare decât cea a fazei  $\beta$ -TCP.  $\alpha$ -TCP poate fi obținut prin tratamentul termic al formei  $\beta$  la o temperatură situată în jurul valorii de 1100°C, iar cea de-a treia formă a fosfatului tricalcic, super- $\alpha$ -TCP, poate fi obținută la temperaturi mai mari de 1200 °C [144].

$\alpha$ -TCP și  $\beta$ -TCP au aceeași compoziție chimică, însă se deosebesc în mod fundamental în ceea ce privește structura cristalină și solubilitatea,  $\alpha$ -TCP având o reactivitate mai pronunțată în medii apoase și putând fi hidrolizat împreună cu alți fosfați pe bază de calciu. Cimenturile preparate din pulbere de  $\alpha$ -TCP sunt considerate biocompatibile. Deși performanțele *in vivo* ale granulelor de  $\alpha$ -TCP implantate sunt în general pozitive, materialul este considerat a fi resorbit prea repede și a fost investigat cu dificultate ca materie primă pentru granule de dimensiuni mai mari și blocuri ceramice [39, 145, 146].

$\gamma$ -TCP este o fază cu densitate cu aproximativ 10% mai ridicată decât a celorlalte forme, care poate fi sintetizată la presiuni mari. Murayama et al. [147] au reușit să obțină cristale de  $\gamma$ -TCP prin comprimarea hidroxiapatitei sintetice la 12 GPa și 1300 °C. Puține detalii sunt cunoscute cu privire la această formă de fosfat de calciu. Este cunoscut însă că faza este instabilă din punct de vedere chimic la presiuni mai mici de 10GPa și înglobează în structura sa cristalină două vacanțe cationice de dimensiuni mari, ceea ce îi oferă capacitatea de a îngloba în structură cationi mai mari decât Ca [148].

### 2.3.4. Aplicații ale fosfaților de calciu în reconstrucția osoasă

Inițial, fosfații de calciu erau comercializați doar ca blocuri poroase prefabricate și granule. Dezavantajul major al blocurilor poroase era că deși puteau umple defecte osoase cu

forme și dimensiuni predictibile, umplerea defectelor osoase cu formă neregulată astfel încât să se asigure un bun contact os-implant era imposibilă. În prezent, se încearcă rezolvarea acestei limitări a blocurilor prefabricate cu ajutorul metodelor avansate de imagistică combinate cu metode de fabricație aditivă (care să producă implanturi personalizate).

Granulele pot umple majoritatea defectelor osoase, însă manevrarea acestora este laborioasă. Dacă granulele cad în exteriorul defectului osos trebuie îndepărtațe, procedeu care poate decurge cu dificultate. Manevrarea este ușurată prin adevararea dimensiunii granulelor la dimensiunea defectelor osoase; astfel, granulele pentru aplicații dentare au dimensiuni mai mici (<1 mm) comparativ cu cele utilizate în aplicațiile ortopedice (1-6 mm) [98].

Utilizarea fosfaților de calciu în formule injectabile a început în 1983, cu un ciment hidraulic preparat din fosfat tetracalcic și fosfat dicalcic. Deși descoperirea oferea personalului medical șansa de a utiliza produse cu manevrare mult mai facilă și timp de solidificare redus, s-a constatat rapid că cimenturile pe bază de fosfați de calciu nu puteau stabiliza fracturile osoase în mod adecvat fără fixatoare interne. O altă limitare a cimenturilor inițiale era dată de dificultățile de amestecare ale componentelor cimentului și de extrudarea dificilă datorită unei presări preferențiale la injectarea pastei: lichidul dintre particulele de fosfat de calciu migra printre acestea în timpul injectării, ceea ce ducea la obturarea seringii cu o pulbere umedă densificată. Această limitare a fost soluționată în formulele mai recente prin mărirea viscozității lichidului utilizat în amestecare, însă abordarea este costisitoare iar amestecarea cimenturilor implică un număr mare de acțiuni înaintea injectării [98].

Limitările cimenturilor au inspirat cercetătorii să conceapă noi formule de paste modelabile pe bază de fosfați de calciu. Aceste paste conțin particule de fosfat de calciu de 50 – 100  $\mu\text{m}$  înglobate într-o matrice polimerică. Uneori este necesară amestecarea în sala de operație, caz în care pastele sunt combinate cu sânge, măduvă osoasă sau plasmă. Spre deosebire de granule, care se manevrează greu, polimerii din paste asigură coeziunea și mențin particulele ceramice în defectul osos până la închiderea rănii [98, 105].

Corpurile poroase din hidroxiapatită sunt utilizate pentru reconstrucția defectelor osoase rezultate din traume, procese inflamatorii sau osteoporoză [149-151]. Avantajul principal al acestor corpi este suprafața de contact extinsă între implant și țesut, care permite formarea unei interfețe mai puternice și scade mobilitatea implantului [149]. O structură poroasă tridimensională utilizată pentru reconstrucția osoasă este denumită în limba engleză *bone scaffold* [152-156]. O astfel de structură trebuie să fie biocompatibilă și bioresorbabilă, să aibă o rată de degradare/resorbție adaptată regenerării țesutului, să prezinte o chimie a suprafetei adecvată pentru atașarea, proliferarea și diferențierea celulară, să fie poroasă și să aibă proprietăți mecanice asemănătoare țesutului-gazdă.

În funcție de utilizarea lor, scaffold-urile au fost clasificate în [157]:

- *Scaffold-uri osteoconductive*: fabricate din materiale care favorizează migrația și creșterea celulară și oferă suport mecanic pe parcursul regenerării osoase [104, 155, 158, 159].
- *Scaffold-uri transportor*: în care sunt inserate celule osteogenice autogene (colonizate anterior în bioreactoare) pentru a promova osteoinducția. Tot în această categorie pot fi incluse și dispozitivele poroase cu rol în transportul medicamentelor (eng. *drug-delivery devices*) [157, 158, 160-165].

Identificarea cerințelor impuse porozității depinde de utilizarea finală a materialului. Cerințele concrete impuse pentru regenerarea osoasă se referă îndeosebi la dimensiunile/diametrul porilor [157, 166, 167]:

- $100-200 \mu\text{m}$  sunt necesari pentru găzduirea celulelor osoase;
- $75-100 \mu\text{m}$  asigură dezvoltarea de țesut osteoid nemineralizat;
- $10-75 \mu\text{m}$  permit penetrarea de țesut fibros, care asigură suportul mecanic al structurii.

O altă cerință impusă acestor structuri este interconectarea porilor (i.e. existența unor căi de acces între pori care să favorizeze penetrarea vaselor de sânge și a celulelor osoase

[168]), care ar trebui să fie suficientă pentru a asigura migrarea celulară și transportul substanelor nutritive către țesutul nou format [164, 169, 170]. Pentru implanturile ceramice, dimensiunea interconectărilor ar trebui să se încadreze între 20-50  $\mu\text{m}$  [168]. Dimensiunile sunt reduse deoarece conexiunile acționează doar ca niște căi de acces, rolul esențial în regenerare avându-l porii. În cazul dispozitivelor pentru transportul medicamentelor, interconectarea asigură distribuirea unei concentrații uniforme de medicament în întregul volum al dispozitivului [162]. Interconexiunile dintre pori sunt denumite „mesoporozitate” [168].

Monitorizarea cerințelor referitoare la porozitatea scaffold-urilor este asigurată prin caracterizarea morfologică a produselor ceramice. O importanță cel puțin egală trebuie acordată și caracterizării compoziționale, structurale și biologice, care să confirme adecvarea materialelor și produselor pentru utilizarea în aplicații medicale.

Fiecare dintre aceste caracteristici poate fi influențată de etapele de fabricație ale produsului, aşa cum este prezentat în Tabelul 2.2. Metoda de sinteză a pulberilor poate determina variabilitatea compoziției chimice și a morfologiei iar dimensiunea și distribuția dimensiunii agentului pogen precum și procesul de formare și modelare a amestecurilor vor determina macroporozitatea produsului (pori cu dimensiuni  $> 100 \mu\text{m}$ ). După modelare, semifabricatele din fosfați de calciu sunt supuse unor tratamente termice pentru deshidratare ( $50-150^\circ\text{C}$ ), eliminare a agenților pogeni ( $200-500^\circ\text{C}$ ) și sinterizare ( $700-1300^\circ\text{C}$ ). Tratamentele efectuate la temperaturi mai mari de  $500^\circ\text{C}$  duc la creșterea cristalinității, asociată cu creșterea dimensiunii cristalitelor și modificarea limitelor de grăunte, și reducerea porozității, prin controlul prezenței porilor micrometrici (cu dimensiuni  $\sim 10 \mu\text{m}$ ) și submicrometrici (cu dimensiuni  $< 1 \mu\text{m}$ ) [126].

**Tabel 2. 2.** Influența etapelor de preparare a scaffold-urilor asupra caracteristicilor substituentului osos final.

Legendă: (-) = influență minoră; (+/-) = fără influență sau cu influență moderată, în funcție de compoziție; (+) influență moderată; (++) influență puternică [126]

Etapă/ Caracteristică	Compoziție	Cristalinitate	Morfologie pulberi	Microstructură	Porozitate scaffold
Sinteză	++	+	++	-	-
Formare	-	-	+	-	++
Tratament termic	+/-	++	++	++	++

Caracterizarea comportamentului mecanic al produselor poroase este necesară datorită corelației inverse dintre porozitate și rezistența mecanică a materialelor ceramice. În mod ideal, proprietățile mecanice ale materialului trebuie să coincidă cu cele ale țesutului osos natural, care variază între limitele prezentate în Tabelul 2.3:

**Tabel 2. 3.** Proprietățile mecanice ale osului uman [171-174]

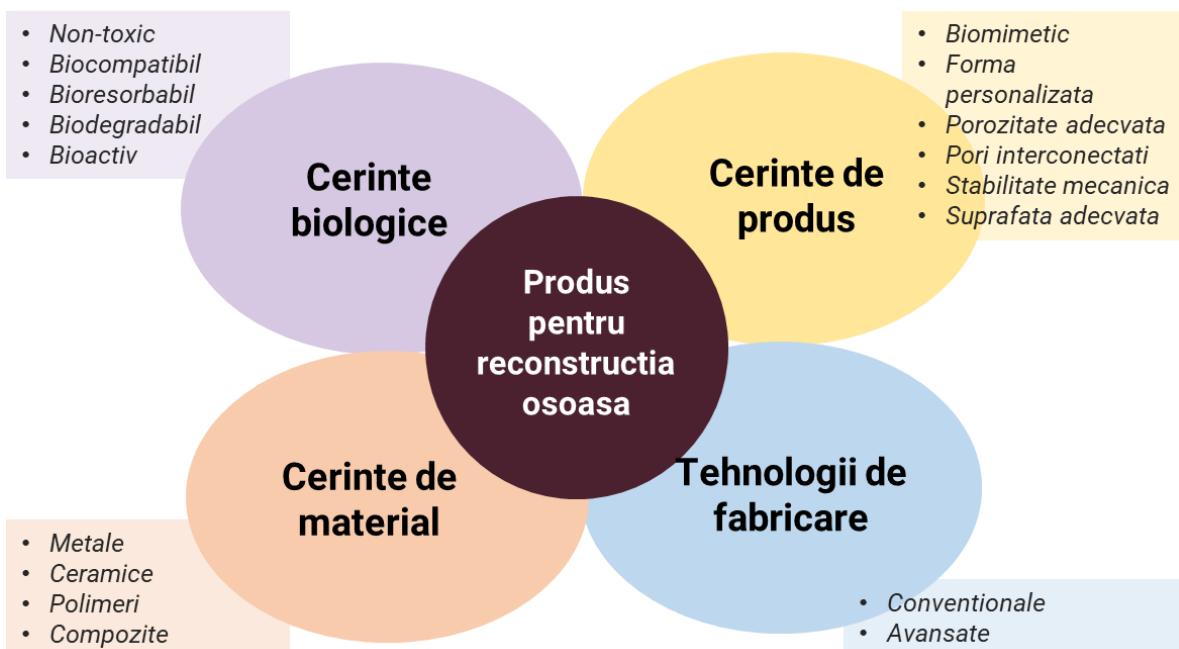
Tipul osului	Rezistență la compresiune (MPa)	Rezistență la încovoiere (MPa)	Rezistență la tracțiune (MPa)	Modulul de elasticitate (GPa)	Porozitatea (%)
Cortical	130 - 180	135 - 193	50 - 151	12 - 18	5 - 13
Spongios	4 - 12	-	1 - 5	0.1 - 0.5	30 - 90

Mai multe articole și recenzii [7, 108, 121] descriu prepararea și testarea scaffold-urilor din fosfați de calciu. Principala provocare din acest domeniu este asigurarea unor proprietăți mecanice adecvate, concomitent cu respectarea cerințelor impuse porozității pentru a permite vascularizarea țesuturilor nou formate.

## 2.4. Etape de fabricare a produselor poroase din fosfați de calciu

### 2.4.1. Proiectarea produselor pentru adiție osoasă

Proiectarea produselor destinate adiției osoase are în vedere scopul final al acestor produse, acela de a furniza o alternativă performantă la grefele osoase care sunt utilizate cu succes în practica medicală curentă, prin dezvoltarea unor substituenți osoși care să faciliteze vindecarea și regenerarea țesutului osos. Strategiile actuale urmăresc obținerea unui substituent osos care să mimeze micromediul țesutului osos prin proiectarea unor structuri aloplastice care să asigure porozitatea adecvată pentru transportul fluidelor biologice și proprietățile mecanice care să asigure suportul mecanic pe parcursul procesului de vindecare.

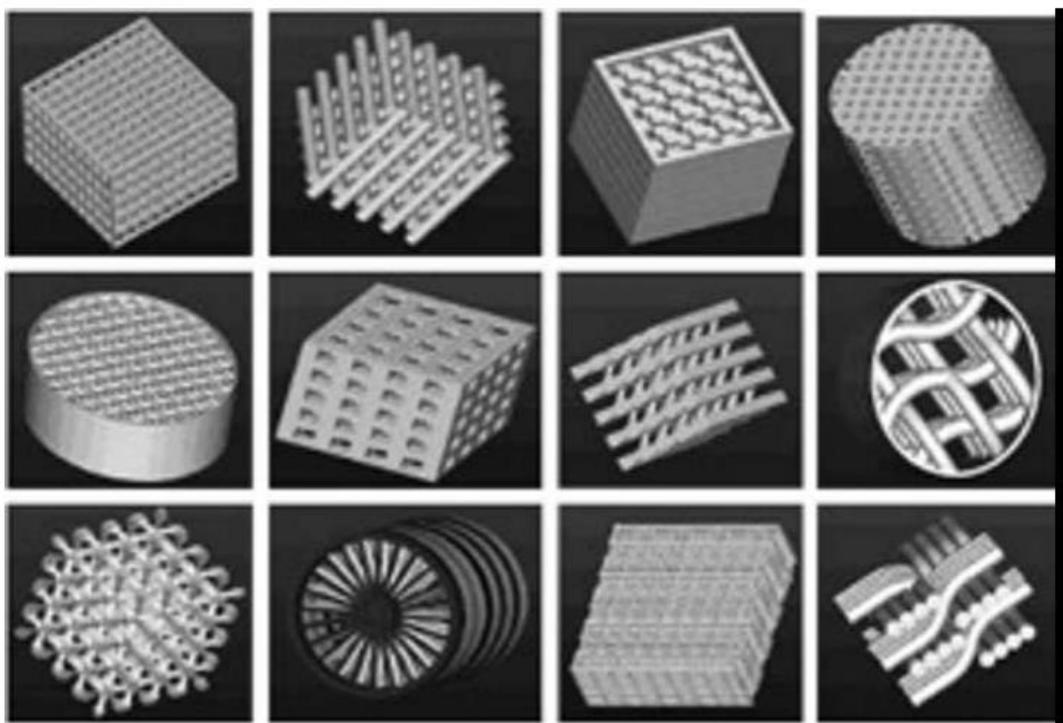


**Figura 2. 10.** Factori implicați în proiectarea unui produs destinat reconstrucției osoase  
(adaptare după ref. [175])

Principalele cerințe de proiectare includ:

- Selecția unui biomaterial cu o viteza de degradare corelată cu viteza de regenerare a țesutului osos și proprietăți mecanice care să asigure stabilitatea mecanică în condițiile biomecanice locale;
- Dezvoltarea unor concepte de produs care să respecte cerințele de porozitate necesare pentru asigurarea vascularizării;
- Dezvoltarea unei tehnologii de fabricare a unor produse adecvate pentru implantare.

Numerouse concepte de produs au fost prezentate în literatura de specialitate (fig. 2.12). Integrarea acestor concepte în fabricarea curentă necesită adaptarea strategiilor de proiectare utilizate de producătorii de dispozitive medicale pentru a susține creșterea sustenabilă a producției și crearea unei experiențe favorabile pentru pacient. Într-un articol publicat de McKinsey&Company pe site-ul lor în iulie 2018, prestigioasa companie de consultanță în management oferea o serie de practice de proiectare menite să înglobeze beneficiile aduse de proiectarea performantă în crearea experiențelor favorabile pentru pacienții cărora le sunt destinate dispozitivele medicale și pentru medicii care manevrează aceste dispozitive [176].



**Figura 2. 11.** Bibliotecă de unități structurale care pot fi utilizate pentru proiectarea de produse de tip scaffold pentru reconstrucție osoasă [177]

Înglobarea acestor strategii de proiectare, care au în vedere implicarea tehnologiilor moderne de fabricație (de tipul printării tridimensionale) în producția curentă și dezvoltarea de produse personalizate pentru reconstrucția osoasă, necesită transformarea proiectării dintr-o etapă preliminară a producției într-un proces care se îmbunătățește permanent pe parcursul ciclului de viață al unui produs. Această schimbare implică totodată modificarea percepției producătorilor cu privire la testarea prototipurilor, care nu trebuie să se mai desfășoare doar în etapele inițiale ale dezvoltării produsului, pentru testarea fezabilității, ci permanent și iterative pentru a “rafina rapid” concepțele de produse destinate reconstrucției osoase. Înglobarea acestor practice de proiectare vizează, în ultimă instanță, transformarea echipelor de proiectare în echipe multifuncționale, în care experții în proiectare să colaboreze cu specialiști din domenii conexe pentru a integra toate cunoștințele informaționale disponibile în concepe orientate către pacienți și către medici [176].

#### 2.4.2. Obținerea și caracterizarea pulberilor de fosfați de calciu

Metodele convenționale de fabricare a ceramicelor presupun procesarea pulberilor până la obținerea unei forme, etapă urmată de densificarea la temperaturi ridicate prin sinterizarea din stare solidă. Obținerea formei prin metode de fabricație aditivă impune respectarea unor cerințe mai stricte de precizie a proiectării și fabricării pentru a asigura uniformitatea și predictibilitatea performanței componentelor [178].

Pulberile ceramice sunt utilizate pentru fabricarea produselor de reconstrucție osoasă sub formă de bloc sau ca și componente ale unor suspensii, paste, filamente sau benzi. Principalii parametri care influențează caracteristicile produselor ceramice finale se referă la (a) *calitatea pulberii* și (b) *interacțiunea dintre pulberi și alți aditivi* utilizați în fabricare [179].

##### a) Cerințe de calitate impuse pulberilor de fosfați de calciu

*Dimensiunea particulelor* – prin dimensiunea particulei se înțelege valoarea unidimensională a parametrilor geometrici care descriu forma particulei, care este proiectată

într-o zonă înscrișă sau circumscrisă unui cerc [180]. O serie de studii efectuate pe pulberi de fosfați de calciu obținute prin diferite metode de procesare au prezentat influența dimensiunii și/sau formei particulelor ceramice asupra proprietăților fizice sau biologice ale materialelor [181-184] și asupra eficienței unor procedee precum fabricarea aditivă sau depunerea fosfaților de calciu pe suprafețe metalice [185-187]. Cerințele referitoare la dimensiunea particulelor sunt mai stringente în cazul fabricației aditive, comparativ cu fabricația convențională. Dimensiunile admise în fabricația aditivă se situează între 15-35  $\mu\text{m}$ , deoarece grosimea unui stratului fabricat aditiv atinge 30-150  $\mu\text{m}$ . Pulberile cu dimensiuni mici nu sunt adecvate pentru utilizare, particulele cu diametre mai mici de 5  $\mu\text{m}$  fiind predispușe la aglomerări care vor duce la formarea de defecte și crateră pe suprafața pulberii în timpul fabricării. Dacă utilizarea unor particule cu dimensiuni mai mici de 5  $\mu\text{m}$  este necesară sau dorită atunci este recomandată granularea particulelor înainte de utilizare sau prepararea unor suspensii [188].

*Forma particulelor* - principalul criteriu de identificare a diferitelor forme ale particulelor se bazează pe raportul dintre dimensiunile particulelor: lungime, lățime, și înălțime. Ca și în cazul dimensiunii particulelor, forma acestora influențează proprietățile biologice [181], porozitatea, proprietățile mecanice ale scaffold-urilor sinterizate [131, 189, 190]. Forma (morfologia) particulelor poate fi optimizată prin adaptarea rutelor chimice [191, 192], sau a parametrilor de tratament termic [193].

*Distribuția dimensiunii particulelor* - Amestecurile de pulberi pot conține particule cu dimensiuni pornind de la câțiva nanometri și ajungând până la câteva sute de micrometri, care sunt împărțite în fractiuni. Cantitatea de particule - din punct de vedere al volumului, masei, numărului, sau a ariei suprafeței din fiecare fractiune - reprezintă distribuția dimensiunii particulelor. Aceasta care se măsoară, în general, simultan cu dimensiunea particulelor, pe același echipament, în condiții standardizate. Este important ca atunci când se analizează o distribuție a mărimii particulelor raportate să se constate dacă aceasta se bazează pe masa particulelor, volumul, sau numărul din fiecare fractiune. Dacă este o pulbere alcătuită dintr-un singur component (spre deosebire de un amestec de pulberi de compoziție diferită), volumul și masa au aceeași semnificație. Dacă însă este măsurat un amestec de pulberi de compoziție diferită, densitatea sau distribuția masei pot fi însoțite de variații și atunci distribuția volumului este considerată semnificativă [180].

*Caracteristici de suprafață* – evaluarea acestora este necesară deoarece suprafața materialelor prezintă caracteristici diferite de cele ale întregului volum al acesteia. În cazul biomaterialelor, proprietățile suprafeței guvernează reacția mediului biologic la interacțiunea cu un dispozitiv medical, prin procese referitoare la adsorbția proteinelor, adeziunea celulelor sau hemocompatibilitate [194]. Evaluarea umectabilității și a caracterului hidrofil/hidrofob reprezintă un pronostic al comportamentului materialelor bioceramice în medii biologice datorită corelației puternice cu adsorbția diferențiată a moleculelor [194]. Pe lângă aceasta, caracteristicile de suprafață ale particulelor ceramice influențează proprietățile corpurilor ceramice: suprafațele particulelor devin limite de grăunte și guvernează calitatea interfețelor dintre aceștia în întregul volum al corpului ceramic [180].

Butscher et al. [186] au identificat o serie de parametri critici în printarea tridimensională. Între aceștia se numără: fluiditatea și stabilitatea materialului pulverulent, capacitatea de umectare a acestuia de către liant precum și desfășurarea reacției dintre cele două componente.

*Fluiditatea pulberii* - necesară pentru a construi straturi subțiri de pulbere, deci pentru a crește rezoluția structurii printate. Principala provocare este dată în acest caz de dimensiunea particulelor: o dimensiune redusă a acestora asigură o bună rezoluție a printării, însă particulele de foarte mici dimensiuni tind să se aglomereze. Fluiditatea pulberii este importantă și în procesul de îndepărtare a pulberii în exces. Din cauza dificultăților ivite la îndepărtarea

pulberilor din structurile printate se recomandă ca porii și cavitățile din structura printată să aibă dimensiuni de cinci ori mai mari decât dimensiunea medie a particulelor [186].

*Stabilitatea pulberii* este un parametru critic în etapa de împrăștiere a liantului, în urma căreia sunt generate cratere care vor conține picătura de liant. Este important ca viteza de împrăștiere a liantului să fie adaptată pentru a evita strămutarea patului de pulbere și eventualele erori dimensionale ale structurii printate. Studiul forțelor care acționează asupra pulberilor în timpul printării tridimensionale include și forțele de compresiune generate de gravitație, ale căror efecte pot fi reduse prin creșterea umidității sau a densității patului de pulbere [186].

*Capacitatea de umectare a pulberii de către liant* va afecta acuratețea dimensională a structurii printate: o capacitate de umectare prea mare duce la împrăștierea excesivă a liantului (afectând rezoluția de printare), iar o capacitate de umectare insuficientă va afecta integritatea mecanică a produsului printat. Capacitatea de umectare depinde printre altele de unghiul de contact dintre pulbere și liant, de vâscozitatea liantului, de reacțiile chimice care au loc între pulbere și liant, de dimensiunea și forma particulelor de pulbere. Clarificarea interacțiunii dintre diferitele tipuri de pulberi ceramice și lianții adecvați și a implicațiilor pentru printarea tridimensională reprezintă o direcție de cercetare viitoare [186].

*Capacitatea de reacție* a pulberii cu liantul este un alt parametru critic în printarea tridimensională. Reactivitatea accentuată poate împiedica împrăștierea liantului, iar reactivitatea redusă duce la acumularea de liant în structură, care poate afecta proprietățile mecanice ale acesteia. Efectul este accentuat în cazul structurilor care sunt sinterizate după printare datorită degradării acestuia. De asemenea, reacția dintre liant și pulbere trebuie să fie suficient de rapidă pentru a preveni împrăștierea nedorită a lichidului în patul de pulbere, dar în același timp suficient de lentă pentru a permite fuziunea dintre straturile printate - difuzia liantului și întărirea materialului trebuie să aibă loc în 1-2 minute, presupunând că un strat este pregătit și printat în 30-60 de secunde [188].

### b) Metode de obținere a pulberilor ceramice

Alegerea metodei de obținere a pulberilor ceramice depinde de tipul de material și de materiile prime implicate în prepararea sa, și de cerințele impuse caracteristicilor pulberii. Cele mai cunoscute metode de obținere a pulberilor ceramice sunt prezentate în tabelul 2.4 [180]:

**Tabel 2. 4:** Metode uzuale de sinteză a pulberilor (traducere din ref. [180])

Metoda de preparare a pulberii	Avantaje	Dezavantaje
<b>METODE MECANICE</b>		
Cominuție (măcinare)	Economică Aplicabilitate largă	Puritate limitată Omogenitate limitată Dimensiuni mari ale particulelor
Sinteză mecano-chimică	Temperatură joasă Adecată pentru non-oxizi Dimensiuni mici ale particulelor	Puritate limitată Omogenitate limitată
<b>METODE CHIMICE</b>		
<i>Reacții în stare solidă</i>		
Descompunere Reacții între solide	Aparatură simplă Economică	Pulbere aglomerată Omogenitate limitată
<i>Reacții în soluții lichide</i>		

Metoda de preparare a pulberii	Avantaje	Dezavantaje
Precipitare sau co-precipitare; Pulverizare prin uscare, Pulverizare prin piroliză, Uscare prin înghețare Rute gel (sol-gel; Pechini)	Puritate înaltă Omogenitate chimică Control al compoziției Dimensiuni mici ale particulelor	Costisitoare Pulberi aglomerate Aplicabilitate redusă pentru non-oxizi
Reacții lichide non-apoase	Dimensiuni mici ale particulelor Puritate înaltă	Aplicabilă doar pentru non-oxizi
<i>Reacții în stare de vapozi</i>		
Reacții gaz-solid	Economică (pentru pulberi de dimensiuni mari)	Costisitoare (pentru pulberi de dimensiuni mici) Puritate limitată
Reacții gaz-lichid	Dimensiuni mici ale particulelor Puritate înaltă	Aplicabilitate limitată Costisitoare
Reacții între gaze	Dimensiuni mici ale particulelor Economică (pentru oxizi) Puritate înaltă	Costisitoare (pentru non-oxizi) Pulberi aglomerate

Principalele etape ulterioare preparării pulberilor vizează [195]:

- *curățarea pulberii* pentru îndepărțarea reziduurilor solide sau gazoase superficiale printr-un procedeu de degazare (metode la rece/cald, statice/dinamice);
- *fixarea pulberii pentru pulverizare*, pentru corecția mărimii și distribuției particulelor, în timpul etapei de procesare;
- *combinarea și amestecarea pulberilor* (în condiții umede sau uscate) pentru a obține amestecuri de pulberi omogene pentru etapa de formare.
- *tratamente termice* - un tratament des folosit este recoacerea în diferite atmosfere, care permite îmbunătățirea puritatei chimice a pulberii, modificarea morfologică a particulelor de pulbere sau transformări benefice din punct de vedere mecanic și structural.

#### 2.4.3. Fabricarea produselor ceramice poroase

##### a) Metode de fabricare convențională

În structurile ceramice destinate unei game largi de aplicații industriale se încearcă evitarea porozității datorită naturii fragile a acestor materiale. Cu toate acestea, utilizarea blocurilor ceramice în reconstrucția osoasă se bazează tocmai pe asigurarea unei porozități care să satisfacă cerințele necesare pentru adeziunea, proliferarea și vascularizarea celulelor osoase din imediata vecinătate a unui bloc ceramic implantat.

Cele mai directe metode de procesare a materialelor ceramice poroase sunt sinterizarea parțială a unor pulberi compactate și sinterizarea unor amestecuri pulverulente care să faciliteze formarea porilor prin desfășurarea unor reacții în stare solidă. Această metodă asigură o porozitate redusă (<60 vol%), cu pori distribuiți uniform în microstructură.

Pe lângă această metodă directă, o serie de metode au fost dezvoltate mai recent ca răspuns la creșterea gamei de aplicații ale ceramicelor poroase. Cele mai aplicate sunt acele tehnici versabile, care permit reglarea deliberată a porozității, morfologiei porilor și distribuției dimensiunii acestora, și care pot fi aplicate pentru o gamă largă de precursori ceramici.

Metoda replicilor polimerice (fig. 2.12) este o metodă simplă de a prepara structuri celulare deschise cu pori de 3 – 200 mm la nivele de 40 – 95% porozitate. Reologia suspensiei impregnate și adeziunea acesteia față de buretele polimeric sunt cei mai importanți parametri

de monitorizare ai metodei. În pofida simplității metodei, rezistența mecanică a structurilor celulare produse prin această rută poate fi degradată substanțial pe parcursul pirolizei buretelui polimeric prin formarea fisurilor.

Metodele care utilizează agenți de sacrificiu (fig. 2.12) reprezintă o alternativă directivă pentru fabricarea ceramicilor macroporoase cu porozitate de 20-90% și dimensiuni ale porilor de 1-700  $\mu\text{m}$ . Aceste metode duc la obținerea de pori predominant deschiși, cu diferite morfologii. Etapa esențială din cadrul acestor metode este îndepărțarea agentului porogen prin piroliză, evaporare sau sublimare. Aceste procese pot fi însoțite de eliberarea unor cantități semnificative de gaz și trebuie efectuate la viteze suficiente de joase pentru a evita fisurarea structurii poroase. Îndepărțarea lentă a agentului porogen poate crește timpul de procesare în cazul corpuriilor de dimensiuni mari, însă rezistența mecanică obținută prin aceste metode este în general superioară celei obținute cu metodele bazate pe replici polimerice.

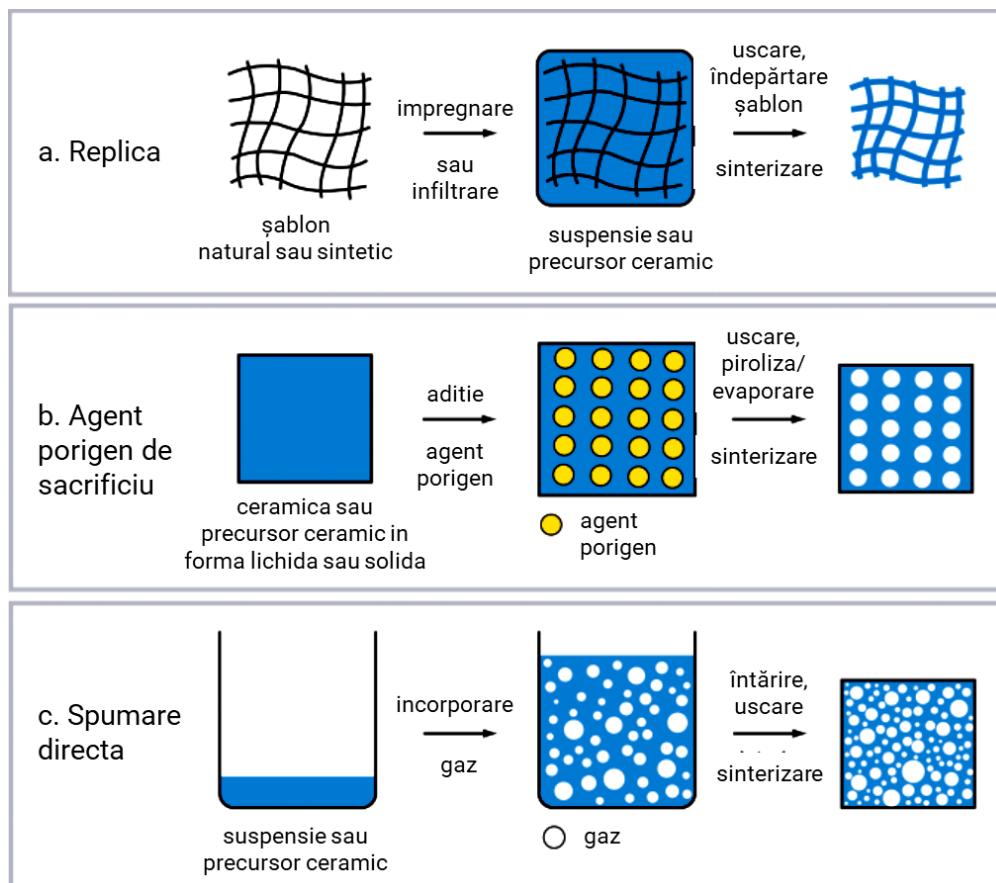


Figura 2. 12. Metode convenționale de fabricare a produselor ceramice poroase [196]

Metodele de spumare (fig. 2.12) sunt utilizate pentru prepararea simplă, economică și rapidă a ceramicelor macroporoase cu porozități închise sau deschise care variază între 40 – 97%. Porii produși prin această metodă rezultă din încorporarea directă a unor bule de aer într-o suspensie ceramică, eliminând necesitatea pirolizei îndelungate înaintea sinterizării. Stabilizarea și solidificarea suspensiei ceramice sunt etapele esențiale ale metodelor de spumare. Spumele stabilizate cu surfactanți permit prepararea de ceramici poroase cu dimensiuni ale porilor de 1.2 – 35 mm. Utilizarea particulelor ceramice cu suprafață modificată pentru stabilizarea spumelor ceramice scade dimensiunea porilor la 10 mm. Aceste dimensiuni rezultă din stabilitatea pe termen lung a spumelor, obținută prin adsorbția ireversibilă a particulelor din suspensia coloidală la interfața apă-aer. Structurile poroase obținute prin metode de spumare prezintă o rezistență mecanică superioară tehniciilor bazate pe replici [196].

**b) Metode de fabricare aditivă**

„Fabricație aditivă” este termenul oficial care definește procesul de ”îmbinare” (adăugare) al materialelor pentru a crea componente pe baza unor modele tridimensionale digitale. Spre deosebire de metodele clasice de fabricație, care presupun îndepărțarea (scădere) unei cantități de material dintr-un bloc de dimensiuni mai mari, fabricația aditivă propune o abordare inovativă: construcția componentelor pornește de la unități de mici dimensiuni și are loc gradual - de cele mai multe ori în straturi - pe baza unor modele CAD tridimensionale “feliate” în secțiuni bidimensionale. Fabricația aditivă (eng. *additive manufacturing*) mai este denumită în literatura scrisă în limba engleză și “*additive layer manufacturing*”, “*layer(ed) manufacturing*”, „*(solid) freeform fabrication*”, „*rapid tooling*”, „*direct writing*”, sau „*biofabrication*”<sup>6</sup> [197-203].

Fabricația aditivă implică trei etape principale: (1) *proiectarea CAD*, prin concepția unui model 3D sau prin inginerie inversă (de ex. scanarea tridimensională a unui obiect deja existent); (2) *producția*, în care echipamentul construiește straturi de material pe o platformă-suport; și (3) *post-producția*, care include prelucrarea sau finisarea suprafeței și îndepărțarea materialelor în exces [204].

În cadrul primei etape, componenta este proiectată într-un program CAD, care este ulterior exportată ca fișier .STL<sup>7</sup>. În acest tip de fișier suprafața piesei este reprezentată de o rețea alcătuită din triunghiuri de diferite dimensiuni. Cu cât dimensiunile elementelor de rețea (triunghiurilor) sunt mai reduse cu atât acuratețea modelului va fi mai bună, cu toate acestea micșorarea dimensiunilor elementelor de rețea necesită calculatoare performante, iar fișierul rezultat va avea dimensiuni mari, care vor încetini și procesul de printare; deci se impune un compromis între acuratețea modelului și timpul necesar producției. Fișierul .STL este apoi transmis către echipamentul de fabricație aditivă, care „feliază” modelul digital în secțiuni cvasibidimensionale cu grosimi de ordinul micronilor - straturile de material fabricate aditiv. Dacă este necesar, diferite structuri-suport pot fi proiectate din programul software al echipamentului.

Etapa de construcție efectivă a modelului are loc pe o platformă, gradual, fiecare strat al mediului fiind alipit straturilor anterioare până la completarea piesei [197]. Utilizarea fabricației additive în procesele de producție care funcționează după principiile managementului calității include câteva etape suplimentare, succesiunea acestora fiind: (1) proiectarea conceptului, (2) proiectarea parametrică, (3) analiza și optimizarea modelului pe baza metodei elementului finit, (4) crearea prototipului, (5) testarea și evaluarea prototipului și (6) fabricarea produsului finit [204].

Atunci când materialele și metodele sunt selectate corespunzător, fabricația aditivă poate îmbunătăți semnificativ procesele de producție. Printre cele mai importante avantaje ale fabricării additive se numără: (1) *fabricarea unui număr teoretic infinit de forme* – deoarece oferă flexibilitate în definirea formei componentelor, permite printarea unor straturi diferite în cadrul aceleiași componente, și utilizarea de structuri-suport pentru fabricarea straturilor cu cavități și degajări, și (2) *posibilitatea de a personaliza macrostructura și microstructura*.

---

<sup>6</sup> În unele lucrări termenul „printare tridimensională” (eng. *tridimensional printing*), descrie toate metodele de fabricație aditivă iar alteori se referă la denumirea comercială a unei metode de fabricație aditivă care presupune împărtăierea unui liant peste un pat de pulbere (eng. *binder jetting*). În această lucrare termenul „**printare tridimensională**” descrie metoda specifică de fabricare de tip *binder jetting*, iar termenul simplu „**printare**” descrie etapa de construcție a straturilor fabricate aditiv, indiferent de metodă.

<sup>7</sup> Inițial, acronimul STL se referea la metoda *STereoLithography*, tradusă „stereolitografie”, prima metodă de fabricație aditivă. După dezvoltarea altor metode de fabricație, acronimul a fost convertit în *Standard Tessellation Language* sau *Standard Triangle Language*.

*componentei fabricate*<sup>8</sup>, deoarece o structură fabricată aditiv poate fi proiectată până la nivelul a câțiva zeci de micrometri, unde accentul se pune pe textura locală a suprafeței și pe porozitate [197, 199].

Abordarea și avantajele fabricației aditive stimulează creativitatea în producție. Companiile pot economisi spațiu prin replicarea la comandă a pieselor sau pot reduce timpul comenzilor și așteptării prin furnizarea unor instrucțiuni de printare pe care utilizatorul să le folosească cu o imprimantă proprie. De asemenea, metodele de fabricație aditivă pot fi utilizate pentru crearea de produse personalizate și pentru îmbunătățirea eficienței ecologice a sistemelor de producție, iar clienții pot fi implicați în procesele de creație, pentru a adapta și transforma produsele existente [202]. Utilizarea metodelor de fabricație aditivă în procesele de producție este limitată deocamdată, deoarece multe dintre tehnologii prezintă unele dezavantaje. În general, fabricația aditivă se confruntă cu limitări legate de:

- *Crearea și modificarea fișierului CAD*: personalizarea componentelor impune fișierelor CAD să se adapteze rapid și în mod economic la un număr mare de posibile modificări. Provocările sunt și mai mari în cazul componentelor cu geometrie complexă. Astfel, „*designerii CAD se văd nevoiți să proiecteze nu o singură structură ci un întreg proces în care o structură prezintă parametri configurabili*” [197]. Limitarea este rezolvabilă prin parametrizare și proiectare intelligentă.
- *Erori asociate materialelor și echipamentelor*, care afectează performanțele tehnicilor și depind de parametri specifici echipamentului, proprietăți de material, dimensiunea fasciculului laser, diametrul duzei de eliminare a liantului, dimensiunea particulelor de pulbere, distribuția energiei fasciculului laser, etc.;
- *Dificultatea preprocesării*: unele metode presupun utilizarea de filamente sau micro-pulberi care fie nu sunt disponibile în comerț, fie se găsesc în cantitate limitată; pregătirea materialelor în aceste forme devine un factor critic din cauza modificărilor chimice și mecanice care pot fi induse [199].
- *Desfășurarea lentă a proceselor*: în cadrul metodelor de fabricație aditivă, rezoluția variază invers proporțional cu viteza de printare. De asemenea, cerințele impuse gradului de finisare a suprafeței (o suprafață bine finisată impune fabricarea unor straturi mai subțiri) pot suplimenta timpul alocat fabricării.
- *Dificultatea post-procesării*: riscul blocării unei cantități de precursor în canalele sau porii structurii printate este semnificativ pentru majoritatea metodelor de fabricație aditivă. Îndepărțarea materialelor blocate în structură depinde de starea de agregare, viscozitate și rugozitatea suprafeței. Rugozitatea suprafeței poate implica și necesitatea unor prelucrări suplimentare ale suprafeței [197, 205]. Deși reducerea grosimii stratului printat ar putea îmbunătăți calitatea suprafeței obținute, procesul depinde și de alți factori precum distribuția dimensiunii pulberilor sau vâscozitatea suspensiei/pastei utilizate.
- *Acuratețea dimensională* a componentei printate este puternic influențată de contractia materialului, care are loc în timpul post-procesării, întrucât cele mai multe materiale ceramice necesită un tratament termic final care să le densifice microstructura și să le îmbunătățească proprietățile mecanice. Acest aspect poate fi soluționat prin proiectarea cu adaosuri dimensionale, însă evoluția contractiei din timpul post-procesării trebuie cunoscută înaintea compensării dimensionale [178].
- *Anizotropia proprietăților componentelor*: unele metode de fabricație aditivă conferă structurilor proprietăți mecanice diferite pe direcția orizontală față de cea verticală și există

---

<sup>8</sup> Macrostructura (la nivel de milimetri) determină aspectul exterior și structura (forma) produsului, iar microstructura (la nivel de sute de micrometri) cuprinde dimensiunea, orientarea și suprafața porilor, influențând succesul utilizării practice a produsului.

posibilitatea sinterizării diferite a particulelor pe cele două direcții. Variația proprietăților mecanice se manifestă și în interiorul straturilor și poate crește semnificativ în fabricarea simultană a mai multor piese identice, dacă programele echipamentului orientează piesele pe direcții diferite pentru a economisi timp și spațiu.

- *Costul ridicat:* Costul ridicat al fabricării echipamentelor este datorat atât echipamentelor cât și materialelor utilizate. Procesarea suplimentară, manipularea în condiții speciale (ex: în atmosferă inertă), cerințele de calitate impuse materialelor și achiziționarea lor în loturi mici cresc suplimentar costurile de fabricație [197].
- *Provocări legale și etice:* posibilitatea utilizării fabricației aditive direct de către consumatori este asociată cu îngrijorări legate de proprietatea intelectuală (similară celor existente în industria muzicală și cinematografică), de originalitatea produselor fabricate (un consumator poate scăna oricând un obiect original pentru a-l printa de acasă) și de siguranța acestora (disponibilitatea echipamentelor ar putea facilita printarea de substanțe chimice ilicite, arme, etc.) [202].
- *Standardizarea și certificarea proceselor și produselor:* abordarea clasică a certificării, care include testarea materialelor și a componentelor fabricate în condiții controlate și respectând normele prevăzute în standarde tehnice recunoscute la nivel internațional, nu este aplicabilă în cazul fabricației aditive tocmai datorită avantajului major al acesteia de a produce componente unice (a căror testare individuală este costisitoare). Standardizarea și certificarea componentelor fabricate aditiv rămâne o limitare stringentă din cauza necesității de a controla variabilitatea indusă de materiale și de procesele de fabricație, astfel încât proprietățile componentelor să nu depășească toleranțele acestora. Certificarea și standardizarea devin și mai importante în domeniile în care siguranța este primordială, precum industria automobilelor, industria aeronautică sau industria medicală.

În prezent, organizațiile specializate încearcă să găsească alternative viabile la abordările clasice ale certificării și standardizării pentru a sprijini integrarea metodelor de fabricație aditivă în producție. Procesul de standardizare al domeniului a început în 2009, când ASTM a identificat nevoia de standardizare și certificare în domeniu și a înființat Comitetul Internațional F42 (International Committee F42) responsabil cu standardizarea fabricației aditive, și a continuat în 2011, cu înființarea comitetului tehnic ISO TC-261 pentru fabricația aditivă. Cele două comitete colaborează în prezent pentru dezvoltarea de standarde comune (tabel 2.5) care să armonizeze fabricația aditivă la nivel global [201].

**Tabel 2.5.** Standarde tehnice specifice fabricației aditive [5]

Domeniu	Cod și titlu
Proiectare	ISO/ASTM52915 – Specificație standard pentru formatul fișierelor pentru fabricație aditivă (AMF) Versiunea 1.1.
Proiectare	Document de lucru ASTM 38342 – Proiectare pentru fabricația aditivă
Proiectare	Document de lucru ASTM 51841 - Principii de proiectare în fabricația aditivă
Principii generale și terminologie	ASTM F2792 - Terminologie standard pentru tehnologiile de fabricație aditivă
Principii generale și terminologie	ISO/PRF 17296-1 – Fabricație aditivă – Principii generale – Partea 1: Terminologie
Principii generale și terminologie	ISO 17296-2 – Fabricație aditivă – Principii generale – Partea 2: Expunere a categoriilor de procese și materii prime
Principii generale și terminologie	ISO 17296-3 – Fabricație aditivă – Principii generale – Partea 3: Caracteristici principale și metode de testare aferente

Domeniu	Cod și titlu
Principii generale și terminologie	ISO 17296-4 – Fabricație aditivă – Principii generale – Partea 4: Expunere a procesării datelor
Principii generale și terminologie	ISO/ASTM 52921 – Terminologie standard pentru fabricația aditivă – Sisteme de coordonate și metodologii de testare
Principii generale și terminologie	ISO/ASTM 52900 – Fabricație aditivă – Principii generale – Terminologie
Principii generale și terminologie	ISO/ASTM DIS 52901 – Fabricație aditivă – Principii generale – Cerințe pentru componentele fabricate aditiv cumpărate
Principii generale și terminologie	Document de lucru ASTM 51458 – Tehnologii de fabricație aditivă
Materiale și procese	ASTM F3091 / F3091M – Specificație standard pentru procesarea materialelor plastice prin fuziune a paturilor de pulbere (Powder Bed Fusion)
Materiale și procese	ISO/ASTM CD 52903-1 – Fabricație aditivă – Specificație standard pentru procesarea materialelor plastice prin extrudare (Material Extrusion) – Materii prime - Partea 1: Materii prime
Metode de testare	ASTM F2971 - Practică standard pentru raportarea datelor pentru probe de test fabricate aditiv
Metode de testare	Document de lucru ASTM 51282 – Fabricație aditivă. Principii generale. Cerințe pentru componentele fabricate aditiv cumpărate

Până în prezent, metodele de fabricație aditivă au fost utilizate rar pentru fabricarea corpuri poroase din fosfați de calciu. Procesarea materialelor a fost posibilă prin metode indirekte, în care fosfatul de calciu este utilizat cu un material polimeric care să îmbunătească procesarea. Cele mai importante materiale polimerice utilizate în fabricarea aditivă a fosfaților de calciu și argumentarea utilizării acestora sunt prezentate în tabelul 2.6.

În cadrul metodelor de fabricație aditivă adecvate pentru fosfați de calciu *Robocasting* poate fi utilizată în etapa de formare a amestecurilor, fiind o metodă de fabricație aditivă pentru ceramice și compozite, care se bazează pe depunerea în straturi a suspensiilor coloidale dense, materialele printate putând fi densificate ulterior prin sinterizare.

Robocasting [206], o metodă de fabricație aditivă similară cu metodele denumite în literatura de specialitate “*direct ink writing*” [207], “*direct write assembly*” [208, 209] și “(*micro-*) *robotic deposition*” [210, 211], a stârnit interes pentru fabricarea scaffold-urilor osoase, deoarece poate asigura obținerea unor produse printate cu o rezistență mecanică superioară și se poate adapta pentru o gamă largă de materiale [212].

Metoda implică extrudarea (la temperaturi și presiuni joase) a unui filament de “cerneală” și fuziunea acestuia cu filamentele extrudate anterior prin intermediul tensiunii superficiale. Întrucât calitatea componentelor imprimate este influențată în principal de compoziția și proprietățile cernelii, aceasta trebuie să fie omogenă, adecvată pentru extrudarea prin duze fine și capabilă să solidifice rapid pentru a-și susține greutatea după extrudare.

Calitatea precursorilor are o influență semnificativă asupra caracteristicilor cernelii, principalele criterii de calitate fiind dimensiunea și geometria particulelor de pulbere ceramică și distribuția dimensiunii acestora. Este necesar ca particulele ceramice utilizate să aibă dimensiuni micrometrice, mai mici decât diametrul duzei de extrudare, pentru a preveni infundarea acesteia pe parcursul extrudării. De asemenea geometria și dimensiunea particulelor trebuie selectate astfel încât să contribuie la consolidarea cernelii și să prevină formarea de bule de aer care să compromită stabilitatea mecanică a cernelii după extrudare [185, 186, 209, 212].

**Tabel 2. 6.** Metode de fabricație aditivă utilizate pentru procesarea de amestecuri ceramică-polimer[213]

Material ceramic	Material polimeric	Metodă de fabricație aditivă	Argumentare	Ref.
HA	PCL	Extrudare	PCL este un polimer biocompatibil, care se degradează încet, însă poate induce reacții inflamatorii și își poate pierde rezistența mecanică din cauza degradării termice. HA poate îmbunătăți bioactivitatea și proprietățile mecanice ale PCL, reducând mediul acid cauzat de degradarea PCL.	[214]
HA	PCL	SLS	PCL are o stabilitate termică excelentă pentru SLS. HA poate îmbunătăți biocompatibilitatea și bioactivitatea PCL.	[215, 216]
Nano-HA	PDLLA	SLA	PDLLA este adecvat pentru fabricarea prin SLA, însă natura sa fragilă îl limitează domeniul de aplicare. HA nanometrică este capabilă să îmbunătățească proprietățile biologice și mecanice ale scaffold-urilor compozite	[217]
TCP	PLGA/PCL	Extrudare	PLGA contribuie la reconstrucția țesuturilor, dar nu își poate menține forma datorită proprietăților mecanice modeste și a degradării rapide. TCP este biocompatibil, osteoconductiv și poate îmbunătăți proprietățile mecanice ale PLGA. PCL a fost utilizat pentru ușurarea procesării compozitului.	[218]
TCP	Polipropilenă (PP)	FDM	Polipropilena prezintă o bună rezistență la fisurare, iar procesarea sa prin FDM este facilă.	[219]
TCP	PCL	FDM	PCL are o temperatură de topire joasă, ~60°C și o temperatură de depunere de ~350°C, fiind adecvată pentru FDM. TCP este oesteoconductiv și prezintă un răspuns imunologic minim.	[220]
TCP	PDLLA	SLM	PDLLA are o temperatură de topire joasă care permite lipirea particulelor de TCP de matricea polimerică. Încorporarea TCP reduce aciditatea mediului cauzată de degradarea polimerului.	[221]
TCP	PLLA	Extrudare (la temperatură joasă)	PLLA este utilizată pentru temperatura joasă de procesare. Adiția de TCP poate îmbunătăți proprietățile mecanice și biologice ale materialului final.	[222]
HA/TCP	Agaroză	SLA	Agaroză este un hidrogel biocompatibil. HA/TCP prezintă proprietăți biologice excelente pentru reconstrucția osoasă.	[223]

**Unde:**

HA = hidroxiapatită

PLGA = acid polilactic-co-glicolic

TCP = fosfat tricalcic

SLA = stereolitografie

PCL = policaprolactonă

SLS = sinterizare selectivă cu laser

PDLLA = poli(DL-acid lactic)

FDM = modelare prin extrudare termoplastica

Procesul se bazează pe extrudarea suspensiilor ceramice coloidale alcătuite din 50-65% volum de pulbere ceramică, maxim 1% aditivi organici și 35-50 % solvenți volatili (de obicei apă) (Tabel 2.7). Deoarece eliminarea liantului nu reprezintă o etapă în fabricarea produsului printat, un material ceramic dens poate fi obținut, uscat și sinterizat în mai puțin de 24 de ore

**Tabel 2. 7.** Amestecuri utilizate cu tehnica Robocasting pentru fabricarea scaffold-urilor ceramice

Material ceramic	Solvent	Agent de dispersare	Agent de îngroșare	Agent de gelificare	Agent de funcționalitate	Agent anti-spumare	Ref.
HA	Apa	PAA +NaOH	HCPM	PEI	-	1-octanol	[224]

Material ceramic	Solvent	Agent de dispersare	Agent de îngroșare	Agent de gelificare	Agent de funcționalitate	Agent anti-spumare	Ref.
BCP	Apa	PAA	HCPM	PEI	-	-	[208]
Sticla bioactivă 45S5	Apa	-	CMC	-	rGO	-	[225]
Zirconie tetragonală stabilizată cu yttriu	Rășini polimerizabile UV	-	-	-	-	-	[226]
$\beta$ -TCP + $\text{CaCO}_3$	Apa	Darvan C	HCPM	PEI	-	-	[227]
HA + $\beta$ -TCP	Apa	Pluronic F-127	-	Sirop de porumb alimentar	-	1-octanol	[228]
HA	Apa + PVA	Darvan C	HCPM	PEI	-	-	[227]
Si-HA	Apa distilată	Darvan C	HCPM	PEI	-	-	[229]
Si-HA	Apa distilată	-	-	Gelatina	Vancomicina	-	[230]

**Unde:**

HA = hidroxiapatita

BCP = fosfat de calciu bifazic

$\beta$ -TCP = beta-fosfat tricalcic

$\text{CaCO}_3$  = carbonat de calciu

Si-HA = HA dopată cu siliciu

UV = ultraviolet

PVA = alcool polivinilic

PAA = acid poliacrilic

NaOH = hidroxid de sodiu

Darvan C = polimetacrilat de amoniu

Pluronic F-127 = surfactant de tip poliol

Darvan C = polimetacrilat de amoniu

HCPM = 2-hidroxi-3-cardanilpropil methacrilat

CMC = carboximetilceluloză

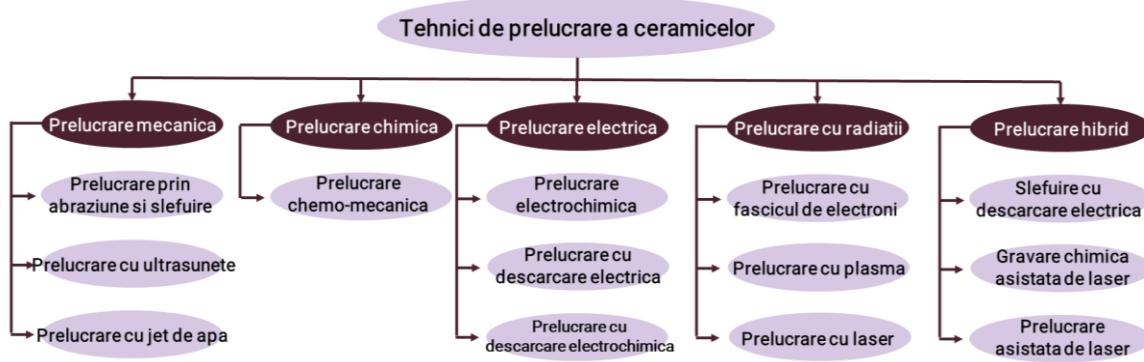
PEI = polietilenimină

rGO = oxid de grafenă redus

O serie de materiale ceramice, precum hidroxiapatita, beta-fosfatul tricalcic sau biosticla au fost utilizate pentru obținerea de scaffold-uri prin robocasting [224, 227-229, 231]. Optimizarea tehnicii de fabricație presupune, printre altele, și îmbunătățirea comportamentului la injectare al pastelor bazate pe fosfați de calciu. Diferiți polimeri hidrosolubili sunt utilizați pentru a îmbunătăți procesarea pastelor. Selectia lor este efectuată și în funcție de îmbunătățirile suplimentare pe care le pot aduce produselor finite: de exemplu, utilizarea gelatinei în pastele de fosfați de calciu destinate fabricării prin robocasting contribuie totodată la îmbunătățirea proprietăților mecanice [232-235] sau biologice [229, 236-238]. Materiile prime utilizate cu fosfații de calciu în aplicațiile robocasting recente sunt prezentate în tabelul 2.7.

### c) Metode de prelucrare a produselor ceramice poroase

Materialele ceramice prezintă caracteristici utile pentru o gamă largă de utilizări, însă duritatea ridicată și fragilitatea acestora duc la prelucrarea cu dificultate a pieselor cu geometrii complexe prin metode convenționale de șlefuire și prelucrare mecanică. Rezistența și eficiența componentelor poate fi afectată de degradarea suprafețelor ceramice provocată de prelucrarea mecanică prin metode convenționale. De aceea, o etapă foarte importantă în fabricarea produselor ceramice este prelucrarea lor cu costuri reduse, menținând o calitate excelentă. Eforturile din domeniul prelucrărilor de finisare a componentelor ceramice s-au concretizat în dezvoltarea unor tehnici avansate care permit obținerea unor geometrii complexe fără afectarea proprietăților suprafeței acestora. O parte dintre tehnici sunt clasificate în fig. 2.13 și descrise mai jos [239].



**Figura 2. 13.** Clasificare a tehnicilor de prelucrare a produselor ceramice [239]

- *Prelucrări mecanice* – acestea presupun îndepărțarea materialului prin supunerea produsului ceramic la acțiunea forțelor mecanice a unor particule abrazive. O serie de tehnici din această categorie utilizate în mod ușual sunt prelucrarea prin abraziune/șlefuire, prelucrarea cu ultrasunete și prelucrarea cu jet de apă;
- *Prelucrări chimice* – acest grup de tehnici utilizează diferite substanțe chimice care atacă materialele ceramice și îndepărtează porțiuni reduse din suprafața acestora. Metoda nu este adecvată pentru obținerea de colțuri ascuțite, cavități adânci sau materiale poroase;
- *Prelucrări electrice* – aceste tehnici utilizează energie electrică continuă sau pulsată, uneori în combinație cu substanțe chimice, pentru a eroada materialul. Tehnicile electrice sunt deosebit de eficiente pentru a prelucra materiale conductoare sau semiconductoare. Cele mai cunoscute tehnici sunt prelucrare electrochimică, prelucrarea cu descărcare electrică și prelucrarea cu descărcare electrochimică;
- *Prelucrări cu radiații* – tehniciile de prelucrare cu radiații sunt procese non-contact în care dimensiunile găurilor sau gologorilor din material sunt controlate prin cantitatea de energie direcționată către produsul ceramic care necesită prelucrare. Energia poate proveni de la un fascicul de electroni, plasmă sau laseri. În cadrul acestor metode non-contact, sculele utilizate pentru prelucrare nu se uzează, iar prelucrarea este independentă de rezistivitatea electrică a materialelor prelucrate;
- *Prelucrări hibrid* – aceste tehnici utilizează o combinație de două sau mai multe dintre tehniciile enumerate mai sus pentru a prelucra ceramice. Exemplele cele mai relevante sunt tehniciile de abraziune cu descărcare electrică, gravarea acidă asistată de laser și prelucrările mecanice asistate de laser [239].

#### 2.4.4. Utilizarea argintului în microcompozite cu hidroxiapatită

Încorporarea unor cationi suplimentari în structura hidroxiapatitei induce efecte benefice post-implantare. Printre elementele chimice încorporate în hidroxiapatită se numără magneziul (Mg), fluorul (F) [240] sau argintul (Ag) [240-242]. Dacă magneziul sau fluorul se regăsesc în formele apatitice naturale, argintul (în formă solubilă sau ionică - încorporat în hidroxiapatită cu scopul dopării sau preparării de materiale compozite) este considerat un agent antibacterian promițător [241-244]. Argintul conferă hidroxiapatitei proprietăți antibacteriene care variază direct proporțional cu concentrația încorporată.

Recent, dezvoltarea intensă a nanotehnologiei a inspirat cercetătorii să încorporeze argintul în hidroxiapatită sub formă nanostructurată (în special nanoparticule) [241, 242, 245, 246]. Printre avantajele acestei alegeri se numără posibilitatea controlului atent al formei și dimensiunilor nanostructurilor, care influențează caracterul antibacterian al materialului obținut [247]. Cu toate acestea, soluția este privită cu retință deoarece efectul nanoparticulelor de argint asupra organismului uman și a mediului înconjurător nu este

clarificat pe deplin [248]. Încorporarea argintului în hidroxiapatită pentru obținerea unui efect antibacterian poate oferi rezultate satisfăcătoare și în cazul utilizării unor particule de argint de dimensiuni micrometrice. Mai mult, în cazul în care procesarea hidroxiapatitei cuprinde și tratamente termice efectuate la temperaturi ridicate, superioare temperaturii de topire a argintului, utilizarea nanoparticulelor își pierde scopul, datorită pierderii – cel puțin parțiale – a nanostructurii [246].

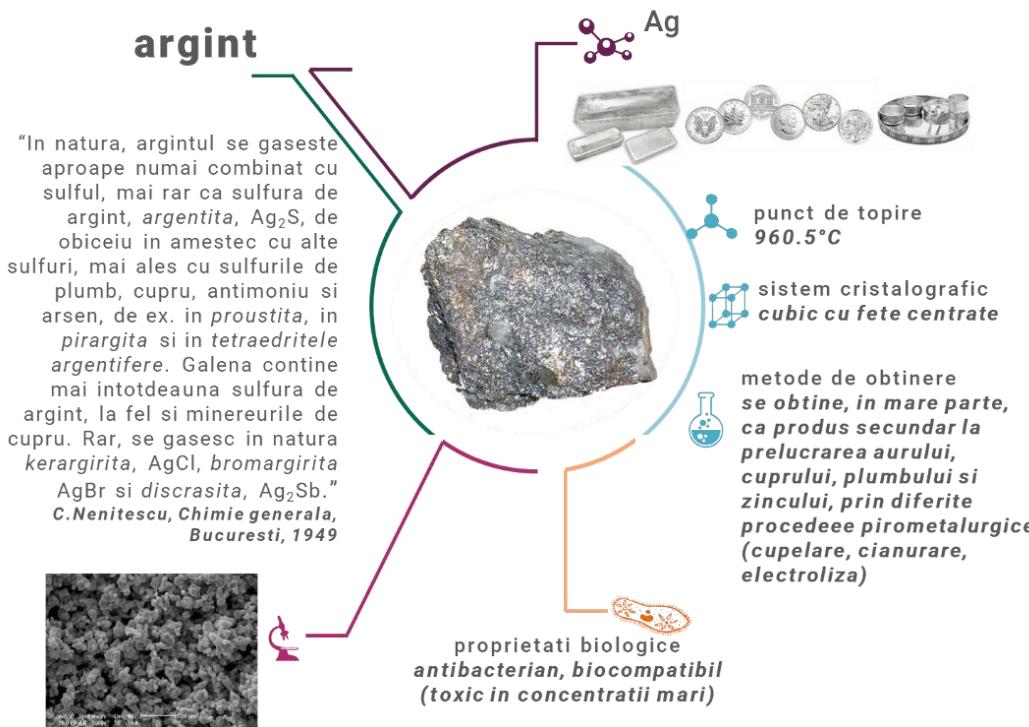


Figura 2. 14. Descriere generală a argintului

Dintre metodele de procesare termică la temperaturi ridicate, sinterizarea poate induce îmbunătățiri semnificative ale materialelor ceramice, dacă este asigurat un control atent al parametrilor de lucru [180]. Diferite programe de sinterizare pot fi aplicate materialelor obținute din procesarea țesutului osos bovin pentru îmbunătățirea proprietăților prin controlul microstructurii. În cazul fosfaților de calciu, sinterizarea urmărește densificarea microstructurii și limitarea difuziei la limita de grăunți [7]. În general, prin sinterizare se urmărește obținerea unor ceramice dense, însă programele pot fi aplicate și pentru obținerea produselor de tip scaffold dacă sunt utilizati agenți porogeni adecvați [196].

Succesul aplicării unui astfel de tratament necesită controlul atent al parametrilor specifici fiecărei etape din sinterizare (deoarece fiecare etapă de procesare poate induce defecte microstructurale care pot altera proprietățile materialului). În cele mai multe dintre cazuri, un program de sinterizare începe de la o masă de pulbere care este apoi consolidată într-un semifabricat. Sinterizarea implică efectuarea unui tratament termic la temperaturi înalte pentru densificarea semifabricatului și uniformizarea microstructurii acestuia.

Diferite substanțe sunt utilizate în sinterizare pentru a intensifica efectele favorabile ale tratamentului termic asupra materialelor ceramice. Adiția pulberilor cu temperatură de topire inferioară temperaturii de sinterizare este utilizată pentru a stabiliza structura materialului și a controla dimensiunea grăunților din timpul densificării [249, 250]. Diferite substanțe chimice au fost utilizate ca aditivi în sinterizarea hidroxiapatitei. Deseori acestea fac parte din clasa fluorurilor, fosfaților, carbonaților sau oxizilor, principala cerință impusă în sinterizarea biomaterialelor fiind ca densificarea microstructurii să aibă loc fără formarea unor faze nonbiocompatibile [249].

Dintre metodele de procesare termică la temperaturi ridicate, sinterizarea poate induce îmbunătățiri semnificative ale materialelor ceramice, dacă este asigurat un control atent al parametrilor de lucru [180]. Deși o serie de cercetări efectuate pentru evaluarea efectelor sinterizării asupra caracteristicilor hidroxiapatitei cu argint au fost publicate [251, 252], numeroase aspecte ale procesului necesită confirmări și clarificări suplimentare. De exemplu, rolul argintului în cadrul procesului de sinterizare și potențialul utilizării lui ca aditiv în sinterizare e a fost descris pentru materialele compozite bazate pe hidroxiapatită și concentrații ridicate de argint (5-30% Ag) [253, 254]. Ulterior s-a raportat că utilizarea unor astfel de compozite ca biomateriale nu este probabilă datorită îngrijorărilor cu privire la efectul toxic al concentrațiilor mari de argint asupra organismului uman [255].

#### **2.4.5. Utilizarea amidonului în amestecurile fosfaților de calciu**

Amidonul este un polimer natural, utilizat în numeroase aplicații medicale datorită costului redus, caracterului regenerabil și posibilității de degradare în numeroase medii, fără eliberarea unor compuși toxici. Amidonul este utilizat pentru capacitatele sale de îngroșare, gelificare, expandare, adeziune și formare de filme [256]. La baza acestor fenomene stau compoziția chimică a amidonului și modificările care apar în structura materialului la interacțiunea sa cu apa și odată cu creșterea temperaturii.

Amidonul este alcătuit din două macromolecule, amiloza (amorfă) și amilopectina (cristalină) (fig. 2.15). Organizarea lanțurilor macromoleculare de amiloză și amilopectină duce la formarea unor lamele amorse și cristaline dispuse alternativ sub forma unor „inele de creștere”. Unitățile funcționale caracteristice amidonului sunt numite “granule”. Amidonul reprezintă principala componentă a unor resurse naturale precum tuberculii de cartof și boabele de orez, grâu sau porumb [256-260]. Amidonul prezintă caracteristici diferite (morfologie, compoziție, interacțiuni între granule, capacitate de expandare și solubilitate) în funcție de sursa biologică din care este extras [261]. De exemplu, în amestecurile de amidon cu alcool polivinilic (PVA), amidonul cu compoziție mai bogată în amiloză și îmbunătățit alungirea, rezistența la tracție și rezistența la soc a unor filme polimerice [261, 262].

Consolidarea cu amidon este guvernată de îngroșarea și gelificarea sa în prezența apei la temperaturi cuprinse între 60-80°C, proces în urma căruia particulele ceramice se unesc și consolidează corpul solid [164, 256, 258, 263-268]. Inspirația pentru această metodă se găsește printre etapele procesării polimerilor bazați pe amidon, în cazul cărora adiția de apă scade temperatura de topire și maleabilizează materialele. Evaporarea apei duce la „spumare” ceea ce contribuie la formarea porilor.

Metoda a fost utilizată pentru prepararea ceramicelor poroase, ca alternativă la utilizarea burețiilor polimerici [269] sau agentilor de spumare [164, 264], pentru a evita dezavantaje precum apariția gradenților de densitate sau segregarea particulelor în timpul eliminării fazei lichide [263, 265]. În amestecurile cu particule ceramice, încălzirea amidonului în prezența apei (în intervalul de temperatură menționat anterior, până la 70°C) duce la mărire volumului granulelor de amidon. Concomitent, cantitatea de apă disponibilă în amestec se reduce, scăzând mobilitatea particulelor ceramice și consolidarea acestora într-un volum solid. Zonele cristaline ale amidonului se absorb la suprafața particulelor ceramice și acționează ca un liant, îmbunătățind rezistența mecanică a corpului consolidat [265]. Adiția de apă duce în final la formarea unui gel de amiloză care conține granule formate în mare parte din amilopectină.

Gelificarea depinde de cantitatea de apă disponibilă în vecinătatea granulelor de amidon: o cantitate redusă de apă nu asigură expandarea suficientă pentru formarea unui gel, în vreme ce excesul de apă poate duce la separarea cristalitelor de gel. Gelificarea amidonului

este accentuată de creșterea temperaturii (care duce la creșterea mobilității moleculelor și favorizarea distrugerii regiunilor cristaline) și de prezența forțelor de forfecare [256, 270].

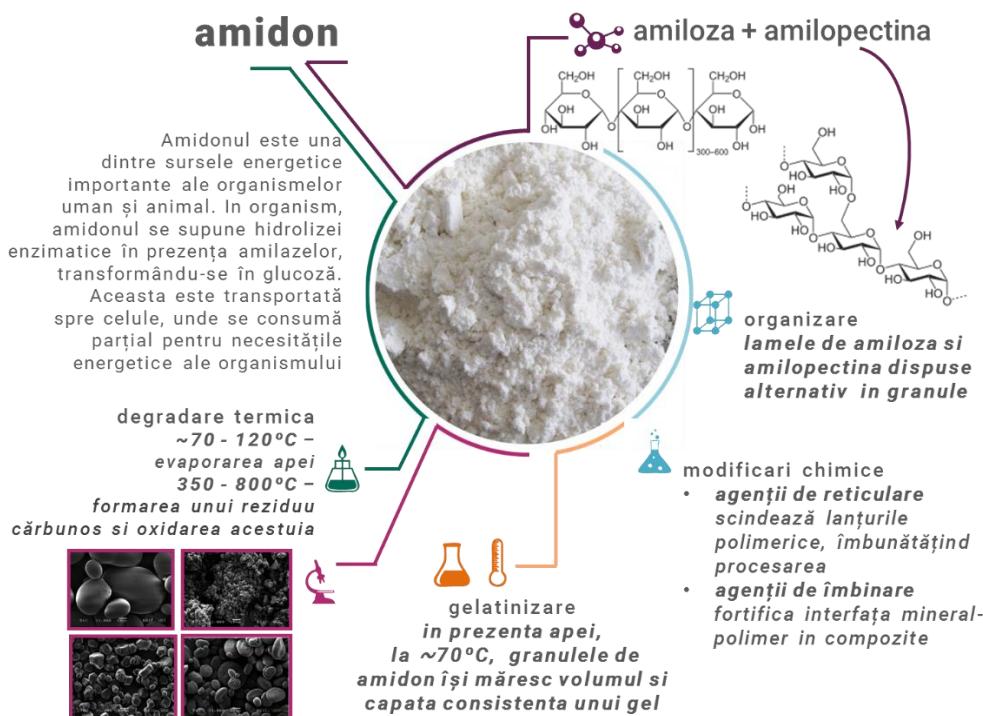


Figura 2. 15. Descriere generală a amidonului

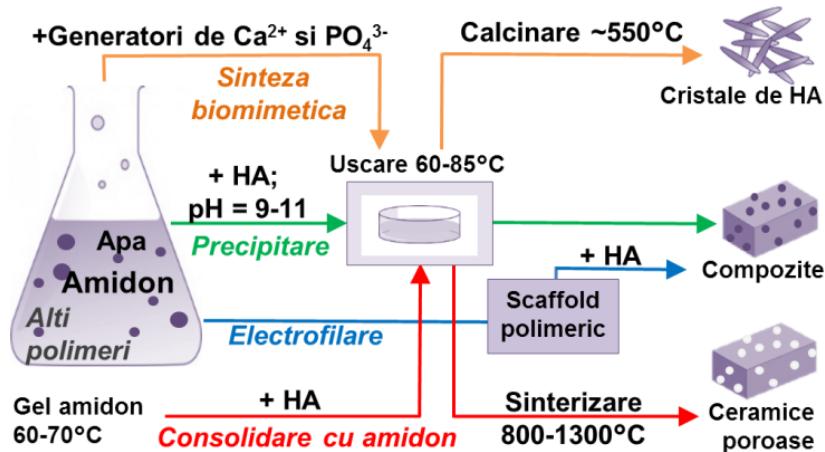
În ciuda avantajelor sale, utilizarea amidonului este îngreunată de unele limitări, precum dificultatea procesării, proprietățile mecanice slabe și sensibilitatea la apă (care duce la modificarea în timp a proprietăților). Succesul utilizării depinde de alegerea unor aditivi și/sau a unor reacții de modificare care să îi mențină stabilitatea. De asemenea, un mai bun control asupra proprietăților este asigurat prin combinarea amidonului cu alte materiale pentru obținerea de amestecuri cu alți polimeri precum acidul polilactic – PLA sau alcoolul polivinilic - PVA sau de materiale compozite (dintre care cele mai studiate sunt cele în care amidonul este combinat cu filosilicați, argile sau alte polizaharide) [256].

### a) Metode convenționale de preparare a amestecurilor HA-amidon

Amidonul și amestecurile sale au fost utilizate în amestecuri cu hidroxiapatită în principal pentru prepararea unor materiale compozite și mai puțin pentru prepararea unor materiale poroase. Principalele metode de preparare a componitelor din hidroxiapatită și amidon - *sinteza biomimetică a cristalelor de hidroxiapatită în geluri de amidon, electrofilarea unor corpuri poroase din amidon și impregnarea în soluții de hidroxiapatită*, precum și metodele clasice de obținere a hidroxiapatitei prin *precipitare și amestecarea cu amidon* – au fost descrise recent [271].

Omogenizarea precursorilor și încălzirea acestora pentru activarea gelificării este o metodă simplă și eficientă de preparare a amestecurilor de amidon și hidroxiapatită. Metoda a fost utilizată pentru prepararea unor materiale cu diferite aplicații medicale. Pentru prepararea unor cimenturi osoase, s-au amestecat fosfat de calciu amorf, fosfat dicalcic și amidon (0 – 0.2%wt) și a fost preparată o pastă prin adăugarea de apă distilată cu raportul lichid/solid = ½. În general, interacțiunea dintre fosfații de calciu amintiți și fazele apoase duce la formarea hidroxiapatitei ca produs final, însă transformarea nu este întotdeauna completă. Însă în cazul acestei metode, adiția de amidon a dus la eliminarea reziduurilor de fosfat dicalcic din structura cimentului, hidroxiapatita fiind singura fază cristalină identificată în analiza XRD a acestuia. Adiția de amidon a contribuit și la obținerea unei morfologii mai compacte datorită distribuirii

particulelor de amidon printre particulele ceramice, îmbunătățind totodată proprietățile mecanice ale cimentului prin reducerea porozității [272].



**Figura 2. 16.** Posibilități de preparare a materialelor destinate reconstrucției osoase utilizând hidroxiapatită și amidon [271]

O altă cercetare a vizat obținerea unui gel polimeric pe bază de amidon și gelatină și amestecarea acestuia cu hidroxiapatită. A fost raportată prepararea unor adezivi prin solubilizarea gelatinei și a amidonului în apă, la temperatura de aproximativ 60°C [273-275]. Soluția de amidon și gelatină a fost amestecată cu hidroxiapatită (0 – 0.3 %wt) până la omogenizare, iar suspensia obținută a fost uscată la 60°C timp de 48 de ore. Această metodă a permis obținerea unor materiale poroase, cu pori interconectați și dimensiuni ale porilor mai mici de 1 µm [273]. Pentru obținerea unor scaffold-uri compozite, s-au încorporat în gelul polimeric 20 – 50 %wt. hidroxiapatită, apoi amestecul a fost omogenizat și răcit. Pentru reticularea polimerilor, amestecul compozit a fost imersat în citrat trisodic, apoi materialele au fost uscate în vid cu ajutorul microundelor [274, 275].

Uscarea cu ajutorul microundelor a permis obținerea de materiale poroase, porii fiind formați datorită diferențelor de presiune dintre interiorul și exteriorul materialelor, diferențe datorate generării de abur. Dacă încălzirea are loc în vid, pe lângă formarea porilor are loc și uscarea rapidă a materialelor. Menținerea îndelungată a îmbunătățit proprietățile mecanice ale compozitului, iar energia termică degajată a contribuit la reticularea suplimentară a polimerilor [274, 276].

După uscare, diametrul probelor compozite a crescut cu aproximativ 40% (de la 3.5 la 5 cm). Dimensiunile probelor uscate nu au fost influențate de compoziția amestecului. Analiza morfologică a relevat distribuirea omogenă a particulelor ceramice în rețea polimerică pentru concentrații de hidroxiapatită mai mari de 20 %wt. [274, 275]. În compozitele obținute cu 20 %wt. hidroxiapatită au fost observate aglomerări de particule de hidroxiapatită de câțiva micrometri (particulele omogenizate în amestec aveau dimensiuni nanometrice). Porozitatea probelor a fost evaluată la 70-80 %, iar diametrul porilor a variat între 10 – 300 µm [275].

Efectul adiției de amidon asupra densității amestecurilor pentru sinterizare a fost studiat pentru aluminiu [263] prin compararea unor valori teoretice ale densității cu valorile determinate experimental. Studiul a arătat o bună corelație între parametrii calculați și cei măsurăți, însă doar pentru suspensii cu conținut redus de amidon. La concentrații ridicate de amidon, diferențele dintre valorile calculate și cele măsurate au sugerat că materialele pot suferi contracții în timpul uscării. Compoziția amestecurilor pentru sinterizare joacă așadar un rol important în asigurarea acurateței dimensionale a dispozitivelor medicale de tip scaffold.

Un alt studiu, dedicat parametrilor de dispersie ai suspensiilor de hidroxiapatită preparate cu amidon [277], a raportat că densitatea relativă a semifabricatului nu a fost influențată semnificativ de concentrația de amidon. Asta a sugerat că adiția de amidon nu îmbunătășește semnificativ gradul de împachetare al amestecului. Explicația pentru această concluzie se regăsește în diferențele dintre suprafața specifică a hidroxiapatitei ( $2 \text{ m}^2/\text{g}$ ), respectiv amidonului ( $0.333 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Baza teoretică pentru îmbunătățirea comportamentului la împachetare (modelul lui Furnas) [277, 278] sugerează înlocuirea unei cantități de particule fine din amestec cu aceeași cantitate de particule grosiere pentru obținerea unor rezultate favorabile [278-280].

Studiile de morfologie efectuate pe semifabricate obținute prin gelificarea amidonului solubil și amestecarea soluției cu hidroxiapatită au arătat că, atunci când metodele de preparare sunt bine controlate, este posibilă asigurarea unei distribuții omogene a amidonului în suspensiile de hidroxiapatită. Diferențe notabile au apărut la probe cu concentrații de amidon mai ridicate (40% wt.), care au prezentat fisuri și pori de dimensiuni mari. Defectele s-au dezvoltat după uscare, datorită contracției mai pronunțate a granulelor de amidon [277].

A fost observată o îmbunătățire a rezistenței la compresiune a semifabricatelor (odata cu creșterea concentrației de amidon), însă până la un conținut de 30% vol., rezistența la compresiune înregistrând o scădere bruscă în cazul semifabricatelor cu 40 % vol. amidon. Scăderea rezistenței la compresiune este atribuită contracției granulelor de amidon pe parcursul uscării semifabricatelor [277].

#### **b) Metode de fabricație aditivă a amestecurilor amidon-hidroxiapatită**

Până în prezent, metodele de fabricație aditivă au permis obținerea de corpuri printate tridimensional din amestecuri de amidon/dextran/gelatină [281], amidon/celuloză [282] și amidon/hidroxiapatită [283]. În cazul amestecurilor pe bază de amidon și polimeri, atât printarea tridimensională (amidon/dextran/gelatină), cât și sinterizarea selectivă cu laser (amidon/celuloză), au putut fi utilizate pentru obținerea de scaffold-uri cu geometrie controlată, pori interconectați și proprietăți mecanice adecvate pentru reconstrucția osoasă. În aceste cazuri, succesul utilizării tehniciilor de fabricație aditivă depinde de ajustarea parametrilor de procesare și de caracteristicile materialelor precursoroare - pulberi, lianți sau paste [281, 282].

Pentru printarea tridimensională a compositelor amidon/hidroxiapatită a fost propusă o metodă în care precursorii componenților au fost sulfatul de calciu și amidonul. În prima etapă au fost amestecate 85 %wt. sulfat de calciu și 15 %wt. amidon gelatinizat. Amestecul a fost printat tridimensional în forme cilindrice, utilizând un liant pe bază de apă, iar hidroxiapatita a fost obținută după printare imersând corpurile printate într-o soluție de fosfat acid de sodiu la  $80^\circ\text{C}$ , timp de 48 h. Metoda a permis obținerea unor corpuri poroase, cu o porozitate de 64% și dimensiuni ale porilor de  $0,15 \mu\text{m}$ . Analiza XRD a materialelor obținute a arătat că acestea conțin o singură fază cristalină, corespunzătoare hidroxiapatitei, iar analiza TEM a arătat că aceasta este dispusă în material sub formă de cristale cu formă de tijă nanometrică. Materialele au fost testate ulterior ca sisteme de transport al antibioticelor [283].

#### **c) Materiale și aditivi utilizați în amestecurile amidon-hidroxiapatită**

*Gelatina* - este o formă denaturată de colagen (cea mai abundentă proteină din organismul uman), obținută din hidroliza controlată a colagenului extras din țesuturi animale. Proprietățile materialului depind de originea colagenului utilizat ca materie primă și de metoda de conversie aleasă. În formă reticulată, gelatina este adecvată pentru aplicațiile specifice reconstrucțiilor osoase deoarece conține mai multe grupări funcționale întâlnite și în mediul biologic (ex. aminoacizi). Datorită biocompatibilității și biodegradabilității sale, gelatina a fost testată ca pansament intern și substanță de umplere a defectelor osoase [272, 274, 275, 284-287].

*Chitosanul* – este un polimer biocompatibil care poate fi degradat de enzimele din organismul uman fără generarea unor produși toxici. Chitosanul este o formă parțial deacetilată a chitinei, un polimer natural care se găsește în carapacea crustaceelor, în exoscheletul unor insecte, în diatomee, în protozoare și în peretele celular al unor specii de fungi [287]. Datorită potențialului antimicrobian pronunțat, chitosanul a fost testat pentru aplicații medicale de substituție a țesutului osos, nervos, retinal și a vaselor de sânge, precum și ca sistem transportor de medicamente [288-292].

*Fibroinul de mătase* – este un polimer natural derivat din mătase, cunoscuta fibră produsă de viermii de mătase. Fibroinul de mătase este caracterizat de proprietăți mecanice adecvate pentru aplicațiile medicale, o bună hemocompatibilitate, un caracter non-toxic și o bioactivitate asemănătoare pielii umane. Până în prezent, fibroinul de mătase a fost utilizat pentru suturi, biosenzori, nanofibre și în produsele de reconstrucție osoasă [293, 294].

*Amestecuri ale amidonului cu alți polimeri* – amidonul este deseori combinat cu alți polimeri, în special biodegradabili, precum acidul polilactic (PLA), policaprolactona (PCL), sau alcoolul polivinilic (PVA), pentru îmbunătățirea rezistenței la umezeală, a proprietăților mecanice și a stabilității pe termen lung. O serie de studii prezintă în detaliu amestecurile amidonului cu acești polimeri [256, 295-300]. și amestecurile de tip amidon-gelatină au fost testate datorită potențialului de utilizare ca transportori de gaz ( $O_2$ ,  $CO_2$ ). Studiile FT-IR ale unor astfel de amestecuri au arătat că ambele materiale contribuie la formarea vârfurilor caracteristice, confirmând posibilitatea de omogenizare a celor doi polimeri [301].

*Agenții de reticulare* scindează lanțurile polimerice, îmbunătățind și ușurând totodată procesarea componentelor polimerice. Divinilsulfona s-a dovedit a fi un agent de reticulare eficient în hibrizi organic-inorganic pe bază de amidon și hidroxiapatită. După încorporare atât rezistența la tracțiune cât și modulul de elasticitate al materialelor au fost îmbunătățite fără a afecta proprietățile gelurilor semifabricate sau bioactivitatea compozitelor [302, 303].

*Agenții de îmbinare* pot acționa și ca agenți de reticulare, dar rolul lor principal este de fortificare a interfeței dintre componenta minerală și cea polimerică. Pentru compozitele hidroxiapatită/SEVA-C (un amestec al amidonului), substanțe precum zirconiați, titanați sau silan au fost testate ca agenți de îmbinare. Succesul îmbunătățirii interfeței dintre faze depinde de natura chimică, pH-ul și centrul metalic al aditivului utilizat [304].

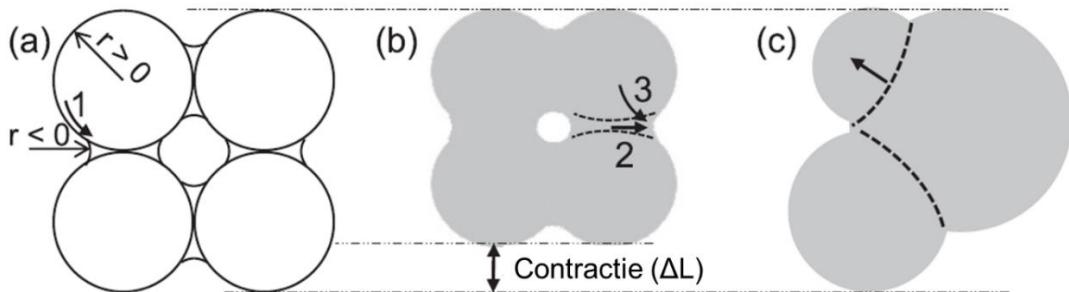
#### 2.4.6. Sinterizarea fosfaților de calciu

Procesarea convențională a materialelor ceramice implică trei etape principale: sinteza pulberilor ceramice, formarea amestecurilor și sinterizarea acestora. Ultima etapă are rolul de a asigura dezvoltarea legăturilor dintre particulele de pulbere în contact și se desfășoară prin încălzirea unei pulberi ceramice în stare liber vărsată sau compactată, la o temperatură mai mică decât temperatura de topire a componentului de bază [305]. Sinterizarea duce la obținerea unui corp solid prin eliminarea porilor din amestecul de sinterizare, în timpul tratamentului termic având loc consolidarea și densificarea semifabricatului format anterior. De asemenea, în timpul sinterizării se pot modifica semnificativ dimensiunea și forma particulelor, se pot desfășura reacții care să modifice compoziția chimică sau fazică a produsului sinterizat [7].

Sinterizarea unei pulberi compactate este împărțită în general în trei etape: *în etapa inițială*, de consolidare a pulberii compactate prin difuziune superficială, la temperaturi de ~400°C, începe reducerea suprafeței pulberilor compactate de hidroxiapatită. Particulele se unesc prin legături chimice puternice, care rezultă în apariția și creșterea unor punți de legătură. Modelul particulelor sferice este utilizat pentru a descrie organizarea inițială a particulelor în pulberea compactată și modificările care au loc la scară microscopică în această etapă. (fig. 2.17). Această etapă decurge fără densificare până la 700 – 800°C.

Difuzia superficială este influențată semnificativ de raportul Ca/P al hidroxiapatitei. În cazul apatitelor cu raport Ca/P mai mic decât cel stoechiometric (i.e. 1.667) difuzia superficială la temperaturi joase este semnificativă și duce la coalescența porilor înaintea începerii densificării. Numărul de grăunți scade, iar dimensiunea acestora crește prin alunecarea limitelor de grăunte (fig. 2.18). Fenomenul este influențat de concentrația de Ca și de vacanțele grupărilor hidroxil din rețeaua cristalină care facilitează deplasarea materiei [7].

*În etapa intermediară*, la temperaturi de ~750°C, energia termică furnizată comprimatului duce la activarea difuziei în volum sau difuziei la limita de grăunte. La începerea densificării, punțile de legătură încep să crească, se formează limitele de grăunte, volumul total al porilor scade și proba se contractă. Această etapă corespunde cu o mare parte din procesul de sinterizare și se încheie atunci când porii încep să se izoleze. Etapa este caracterizată de două temperaturi care pot fi deduse din grafice derivate din curbe de din analiză termomecanică:  $T_B$  = temperatura la care începe contracția și  $T_M$  = temperatura la care viteza de sinterizare este maximă. Principalele valori ale  $T_B$  și  $T_M$  pentru hidroxiapatita stoechiometrică sunt ~750°C și respectiv ~1050°C [7].



**Figura 2. 17.** Reprezentare schematică a etapelor sinterizării. (a) Modelul sferelor adiacente: consolidare prin difuzie superficială (1) și formarea punților de legătură între particule. (b) Modelul sferelor secante: consolidarea și densificarea prin difuzie în volum (2) sau la limita de grăunte (3). (c) Coalescență și creșterea mărimii grăunților prin alunecarea limitelor de grăunte [7]

*În etapa finală*, porii izolați pot dispărea complet, ducând la formarea unui bloc ceramic dens sau aproape dens. Însă metodele de fabricare ale scaffold-urilor ceramice trebuie să permită construirea geometriilor tridimensionale complexe și a unei structuri poroase adecvate concomitent cu menținerea biocompatibilității materialului.

Metodele de preparare, procesare și consolidare pentru obținerea structurilor poroase au fost prezentate în studii dedicate [168, 196, 306]. Numeroase metode de obținere a porilor se bazează pe utilizarea unor agenți de generare a porilor, denumiți agenți porigeni. Înglobarea acestor agenți în material și eliminarea lor printr-o metodă adecvată permite obținerea porilor în zonele din material în care erau inițial localizați agenții porigeni. Frecvent, eliminarea agenților porigeni are loc prin încălzire sau prin dizolvare [168]. Agenții porigeni polimerici, precum naftalina, amidonul, polimetilmecatrilatul sau celuloza sunt îndepărtați prin încălzire, în vreme ce zaharurile și sărurile sunt eliminate prin dizolvare.

În cazul adiției de amidon, procesele implicate în obținerea structurilor poroase folosesc fie faze exclusiv solide (așa cum este cazul în presare sau extrudare), fie înglobează și faze lichide (metode umede de procesare). Metodele umede de procesare sunt aplicabile pentru obținerea cimenturilor (amestecuri ceramică – fază lichidă capabilă să solidifice *in situ*) și suspensiilor. Cele din urmă implică dispersia materialului ceramic în fază lichidă, formarea și uscarea pentru obținerea unui semifabricat poros și se încheie cu un tratament termic la temperaturi ridicate care are rolul de a îmbunătăți rezistența mecanică a structurii poroase obținute [180].

Metodele de înglobare a amidonului ca agent porogen au fost descrise pentru aluminiu [258, 263, 268, 307, 308], hidroxiapatită [216, 265, 267, 269],  $\beta$ -fosfat tricalcic [309],  $\alpha$ -fosfat tricalcic [310, 311] sau combinații ale acestora [164, 312]. Utilizarea amidonului ca agent porogen, singur sau în combinație cu alți aditivi, poate defini o structură poroasă fără a-i afecta biocompatibilitatea, deoarece amidonul este biodegradabil și termodegradabil. Fenomenul care asigură formarea porilor, degradarea termică a amidonului, începe cu evaporarea apei neînglobate în structură (eng. *free water*), urmată de eliberarea apei înglobate în structură și pierderea maleabilității materialului. Evaporarea apei se încheie în jurul temperaturii de 120°C, iar degradarea termică a amidonului continuă cu formarea unui reziduu cărbunos în intervalul 350 - 800°C, după care reziduul se oxidează.

Dimensiunea și forma particulelor de precursorsi intervin în optimizarea procesului de obținere a corpuri poroase [164, 277]. În cazul hidroxiapatitei, numeroase studii au urmărit obținerea și caracterizarea particulelor de hidroxiapatită de diferite forme și dimensiuni (mergând până la particule de ordinul nanometrului) [181, 182, 193, 313, 314], iar în cazul amidonului, numeroasele tipuri de surse de extracție asigură o variabilitate semnificativă a dimensiunilor de particulă, morfologiei și proprietăților fizico-chimice ale amidonului. Particulele de amidon sunt clasificate după dimensiuni în: (i) particule de dimensiuni mari (peste 25 $\mu$ m), medii (10-25 $\mu$ m), mici (5-10 $\mu$ m) și foarte mici (sub 5 $\mu$ m) [257], iar distribuția dimensiunii particulelor este de obicei bimodală (particule de dimensiuni mici și mari). Forma particulelor poate fi ovală, alungită, poligonată, sferică, neregulată sau lenticulară [259, 315].

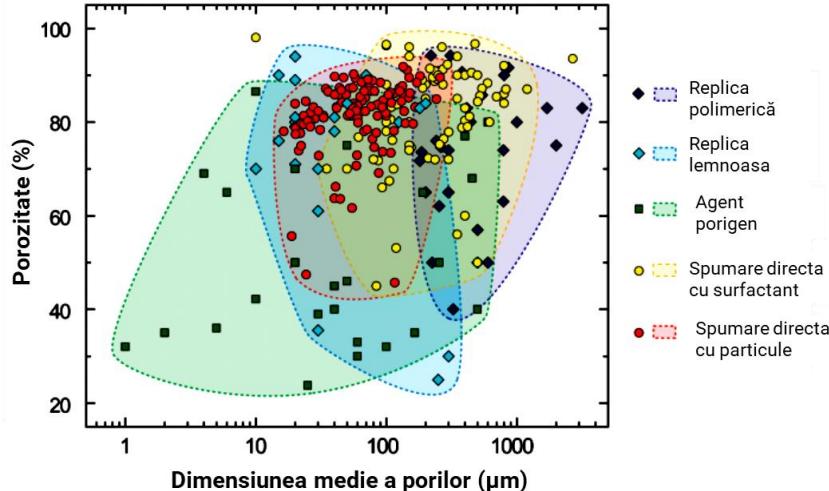
În 2005, un studiu a evaluat porozitatea produselor obținute după adiția în hidroxiapatită a două tipuri de amidon: solubil și insolubil în apă [316]. Amidonul solubil a dus la formarea de pori de dimensiuni mici, fără interconectare, în vreme ce amidonul insolubil a contribuit la formarea de pori de dimensiuni mai mari (zeci până la sute de micrometri) și interconectați. Diferențele sunt explicate de mecanismul de formare a porilor, diferit pentru fiecare tip de amidon: cel solubil formează un gel care acoperă particulele de hidroxiapatită și consolidează structura acesteia (dar poate închide porii în timpul sinterizării), în vreme ce amidonul insolubil suferă aglomerări în prezența apei, contribuind la formarea unei rețele de pori interconectați [316]. Interconectivitatea datorată aglomerărilor de particule de amidon insolubil se manifestă localizat și este dificil de controlat. Perfectionarea metodelor de preparare permite astăzi obținerea de pori interconectați și în cazul utilizării amidonului solubil.

Principalii indicatori cantitativi utilizati în evaluarea morfologiei structurilor poroase obținute după sinterizare sunt dimensiunea medie a porilor [216, 312], porozitatea [157, 162, 216, 269, 310-312] și gradul de interconectare al porilor [164, 216]. Diferitele metode de utilizare a amidonului pentru obținerea hidroxiapatitei poroase au dus la porozități cuprinse între 0.47% [157] și 80% [162]. Metodele asigură formarea de pori interconectați [157, 164, 265, 269], cu o formă rotunjită [157, 164]. Distribuția dimensiunii porilor a depins de dimensiunea particulelor de porogen utilizate și de contracția asociată sinterizării [81, 216, 312]. O distribuție bimodală a dimensiunii particulelor de agent porogen poate asigura simultan micro- și macroporozitatea corpuriilor sinterizate, iar agenții porogeni cu particule de dimensiuni reduse pot contribui, pe lângă microporozitate, și la dezvoltarea conexiunilor dintre pori [81].

Porozitatea structurilor obținute după sinterizarea amestecurilor de hidroxiapatită și amidon a depins direct proporțional de concentrația/fracția volumică de amidon încorporată în amestec [157, 216, 265, 269, 312], însă rezultatele sunt influențate de metoda de preparare aleasă. Porozitatea obținută în cazul amestecurilor obținute prin presare [157, 216, 312] este mai redusă comparativ cu cea a amestecurilor turnate [164, 269].

Caracteristicile morfologice ale produselor obținute variază direct proporțional și cu temperatura de sinterizare [157, 162, 164]. Pentru materialele bazate pe hidroxiapatită, aceasta variază între 800 - 1300°C. Pentru probe de hidroxiapatită cu 30% amidon și fără alți aditivi,

sinterizarea la 1350°C (după presarea amestecului) a dus la obținerea unei porozități similare cu sinterizarea la 1300°C. Diferențele reduse dintre probe și aspectele economice ale procesării permit așadar scăderea temperaturii maxime de sinterizare la 1250-1300°C [157]. Durata sinterizării (evaluată între 1-5 ore) nu a influențat porozitatea hidroxiapatitei (fabricată sub formă de tablete) [162]. Prezența de agenți porogeni suplimentari și a aditivilor eficientizează formarea porilor [162, 164, 265, 269, 312] și asigură o distribuție variată a dimensiunii acestora [269]. De exemplu, dacă pentru o concentrație de 20%wt. amidon în amestec și formarea acestuia prin presare, după sinterizare la 1250°C, se obține o porozitate a hidroxiapatitei de 15,7% [216], un proces similar de pregătire, dar care implică și adiția a 2 %wt. stearat de magneziu crește porozitatea până la 26% [162]. Înglobarea unor aditivi (a agenților de spumare [164, 269], care reduc tensiunea superficială a apei îmbunătățind umectarea particulelor ceramice, și a lubrifiantilor [162]) este recomandată și pentru asigurarea interconectivității porilor.



**Figura 2. 18.** Porozitatea și dimensiunea tipică a porilor obținuți prin metode convenționale de fabricare a produselor ceramice poroase [196]

Aspectul morfologic al probelor de hidroxiapatită - amidon după sinterizare definește premise optimiste pentru utilizarea amidonului ca agent porogen în hidroxiapatită, însă controlul atent al fiecarei etape de preparare este necesar pentru evitarea unor riscuri precum:

- *Modificări dimensionale ale corpurilor sinterizate*, datorate contracției pe parcursul încălzirii. Contracția este dependentă de gradul de încărcare al amestecului și de obicei se încearcă evitarea ei prin utilizarea de suspensii cu fracții volumice mari de particule solide [164]. Concentrația de amidon din amestec nu influențează semnificativ caracteristicile semifabricatelor din hidroxiapatită [277], deci temperatura de sinterizare rămâne principalul factor cu influență asupra contracției structurilor.
- *Apariția defectelor macroscopice în corpurile sinterizate*. Tratamentele termice efectuate pe parcursul preparării de probe cu concentrații de 20-50% amidon și hidroxiapatită (sinterizate la 800-1250°C) au dus la obținerea unor materiale ceramice cu suprafete cu textură cavitară. Cauza acestui fenomen este încorporarea neuniformă care a dus la formarea aglomerărilor de agent porogen. Soluțiile propuse pentru evitarea apariției unor astfel de defecte sunt optimizarea formei și dimensiunilor particulelor de materiale utilizate, selecția adecvată a calității aditivilor și utilizarea unei metode adecvate de amestecare [162].
- *Apariția microfisurilor*. Microfisuri în formă de scoică au fost observate în jurul porilor mari din probe de hidroxiapatită și amidon după sinterizarea la 1100°C. Fenomenul se manifestă datorită creșterii volumul granulelor de amidon din timpul gelifierii, care presează particulele ceramice din vecinătate, creând zone mai compacte decât în restul

matricei. În timpul uscării, granulele de amidon se contractă mai mult decât matricea ceramică și pot detașa stratul compactat de restul matricei ducând la apariția unor microfisuri. O astfel de observație atrage atenția asupra influenței dimensiunii particulelor și granulelor de amidon asupra morfologiei structurilor poroase [269].

Relația dintre porozitate și rezistență mecanică a materialelor poroase este intuitivă: cu cât un material este mai poros (deci înglobează o cantitate mai mare de aer în volumul său) cu atât rezistența sa mecanică va fi mai scăzută. Adiția de amidon ca agent pogen are în acest caz o influență indirectă, dar semnificativă, asupra proprietăților mecanice ale corpurilor sinterizate.

Proprietățile mecanice evaluate după sinterizarea amestecurilor de hidroxiapatită cu amidon au fost: rezistența la compresiune [162, 164], rezistența la rupere [269, 316] și rezistența la încovoiere [265, 269]. Astfel, după sinterizarea la 1250°C, rezistența la compresiune a hidroxiapatitei cu 67% porozitate a fost de aproximativ 30 MPa [164]. Comportamentul la compresiune a fost evaluat în cazul tabletelor obținute din sinterizarea hidroxiapatitei cu amidon ca fragilitate. S-a observat o creștere a fragilității tabletelor - de la 0,2% până la 0,7% - odată cu creșterea concentrației de amidon din amestec de la 20 % wt. la 37,5 % wt. Creșterea concentrației de amidon la 50 % wt. a dus însă la scăderea fragilității până la 0,5%. Fragilitatea tabletelor poroase a crescut odată cu creșterea temperaturii de sinterizare [162].

- Rezistența la rupere a fost evaluată la 0,21 MPa pentru hidroxiapatita cu aproximativ 70% porozitate după sinterizarea la 1100°C [265, 269]. Deși a fost observată o dependență exponențială a rezistenței la rupere față de porozitate, cu o incidență crescută a ruperii intergranulare odată cu creșterea porozității (ca urmare a slăbirii limitelor de grăunte), o corelație semnificativă statistic între proprietățile mecanice ale hidroxiapatitei și porozitatea acesteia este încă dificil de stabilit datorită incertitudinilor induse de alți factori de influență (interacțiunile dintre fisurile din corpul sinterizat, grăunții de hidroxiapatită și pori) [269].
- Într-un alt studiu, solicitarea la rupere a materialelor obținute după sinterizare la 1200°C s-a modificat în funcție de tipul de amidon utilizat în preparare: pentru o concentrație de 30 % vol. amidon, solicitarea la rupere a atins 86,7 N pentru amidon solubil în apă versus 51,2 N pentru amidon insolubil. Diferența dintre aceste valori este atribuită diferențelor de porozitate obținută pentru cele două tipuri de agent pogen [316].
- Rezistența la încovoiere variază între 10-21 MPa pentru materialele cu aproximativ 45% porozitate și 2-5 MPa pentru aproximativ 70% porozitate. Rezistența la încovoiere (similar celorlalte proprietăți mecanice măsurate) este însă dificil de evaluat datorită diferențelor de porozitate, dimensiunii porilor și/sau interconectării [265, 269].

Fabricarea scaffold-urilor cu concentrații mari de amidon nu este posibilă datorită proprietăților mecanice slabe. Pentru concentrații de 80 – 90 % wt. în amestecurile destinate fabricării scaffold-urilor testarea mecanică nu a fost posibilă deoarece materialele și-au pierdut stabilitatea mecanică imediat după fabricare [261].

Puține studii au analizat structura amestecurilor hidroxiapatită-amidon după sinterizare. Analiza XRD a materialelor rezultate după sinterizarea la 1100°C [317, 318], 1200°C [316] și 1250°C [162] a indicat doar maxime de difracție caracteristice hidroxiapatitei, al căror aspect atestă faptul că aceasta nu reacționează cu amidonul în timpul procesării [316]. După sinterizarea la temperaturi înalte nu au fost identificate urme de agent pogen în structura hidroxiapatitei [162]. În funcție de tipul de hidroxiapatită utilizat pentru obținerea materialelor, prelucrarea termică la temperaturi ridicate influențează gradul de cristalinitate și dimensiunea cristalelor de hidroxiapatită, indicate de maxime de difracție mai ascuțite, respectiv mai intense în analiza XRD.

## 2.5. Metode de testare a biocompatibilității fosfaților de calciu

Dicționarul de Biomateriale compilat de D.F. Williams [319] furnizează trei definiții ale termenului „biocompatibilitate”. Prima definiție, preferată în domeniul științei biomaterialelor, stabilită în prima conferință Consensus organizată de Societatea Europeană de Biomateriale [9], este „*capacitatea unui material de a produce un efect biologic dorit într-o aplicație dată*”. Cea de-a doua definiție a fost furnizată de dictionarele Dorland Medical: „*calitatea de a nu avea efecte toxice sau dăunătoare sistemelor biologice*”. Dicționarul de Biomateriale include o notă în care se menționează că definiția este tipică pentru încercările de a lega noțiunea de biocompatibilitate de absența efectelor nocive, însă fără a face referire la componenta pozitivă a interacțiunilor dintre biomateriale și țesuturile-gazdă. Cea de-a treia definiție, furnizată de ASTM, este „*comparație între reacția unui țesut produs prin asociere strânsă între un material de implant candidat și locul în care are loc implantarea în animalul gazdă cu răspunsul țesutului recunoscut și stabilătă ca adevărat la materialele de control*”. Și această definiție este însoțită de o notă care nu o recomandă deoarece se referă numai la dispozitive implantate și răspunsul local al țesutului.

Evaluarea biologică a unui material sau dispozitiv medical cuprinde elaborarea unui program care să poată fi înglobat într-un protocol de management al riscului. Programul de evaluare biologică poate presupune atât efectuarea unui studiu amănunțit asupra experiențelor clinice și non-clinice existente și relevante, cât și desfășurarea unor teste propriu-zise [320].

### 2.5.1. Testarea non-clinică

Obiectivele generale ale studiilor non-clinice sunt: identificarea pericoletelor asociate dispozitivului testat, evaluarea riscurilor și crearea unei platforme de lucru pentru implementarea unui sistem de management al riscului [321], identificarea unor posibile organe-țintă pentru toxicitate, precum și a unor parametri de siguranță pentru testarea clinică [322].

Testele non-clinice cuprind trei componente majore: modelul biologic, reprezentat de sistemul utilizat pentru analiză (cultură de celule în cazul testelor *in vitro* sau animal în cazul testelor *in vivo*), momentul de măsurare (un etalon utilizat pentru monitorizare, specificat în standardele sau normele specifice) și protocolul testului (un calendar al evenimentelor care definesc testul respectiv)[323].

Proiectarea unui studiu non-clinic se referă, în special, la alegerea modelului biologic, la numărul de teste efectuate, la selecția și concentrația dozelor care urmează să fie testate, precum și la metodele statistice care vor fi utilizate [321]. Testele trebuie alese în funcție de obiectivele cercetării și sunt detaliate în standarde internaționale (cele mai cunoscute sunt cele din seria de standarde ISO 10993). Testele *in vitro* - efectuate conform unor proceduri de lucru validate - sunt preferate celor *in vivo* atunci când acestea sunt disponibile și reproductibile. Standardul ISO 10993-2 menționează că testarea *in vivo* pe model animal trebuie efectuată numai după desfășurarea testelor *in vitro* disponibile și nu este necesară dacă rezultatele anterioare sunt concluziente [324].

Rezultatele studiilor non-clinice sunt utilizate în evaluarea potențialelor efecte toxice ale dispozitivului testat [321]. În funcție de testele *in vitro* efectuate, rezultatele evaluării pot oferi informații cu privire la citotoxicitatea unui material sau dispozitiv, la potențialul său iritant, la genotoxicitate, hemocompatibilitate sau biodegradare [320] în timp ce rezultatele testelor *in vivo* evaluatează carcinogenitatea [325], sensibilizarea și toxicitatea acută, subacută și subcronica a materialului sau dispozitivului testat. De asemenea, testarea *in vivo* poate fi necesară și în cazul studiului biodegradării sau a unor studii de hemocompatibilitate specifice [320].

O condiție esențială impusă de testele non-clinice *in vivo* este respectarea principiilor etice ale testării pe animale. Testarea pe animale este reglementată de standardul internațional

ISO 10993-2. Pe lângă acesta, numeroase documente informative, reglementări și ghiduri de implementare au fost elaborate de către organizațiile internaționale.

Documentul care stipulează principiile etice ale cercetării biomedicală efectuate pe animale a fost elaborat în 2012 de către Council for International Organization of Medical Sciences în parteneriat cu The International Council for Laboratory Animal Science. Ediția revizuită în 2012 descrie în zece prevederi obligațiile și responsabilitățile instituțiilor și persoanelor implicate în cercetare în ceea ce privește respectul pentru animale, evitarea efectuării testelor nejustificate, supravegherea animalelor de către veterinari sau cercetători cu experiență în utilizarea speciilor alese, reducerea disconfortului sau a durerii suferite de animale în timpul experimentelor și implicarea în cercetare a personalului competent și calificat pentru procedurile efectuate. Ghidul recomandă implementarea unui sistem de verificare a cercetării efectuate pe animale în fiecare țară, care să includă proceduri de autorizare a instituțiilor, cercetătorilor și proiectelor de cercetare, în vederea unei mai bune implementări a principiilor [326].

Pentru evaluarea comportamentului fosfaților de calciu bifazici de tip HA/TCP, numeroase formulări au fost testate fie pe culturi celulare [327, 328], fie pe model animal (șoarece[329], iepure [330], câine [331] sau miniporc[332]). Dacă în cazul evaluării solubilității, rezultatele au ajuns la o concluzie comună, confirmând solubilitatea superioară a beta-fosfatului tricalcic în raport cu hidroxiapatita [328, 333], evaluarea proliferării celulare, a resorbției osteoclastice sau a cantității de țesut osos format după implantare prezintă rezultate diferite în raport cu compozitia fazică a fosfaților de calciu bifazici.

Rezultate foarte bune după implantare au fost obținute în cazul compușilor de tip HA/TCP (20/80)[329, 332], al căror comportament a fost evaluat ca fiind similar autogrefelor. Însă rezultatele sunt similare și pentru produsele de tip HA/TCP(25/75), care au demonstrat o bună resorbție osteoclastică [328] și proliferare celulară, dar ale căror proprietăți mecanice nu corespund cerințelor impuse de substituția osoasă [327]. Un alt studiu recomandă compușii bifazici de tip HA/TCP (50/50) ca având comportamentul biologic optim [334]. Rezultatele variază datorită diferențelor de preparare și în mod special datorită diferențelor de evaluare: diferite tipuri de teste sunt alese pentru evaluarea răspunsului biologic, iar compararea rezultatelor obținute este dificilă datorită numărului mic de teste efectuate în condiții de reproductibilitate.

Două alternative se disting dintre formulările propuse pentru testare: HA/TCP (70/30) a fost evaluat ca având proprietăți biologice superioare în comparație cu o gamă largă de compuși bifazici [333, 335, 336]. Îmbunătățirea acestor compuși poate duce la înlocuirea compușilor de tip HA/TCP (60/40) care au fost utilizati în aplicații clinice ca „soluție de compromis între solubilitate și proprietăți mecanice”[337]. Testarea biocompatibilității necesită însă efectuarea mai multor experimente, în unele cazuri compușii bifazici generând și răspunsuri inflamatorii [104, 338-340].

Ca și în cazul analizelor structurale, proprietățile biologice ale materialelor ceramice obținute prin sinterizarea amestecurilor de hidroxiapatită și amidon nu au fost studiate suficient [216, 269]. Având însă în vedere că amidonul este complet eliminat după sinterizare, proprietățile biologice ale produselor poroase se pot apropia sau coincide cu cele ale hidroxiapatitei. Dacă lipsa produșilor toxică rezultați din degradare este confirmată, obținerea produselor poroase cu ajutorul amidonului devine mai avantajoasă față de alte metode de inducere a porozității, care utilizează porogeni cu potențial toxic, precum polimetilmecacrilatul [196, 263, 267, 279, 316].

Evaluarea *in vitro* a scaffold-urilor sinterizate a arătat că după îndepărtarea amidonului, hidroxiapatita promovează creșterea celulelor osoase având caracter non-toxic [216, 317, 318]. Performanța materialului este influențată de porozitate: pentru dimensiuni ale porilor de

aproximativ  $13\mu\text{m}$  proliferarea celulară s-a manifestat doar la suprafața hidroxiapatitei, pătrunderea celulelor osoase în interiorul scaffold-ului nefiind posibilă [216].

Testarea probelor din hidroxiapatită înainte și după imersia în fluid biologic simulat a arătat de degradarea ceramici se manifestă prin dizolvarea fizico-chimică a grăunților, ceea ce duce la scăderea coeziunii integranulare în zonele cu pori. Degradarea poate continua cu desprinderea grăunților din jurul porilor, deci la îndepărarea unor fragmente de material din implant și coincide cu scăderea proprietăților mecanice ale materialului [269].

### 2.5.2. Testarea clinică

Testarea clinică a dispozitivelor medicale are loc anterior introducerii acestora pe piață sau în programele de sănătate publică și presupune efectuarea unor investigații pentru evaluarea securității și eficacității prin intermediul unor parametri bine stabiliți [341]. Descrierea acesteia face referire la trei componente principale: unitatea experimentală, adică grupul de subiecți din populație care participă la studiu, tratamentul, care poate fi reprezentat de placebo sau orice combinație cu o nouă identitate farmaceutică, de o procedură chirurgicală, un dispozitiv medical, un program de educație în domeniul sănătății și, în final, evaluarea rezultatelor studiului [342]. De asemenea, testarea clinică presupune documentarea completă asupra indicațiilor terapeutice, metodelor de administrare și dozelor recomandate, contraindicațiilor, atenționărilor, interacțiunilor, măsurilor de siguranță și efectelor asupra populației-țintă.

Organizația Mondială a Sănătății recomandă respectarea următoarelor etape de desfășurare a unui studiu clinic: (1) Elaborarea protocolului de testare; (2) Elaborarea procedurilor standard de operare; (3) Dezvoltarea sistemelor-suport; (4) Elaborarea documentelor specifice testării clinice și obținerea aprobărilor; (5) Selecția zonelor de testare și a personalului competent; (6) Evaluarea efectuată de către comisia de etică și aprobarea protocolului; (7) Evaluarea efectuată de către autoritățile de reglementare; (8) Înrolarea subiecților: selecție, aplicarea criteriilor de eligibilitate și obținerea consimțământului informat; (9) Asigurarea calității investigațiilor prin respectarea GMP; (10) Desfășurarea testării; (11) Asigurarea măsurilor de siguranță în testare; (12) Monitorizarea testării clinice; (13) Organizarea, stocarea și prelucrarea datelor; (14) Asigurarea calității desfășurării studiului și a datelor obținute; (14) Raportarea rezultatelor [341].

Testarea clinică este o etapă obligatorie a evaluării biologice a unui material sau dispozitiv. Obiectivul principal al acesteia este înțelegerea cauzelor, a dezvoltării și a efectelor diverselor afecțiuni, precum și îmbunătățirea procedurilor și metodelor de preventie, diagnostic și tratament. Acest obiectiv trebuie îndeplinit doar după respectarea unor standarde și principii etice care asigură respectul pentru subiecții implicați în cercetare și le protejează sănătatea și drepturile [343].

De-a lungul timpului, principiile etice ale testării clinice au fost detaliate în mai multe coduri, ghiduri și reglementări internaționale. Dintre acestea, cele mai importante sunt: Codul Nuremberg (1947), Raportul Belmont (1979), U.S. Common Rule (1991), Declarația de la Helsinki (2013) [344] și Ghidul pregătit de Consiliul Organizației Internaționale de Științe medicale și Organizația Mondială a Sănătății cu linii directoare referitoare la etica cercetării din domeniul sănătății care implică subiecți umani (2016)[342].

Cel mai important document privind etica în cercetarea biomedicală este Declarația de la Helsinki (2013). Această declarație reglementează competența personalului implicant, riscurile și beneficiile cercetării, grupurile și indivizi vulnerabili, cerințele și protocoalele științifice aplicabile, comisiile științifice de etică, obținerea consimțământului informat, utilizarea placebo, precum și publicarea și diseminarea rezultatelor cercetării [344].

U.S. National Institute for Health propune, pe baza documentelor menționate anterior, respectarea a șapte principii ale eticii în cercetarea biomedicală desfășurată pe subiecți umani:

1. Importanța socială și clinică: rezultatele obținute în urma cercetării trebuie să aducă o contribuție semnificativă la înțelegerea sau dezvoltarea metodelor de prevenire și tratament.
2. Validitatea științifică: un studiu trebuie să fie programat astfel încât concluziile rezultate să satisfacă scopurile propuse.
3. Selecția corectă a subiecților: presupune alegerea celor subiecți care satisfac cerințele studiului, cu riscuri minime, sporind totodată beneficiile pentru indivizi și societate.
4. Proportie satisfăcătoare între riscuri și beneficii: în cercetare, incertitudinea asociată risurilor și beneficiilor unei substanțe, unui dispozitiv sau unei proceduri este inherentă, altfel nu ar mai exista necesitatea efectuării studiului. Evaluarea risurilor este un principiu obligatoriu în cercetarea efectuată pe subiecți umani. În general, voluntarii beneficiază de servicii medicale sau alte beneficii în schimbul participării.
5. Verificare independentă: o evaluare de terță parte este necesară pentru a diminua posibilele conflicte de interes și pentru a asigura respectarea principiilor etice încă dinaintea începerii studiului.
6. Consimțământ informat: participanții trebuie să hotărască individual dacă doresc să participe la desfășurarea studiului. Consimțământul este oferit doar după informarea detaliată cu privire la cercetarea efectuată și înțelegerea acestor informații.
7. Respect față de subiecți actuali și posibili: subiecții vor fi tratați cu respect pentru timpul alocat studiului, chiar dacă refuză participarea [345].

Răspunsul *in vivo* al implanturilor de hidroxiapatită preparată cu amidon nu a fost suficient evaluat deocamdată. Un studiu preliminar a evaluat pe 3 pacienți și arătat că după implantare se formează țesut osos nou după 6 săptămâni, fără pierdere de substanță osoasă sau semne de infecție la 1 an de la implantare. Evaluarea histologică a explanturilor a arătat că acestea și-au păstrat integritatea (cu o tendință minoră de resorbție la 6-9 luni după implantare) și nu au indus reacții adverse. De asemenea, a fost observată formarea de țesut osos la suprafață și în interiorul dispozitivelor, inclusiv în porii acestora [346].

## 2.6. Concluzii

Diferențele între concepțele și aplicațiile ingineriei țesutului osos sunt asociate cu nevoia de înțelegere a caracterizării țesutului nativ, nevoia de a încorpora această caracterizare în proiectarea noului produs și necesitatea de a fabrica produse care să îndeplinească specificațiile de proiectare. În ciuda tuturor descoperirilor din domeniul științei biomaterialelor, sunt necesare investigații suplimentare pentru înțelegerea chimiei suprafețelor, mecanismelor de eliberare a factorilor de creștere și a caracteristicilor transportului de masă care accelerează în mod optim formarea specifică de țesut osos. Așadar, nu există strategii care să menționeze în mod clar care este materialul optim pentru înlocuirea unui anumit țesut, care sunt proprietățile mecanice pe care trebuie să le îndeplinească un scaffold, ce proprietăți de suprafață trebuie să prezinte un scaffold sau cum trebuie să decurgă degradarea acestuia. Suplimentar, utilizarea clinică a țesuturilor artificiale și a scaffold-urilor necesită pacienți voluntari pentru substituția osoasă. Noutatea domeniului și lipsa studiilor clinice este însotită de riscuri și provocări majore după implantare.

Utilizarea argintului sub formă de particule cu dimensiuni micrometrice creează perspective optimiste cu privire la perfecționarea metodelor de procesare și a proprietăților antibacteriene ale hidroxiapatitei derivate din țesut osos bovin. Evaluarea acestor materiale necesită testarea complementară în cadrul unor studii extinse, pentru stabilirea biocompatibilității materialelor și a posibilităților de îmbunătățire a caracteristicilor acestora.

Utilizarea particulelor de amidon ca agent porigen în sinterizarea hidroxiapatitei este considerată o metodă sigură din punct de vedere al toxicității materialelor deoarece procesarea

la temperaturi ridicate asigură degradarea completă și lipsită de riscuri a amidonului. Rezultatele arată că adiția de amidon ca agent porigen ajută la procesarea facilă a ceramicelor pe bază de hidroxiapatită până în momentul sinterizării și contribuie la definirea unei structuri ceramice poroase. Informațiile adunate din cercetările referitoare la compozitele hidroxiapatită-amidon este utilă în acest caz pentru controlul proprietăților semifabricatelor, cu contribuții semnificative în asigurarea acurateței dimensionale a produselor sinterizate.

Metoda de obținere a semifabricatelor cu hidroxiapatită și amidon, deseori denumită „consolidare cu amidon” permite modelarea materialelor în forme tridimensionale complexe și asigură stabilitatea mecanică până la sinterizare fără a modifica materialul ceramic. Cu toate acestea, prepararea gelurilor de amidon necesare pentru consolidare este posibilă într-un interval limitat de temperatură (în jurul temperaturii de 70°C). Compoziția amidonului, dimensiunea particulelor de hidroxiapatită și metoda de amestecare sunt alți parametri care contribuie semnificativ la rezultatele consolidării cu amidon. Deși amprentele particulelor de amidon gelatinizat asigură porozitatea materialelor ceramice după sinterizare, cerințele referitoare la porozitate, dimensiunea porilor și conexiunile dintre aceștia pot necesita utilizarea unor agenți porogeni suplimentari sau a unor metode complementare de obținere a porozității pentru adevararea materialelor pentru aplicații medicale destinate substituției osoase.

Până în prezent, utilizarea amestecurilor de hidroxiapatită și amidon pentru obținerea materialelor destinate diferitelor aplicații specifice substituției osoase este doar parțial cercetată și documentată. Caracteristicile cheie ale amidonului – degradare completă și non-toxică la temperaturi înalte, maleabilitate datorată naturii sale adezive și prelucrabilitate îmbunătățită în prezența forțelor de forfecare, precum și interesul avid acordat metodelor de fabricație aditivă, reintroduc amestecurile hidroxiapatită-amidon în domeniile actuale de cercetare din domeniul fabricării scaffold-urilor. Este de așteptat ca noi ipoteze de cercetare referitoare la amestecurile hidroxiapatită-amidon să fie propuse în viitorul apropiat datorită avansului tehnologic în domeniul fabricării ceramicelor, care să permită soluționarea diferitelor constrângeri de procesare (inclusiv temperatura și compoziția materialelor) și depășirea limitărilor caracteristice metodelor convenționale de fabricare.

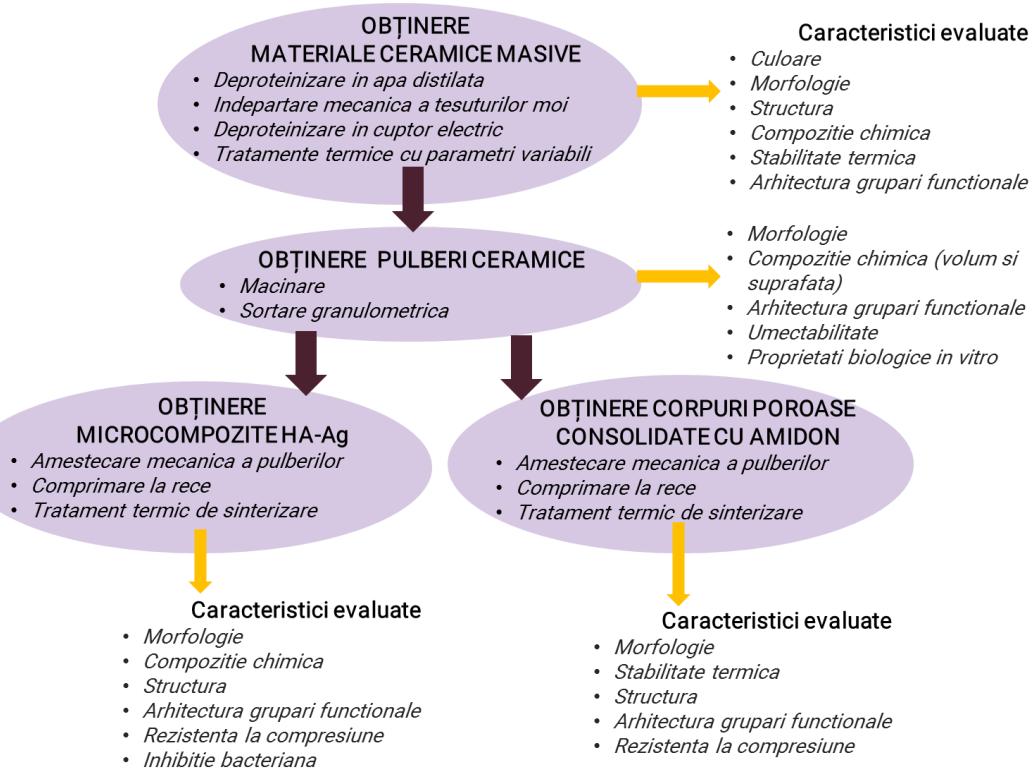
Implicarea tehnologiilor de fabricație aditivă în producția de scaffold-uri pentru reconstrucția osoasă se va intensifica probabil în viitor, datorită capacitații acestora de a crea dispozitive medicale personalizate care să poată fi adaptate pentru cerințe clinice specifice defectului osos reparat sau pacientului. Integrarea tuturor factorilor-cheie în găsirea de soluții care să satisfacă cerințele impuse de aplicațiile medicale este importantă pentru ghidarea progresului acestor tehnici către utilizarea clinică. Clarificarea influenței metodelor de preparare și fabricare asupra performanțelor scaffold-urilor reprezintă aşadar o etapă critică pentru reducerea compromisurilor asociate materialelor bioceramice destinate substituției și regenerării osoase, precum și în ceea ce privește modularea ulterioară a unor proprietăți îmbunătățite și a funcționalității pe termen lung a acestora.

# PARTEA A II-A: CERCETĂRI EXPERIMENTALE

## 3. Metodologia cercetării

Cercetările experimentale aferente tezei de doctorat s-au derulat pe parcursul a patru etape care au vizat obținerea și caracterizarea materialelor și produselor ceramice. În prima etapă s-a urmărit obținerea unor materiale ceramice masive prin procesarea termică a țesutului osos bovin, aplicând diferite strategii de tratament termic. După obținerea materialelor s-au evaluat culoarea, morfologia, structura cristalină, compoziția chimică, stabilitatea termică și prezența grupărilor funcționale în structura materialelor tratate termic la diferiți parametri.

Etapa a doua a cercetării experimentale a vizat obținerea de pulberi ceramice prin măcinarea și sortarea granulometrică a materialelor ceramice masive obținute în etapa anterioară. După obținerea pulberilor s-a urmărit caracterizarea morfologiei, identificarea grupărilor funcționale în structura pulberilor cu diferite dimensiuni ale particulelor, corelarea compoziției chimice a suprafeței cu cea din întregul volum al particulelor de pulbere ceramică, precum și evaluarea umectabilității materialelor și a proprietăților biologice *in vitro* ale acestora.



**Figura 3. 1.** Principalele etape și caracteristici evaluate în cercetarea experimentală aferentă tezei de doctorat

În cea de-a treia etapă a cercetării experimentale s-au obținut materiale microcompozite din hidroxiapatită cu diferite concentrații de argint. Microcompozitele au fost obținute după comprimarea amestecurilor pulverulente de hidroxiapatită și argint aplicând diferențiate forțe de apăsare și sinterizarea comprimatelor la temperatura de 1000°C. Materialele au fost caracterizate după fiecare etapă a sinterizării; au fost caracterizate pulberile precursoare,

amestecurile pulvurulente destinate sinterizării, semifabricatele comprimate și structurile obținute după sinterizare. Analizele și tesle efectuate au vizat caracterizarea morfologiei, structurii cristaline, compoziției chimice, prezenței grupărilor funcționale în structura materialelor, rezistenței la compresiune și efectului antibacterial ale materialelor obținute.

Cea de-a patra etapă a cercetării experimentale a vizat obținerea unor materiale ceramice poroase prin aplicarea unui program convențional de sinterizare a hidroxiapatitei utilizând amidon ca agent de consolidare a semifabricatelor comprimate și ca agent de formare a porilor în materialele sinterizate. Evaluarea materialelor obținute a cuprins caracterizarea morfologiei, stabilității termice, structurii cristaline, grupărilor funcționale prezente în structură și a rezistenței la compresiune după prepararea amestecurilor, formarea și sinterizarea acestora.

Pe baza evaluărilor din cele patru etape ale cercetării experimentale, a fost elaborată o tehnologie de fabricare a unor implanturi ceramice cu porozitate și caracteristici mecanice adecvate pentru reconstrucția osoasă a defectelor osoase majore. Această tehnologie de fabricare a fost aplicată pentru obținerea unor implanturi-prototip cu diferite dimensiuni și caracteristici de porozitate. Evaluarea preliminară a implanturilor-prototip a vizat caracterizarea morfologică și testarea rezistenței la compresiune.

Metodologia aplicată și rezultatele obținute în cadrul cercetărilor au dus la dezvoltarea:

- unei rute exclusiv termice de procesare a țesutului osos bovin, pentru obținerea de materiale ceramice destinate fabricării de implanturi pentru substituție osoasă, cu posibilitatea obținerii unor caracteristici de material controlabile prin variația parametrilor de tratament termic;
- unei proceduri de obținere a unor materiale microcompozite pe bază de hidroxiapatită și argint, cu efect antibacterian și sinterabilitate imbunătățită;
- unei proceduri de sinterizare a hidroxiapatitei utilizând amidon alimentar ca aditiv de sinterizare în vederea asigurării unei microporozități adecvate pentru reconstrucția osoasă;
- unei tehnologii de fabricare a unui produs tip scaffold pe bază de hidroxiapatită, pentru reconstrucția defectelor osoase majore;

Pe lângă aceste contribuții din domeniul obținerii de produse pentru substituția osoasă, cercetările aferente prezentei teze de doctorat au dus și la dezvoltarea unei proceduri de caracterizare a compoziției chimice a particulelor ceramice de la suprafață către volum, utilizând metode spectrale care preiau semnal analitic din adâncimi diferite de analiză.

### 3.1. Materiale

Materialele ceramice investigate în această teză de doctorat au fost obținute din țesut osos bovin (componenta centrală a femurului din care au fost îndepărtate articulațiile) achiziționat de la abatoare locale. Pentru formarea amestecurilor de sinterizare s-au utilizat apă distilată, microparticule de argint de puritate comercială și microparticule de amidon alimentar din porumb.

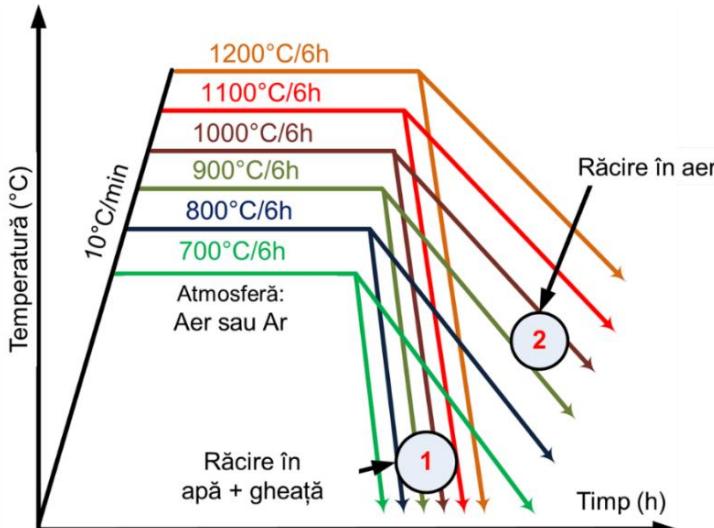
#### 3.1.1. Obținerea produselor ceramice primare

Pentru obținerea produselor ceramice primare, țesutul osos bovin a fost procesat pentru îndepărtarea componentelor organice. Procesarea a inclus: fierberea bucăților de os bovin în apă timp de 2 ore; îndepărtarea resturilor de țesut moale prin procedee mecanice și tratarea termică la 500°C, timp de 2 ore, în cuptor electric, în atmosferă de aer, cu ventilație continuă.

Produsele ceramice primare rezultate în urma eliminării componentelor organice au fost tratate termic în cuptor electric, în condiții diferite de tratament. Temperatura de tratament a fost variată între 800 și 1200°C, iar durata de menținere a fost variată între 2-6 ore. Încălzirea

a avut loc în atmosferă de aer sau argon, iar răcirea produselor ceramice masive obținute a fost efectuată lent, în cuptor, sau rapid, în apă cu gheață.

Pentru evaluarea influenței parametrilor de tratament termic asupra caracteristicilor produselor ceramice obținute s-au efectuat tratamente termice conform diagramei următoare [5]:



**Figura 3. 2.** Strategii de procesare termică a țesuturilor dure animale cu parametri de tratament diferenți, a căror variație permite obținerea de produse cu caracteristici personalizate [5]

### 3.1.2. Obținerea pulberilor hidroxiapatitice

Pulberile hidroxiapatitice au fost obținute prin măcinare în mori cu bile de agat, în incintă de agat. Măcinarea s-a realizat timp de 2 ore, la 450 rot/min. După măcinare pulberile au fost sortate granulometric prin vibrare în site succesive cu dimensiunea ochiurilor cuprinsă între 200 și 20 de micrometri.

Pentru evaluarea caracteristicilor pulberilor s-a utilizat țesut osos bovin tratat termic la 1200°C, cu o viteză de creștere a temperaturii de 10°C/minut și un timp de menținere de 4 ore. Pulberile ceramice au fost obținute prin măcinare în mori cu bile, în incintă de agat. Sortarea granulometrică a generat 5 tipuri de probe, cu dimensiuni ale particulelor < 20µm; 20 - 40µm; 40 - 100µm; 100 - 200µm și > 200µm. Evaluarea probelor pulberulente s-a efectuat prin comparație cu o probă din pulbere nesortată, considerată probă de referință [347].

### 3.1.3. Obținerea materialelor microcompozite pe bază de hidroxiapatită și argint

Pentru obținerea materialelor microcompozite pe bază de hidroxiapatită și argint s-a utilizat pulbere hidroxiapatită obținută după tratamentul țesutului osos bovin la 1000°C, cu o viteză de încălzire de 10°C/minut și menținere timp de 2 ore. Pulberea de hidroxiapatită a fost sortată granulometric pentru obținerea unor dimensiuni ale particulelor cuprinse între 100 – 200 µm.

Amestecul pulverulent pentru obținerea microcompozitelor a fost obținut prin încorporarea în HA a diferite cantități de microparticule de argint cu dimensiunea particulelor 2 – 10 µm. S-au obținut 5 probe cu 0.1 – 2 wt%. Ag notate: HA-0.1%Ag, HA-0.2%Ag, HA-0.5%Ag, HA-1%Ag, HA-2%Ag. Evaluarea probelor cu argint a fost efectuată prin comparație cu HA fără argint, considerată probă martor.

Pentru formarea amestecurilor de sinterizare hidroxiapatita cu argint a fost amestecată cu apă distilată, iar pasta obținută a fost presată la 0,1 MPa și 25 MPa. Amestecurile astfel formate au fost sinterizate pentru 6 ore la 1000°C [348, 349].

### **3.1.4. Obținerea corpurilor ceramice poroase din hidroxiapatită utilizând amidon ca agent de consolidare și de formare a porilor**

Pentru obținerea corpurilor ceramice au fost utilizate două loturi de pulbere hidroxiapatitică: pulbere sortată, cu dimensiunea particulelor cuprinsă între 100 – 200  $\mu\text{m}$ ; și pulbere amestecată, preparată prin amestecarea unor părți egale de pulbere sortată, cu dimensiuni ale particulelor de: <20  $\mu\text{m}$ , 20-40  $\mu\text{m}$ , 40-100  $\mu\text{m}$  și respectiv 100-200  $\mu\text{m}$ . Fiecare lot de pulbere a fost amestecat cu 0 – 50% amidon alimentar și omogenizat timp de 15 minute utilizând un mixer (Bioengineering Inversina, 2L).

Semifabricatele au fost preparate prin omogenizarea pulberilor de HA și HA-amidon cu apă în proporție apă/pulbere = 1/4. Gelificarea amidonului a fost indușă prin încălzirea soluțiilor la  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  cu amestecare continuă. Probele gelificate au fost presate la rece la 25 MPa în forme cilindrice și apoi uscate în aer atmosferic timp de 240 de ore anterior testării.

Copurile cilindrice gelificate cu diferite cantități de amidon și diferențe dimensiuni ale particulelor de HA au fost sinterizate într-un cuptor electric, în atmosferă de aer, la  $1200^\circ\text{C}$ , timp de 4 ore. Copurile sinterizate au fost depozitate în condiții atmosferice normale până în momentul testării [85].

## **3.2. Metode de analiză și caracterizare a materialelor**

### **3.2.1. Microscopia electronică de baleaj (SEM)**

Microscopia electronică de baleaj (SEM) este o tehnică de analiză utilizată pentru obținerea de imagini ale probelor prin baleierea suprafeței acestora cu un fascicul de electroni. Fasciculul de electroni, emis de un tun electronic, care bombardează suprafața probei după ce traversează o coloană electrono-optică, poartă numele de fascicul incident sau primar. Din interacțiunea fasciculului de electroni cu suprafața probei rezultă o serie de semnale, a căror detectie, amplificare și procesare duce la obținerea unor informații privind morfologia, structura și compoziția probelor [350].

Caracterizarea morfologiei produselor ceramice primare obținute după tratamentul termic al țesutului osos bovin, pulberilor precursoare, semifabricatelor comprimate și a copurilor sinterizare cu diferențe adiții de argint și amidon a fost efectuată prin microscopie electronică de baleaj (SEM) cu un echipament Philips ESEM 30 Philips XL 30 ESEM TMP la presiune de 0.7 mBar și 25-30 kV tensiune de accelerare. Informația analitică caracteristică pentru probele ceramice a fost obținută dintr-un mix de electroni secundari și retroîmprăștiați (MIX), iar imaginile aferente pulberilor de argint, respectiv amidon au obținute din emisia electronilor secundari (SE, respectiv GSE). Probele au fost analizate fără acoperire sau pregătire prealabilă.

### **3.2.2. Spectrofometria aplicată pentru evaluarea culorii materialelor ceramice**

Spectrofometria este o metodă care înregistrează variația reflectanței sau transmitanței unui obiect. Cantitatea de lumină reflectată de o probă este măsurată pentru fiecare lungime de undă din spectrul vizibil. Spectrometrele utilizate pentru evaluarea culorii materialelor exprimă rezultatele în sistemul CIE L\*a\*b\* și apoi le codifică în conformitate cu un sistem prestabilit de asignare a nuanțelor.

Evaluarea culorii materialelor ceramice primare obținute după procesarea țesutului osos bovin la diferențe temperaturi de tratament termic a fost efectuate cu un sistem VITA Easyshade Advance conform procedurii furnizate de producător. Măsurările au fost efectuate într-o cameră întunecată, cu un iluminant de tip D65, pe un fundal gri, de către un singur operator.

### 3.2.3. Difracția de raze X (XRD)

Difracția este fenomenul fizic de deviere de la propagarea rectilinie a unei unde, atunci când aceasta întâlnește un obstacol sau parcurge un mediu neomogen. Tehnicile de difracție utilizează fenomenul de împrăștiere a radiațiilor la interacțiunea cu materia. Acest tip de împrăștiere descrie modificarea direcției în cazul mișcării unei particule în urma coliziunii cu altă particulă. Rezultatele tehniciilor de difracție sunt înregistrate sub forma unor spectre de difracție, care pot fi utilizate pentru determinarea structurii cristalografice a materialelor (determinarea parametrilor de rețea, a grupurilor spațiale și a coordonatelor atomice ale materialelor cristaline) și identificarea fazelor dintr-un material, pentru cuantificarea modificărilor parametrilor de rețea și/ sau determinarea orientării și mărimii unor parametri [351].

Structura pulberii ceramice prezentată în cap. 4.4 fost analizată, fără pregătire prealabilă, cu un difractometru Panalytical, cu radiație Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ), în intervalul  $2\theta=20\text{--}70^\circ$  cu pas de  $0.02^\circ$  și timp de achiziție de 2 s/pas.

Structura materialelor evaluate în cap 4.5, a fost investigată cu un difractometru cu raze X Bruker D8 Advance, cu radiație Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ), folosind un detector de tip Lynx Eye. Probele au fost investigate în domeniul  $2\theta=9\text{--}50^\circ$  cu pas de  $0.02^\circ$  și timp de achiziție de 2 s/pas. Pulberile de hidroxiapatită și amidon au fost analizate fără pregătire prealabilă; Compozitele gelificate și corpurile sinterizate au fost fracturate, iar analizele au fost efectuate pe o suprafață internă;

### 3.2.4. Calorimetria cu scanare diferențiată (DSC)

Calorimetria cu scanare diferențiată (DSC) este o tehnică instrumentală utilizată pentru investigarea mecanismelor care stau la baza proceselor termice. Metoda implică măsurarea probei testate în comparație cu o probă inertă, de referință. Tehnica măsoară fluxul termic în timpul încălzirii. Acesta poate fluctua datorită unor modificări ale fazelor și structurii cristaline, care au loc la diferite temperaturi, specifice materialului testat. Pe o curbă DSC sunt reprezentate debitul de căldură versus temperatura. Debitul de căldură se măsoară într-o unitate de energie/unitate de masă/timp, în mod ușual  $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ . În general, creșterea de căldură din probă (datorată unui proces exoterm) este indicată ca o creștere și pe curba DSC [352, 353]. DSC oferă informații despre: • comportarea materialelor la topire, cristalizare, fierbere, sublimare, devitrifiere; • temperaturile caracteristice transformărilor de fază, topirii, cristalizării, reacțiilor chimice; • cinetica (ecuația sau funcția caracteristică) reacțiilor și a formării fazelor; • stabilitatea termică la oxidare; • tranziția vitroasă; • gradul de cristalinitate al polimerilor [354].

### 3.2.5. Analiza termogravimetrică (TGA)

Analiza termogravimetrică (TGA) sau termogravimetria este o metodă utilizată pentru monitorizarea modificărilor chimice și fizice care au loc într-un material în timpul încălzirii. Metoda măsoară variația masei unei probe odată cu modificarea temperaturii. Proba care urmează să fie analizată este plasată într-un cupor, modificările masei sunt monitorizate cu ajutorul unei electrobalanțe, iar rezultatele sunt afișate sub forma unei curbe termogravimetrice. Diferite fenomene pot duce la scăderi sau creșteri ale masei probei în timpul analizei, deoarece proba interacționează cu mediul în care are loc încălzirea. Aceste fenomene includ: evaporarea constituenților volatili; adsorbția de gaze, umiditate sau alte substanțe volatile; pierderea apei de cristalizare; oxidarea materialelor organice în mediu de aer sau oxigen; descompunerea termică în atmosferă inertă. [353, 355].

Analizele termice (calorimetrie cu scanare diferențiată cuplată cu analiză termogravimetrică – DSC-TGA) prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au fost efectuate în intervalul de temperatură 20 - 1500°C, cu un echipament DSC-TGA Q600 SDT (TA Instruments). Experimentele au fost efectuate în mediu de aer. Aproximativ ~20 mg de probă pulverulentă, plasată într-un creuzet de aluminiu a fost analizată în fiecare experiment. Pe parcursul experimentelor debitul de gaz a fost menținut la 25 ml/min, iar viteza de încălzire a fost de 10°C/min [85].

### 3.2.6. Spectroscopia fotoelectronilor de raze X (XPS)

Electronii, ionii și fotonii emiși din straturile superficiale ale suprafeței pot fi utilizati pentru a furniza informații calitative și cantitative cu privire la chimia suprafeței. În spectroscopia fotoelectronilor de raze X, proba este iradiată cu raze X de energie joasă, care duc la emisia de electroni de pe orbitalii atomici de joasă energie prin intermediul efectului fotoelectric. Un spectrometru XPS permite calcularea energiei de legătură a fotoelectronilor emiși după iradierea probei, rezultatele spectrale fiind reprezentate în mod uzual ca numărul de electroni emiși vs. energia de legătură caracteristică a atomului și orbitalului de pe care a fost emis electronul.

XPS este o metodă care poate fi utilizată pentru analiza calitativă și cantitativă a compoziției elementale a suprafeței și pentru determinarea stării de oxidare a atomilor de la suprafața probelor. Analiza calitativă se bazează pe spectre obținute la rezoluții joase, care acoperă un domeniu larg de energii (0 – 1250eV), și include compararea fiecărui vârf din spectru cu spectre standard, pentru a identifica elementele prezente (pentru fiecare element chimic există în spectrul XPS un vârf corespunzător nivelului de energie specific). Analiza cantitativă presupune calcularea concentrațiilor atomice ale elementelor identificate în probă (cu o acuratețe de  $\pm 10\%$ ), pe baza intensităților vârfurilor caracteristice. Determinarea stării de oxidare a atomilor prezentați la suprafața probei și analiza legăturilor chimice existente între aceștia necesită spectre obținute la rezoluții înalte, pe domenii restrânse, iar informațiile de interes pot fi determinate din tranzițiile chimice ale pozițiilor vârfurilor caracteristice din spectrul XPS [356].

În această teză de doctorat, compoziția suprafeței pulberilor de hidroxiapatită a fost analizată cu un echipament Thermo Scientific K-Alpha, complet integrat, cu o sursă monocromatică cu anod din Al (1486.6 eV). Spectrele XPS au fost achiziționate în modul de transmisie fixă (eng. *fixed analyzer transmission - FAT*) între 0 – 1350 eV, cu pas de 1 eV. Fiecare probă a fost analizată de 3 ori iar rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică  $\pm$  abatere standard [347].

### 3.2.7. Spectroscopia de raze X cu dispersie după energii (EDS, EDX)

EDS este o tehnică instrumentală care permite efectuarea de analize calitative și semicantitative în vederea stabilirii compoziției chimice elementale a unor regiuni microscopice ale biomaterialelor [357, 358]. Tehnica de analiză se bazează pe dispersia energiei radiațiilor X generate de bombardarea suprafeței probei cu electroni accelerati. În general, rezoluția analitică depinde de energia fasciculului incident, masa atomică, numărul atomic și densitatea probei. Informația cantitativă este bazată pe abundența elementală relativă [357]. Printre parametrii critici ai analizelor EDS se numără tensiunea de accelerare, mărirea și metoda de acoperire a probei. Iradierea unei probe cu un fascicul de electroni determină un transfer de energie către probă, care poate duce la degradarea acesteia. De aceea, o valoare ridicată a tensiunii de accelerare duce la creșterea temperaturii și totodată a riscului de degradare a probei (în experimentele din această teză, tensiunea de accelerare a fost menținută

la 25 kV). De asemenea, temperatura de la suprafața probelor de țesut osos este influențată de mărirea la care are loc analiza, care în această lucrare a fost menținută la valori reduse (200X). În ceea ce privește acoperirea, probele au fost montate pe suporturi de aluminiu și fixate cu banda dublu adezivă din carbon, iar capacitatele deosebite ale echipamentului au permis analizarea probelor fără acoperirea suplimentară a suprafețelor [357-359].

Analizele EDS din această teză de doctorat au fost efectuate cu un sistem de microanaliză EDAX Sapphire UTW, cu rezoluție de 128 eV, cuplat microscopului electronic de baleaj Philips XL 30 ESEM TMP ([cap. 3.3.1.](#)). Fiecare probă a fost analizată de 3 ori în zone ale probei alese în mod aleator, iar rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică ± abatere standard.

### **3.2.8. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)**

Spectrul în infraroșu, rezultatul furnizat de un spectroscop IR cu transformată Fourier, poate fi utilizat ca o amprentă pentru identificarea unei probe necunoscute, prin compararea cu spectrul unei probe de referință, analizate anterior. Caracterizarea, și uneori chiar identificarea probei pot fi realizate și în absența unei probe de referință, deoarece o serie de caracteristici structurale ale moleculelor vor produce în IR semnale caracteristice și reproductibile. Interpretarea rezultatelor FT-IR trebuie însă să aibă în vedere metoda de pregătire și procesele la care a fost supusă proba anterior analizei.

Deși FT-IR este o metodă asociată în mod uzual cu probele organice, aceasta reprezintă un mijloc util de caracterizare a probelor anorganice, deoarece toți compușii de natură ionică sau coordinativă vor produce un semnal caracteristic, influențat de structură și de orientare [360]. Analiza FT-IR este, aşadar, adecvată pentru caracterizarea componentei minerale a țesutului osos, oferind informații cu privire la tipul legăturilor moleculare și conținutul lor relativ în materialul analizat și, uneori, cu privire la structura acestuia. Spectrul țesutului osos cuprinde benzile caracteristice ale colagenului și hidroxiapatitei, precum și unele benzi noi, rezultate din substituțiile cu grupări carbonat din structura cristalină a hidroxiapatitei [361].

Spectrele de absorbție în infraroșu ale pulberilor de hidroxiapatită analizate în [cap.4.1.](#), [cap. 4.2.](#) și [cap 4.4.](#) au fost obținute cu un spectrometru FT-IR tip Bruker Tensor 27, echipat cu un accesoriu pentru analiză prin metoda reflexiei totale atenuate (ATR). Toate spectrele FT-IR – ATR au fost înregistrate în condiții normale de temperatură, în intervalul  $4000 - 550 \text{ cm}^{-1}$ , la o rezoluție spectrală de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , cu 32 scanări per analiză [5, 347, 348].

Analiza grupărilor funcționale prezente în materialele analizate în [cap. 4.5.](#) a fost efectuată pe baza rezultatelor furnizate de un echipament Perkin Elmer BX Spectrum II, în reflexie totală atenuată (ATR), folosind un dispozitiv din diamant Pike-MIRacle cu diametrul de 1.8 mm. Spectrele au fost înregistrate în domeniul  $530 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , cu o rezoluție de  $4 \text{ cm}^{-1}$  și 128 scanări per experiment [85].

### **3.2.9. Spectrometria de fluorescentă a razelor X (XRF)**

Spectrometria de fluorescentă a radiațiilor X (XRF) determină compozitia chimică a unui material utilizând un fascul incident de radiații X cu energii înalte. Fotonii incidenti de radiație X sunt absorbiți în proba analizată, iar interacțiunea dintre fotoni și probă duce la expulzarea unor electroni din atomii probei; acest fenomen duce la emisia de radiații X caracteristice. Electronii expulzați sunt denumiți „fotoelectroni” sau „fotoni secundari”, iar radiația caracteristică emisă este denumită „radiație secundară” sau „radiație fluorescentă” [351, 362]. Emisia de radiație caracteristică fiecărui element din tabelul periodic este complet independentă de tipul de legături chimice existente în probă, ceea ce facilitează măsurarea cu acuratețe ridicată a majorității elementelor chimice dintr-o probă dată. XRF poate oferi un

domeniu de detecție relativ uniform pentru o porțiune largă a sistemului periodic și este aplicabilă unui domeniu de concentrație variat, de la 100% până la câteva părți per milion (ppm) [136].

Compoziția chimică elementală a pulberilor de hidroxiapatită a fost analizată prin spectrometrie de fluorescență a radiațiilor X cu dispersie după lungimi de undă (WD-XRF), utilizând un echipament tip Bruker S8 Tiger Advanced, dotat cu un tub de radiații X cu țintă din rodiu și două tipuri de detectori. Probele au fost analizate fără pregătire suplimentară, fiind depuse într-un cilindru, pe o folie polimerică de Mylar destinată analizelor XRF. Fiecare probă a fost analizată de 3 ori, iar rezultatele sunt exprimate ca medie aritmetică  $\pm$  abatere standard. Rezultatele au fost obținute prin metoda standardless cu ajutorul software-ului dedicat, Quant-Express [347].

### 3.2.10. Încercarea la compresiune

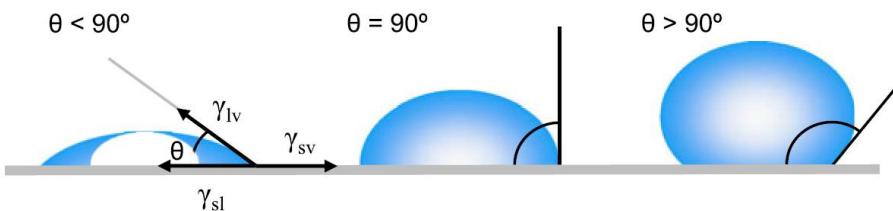
Testarea rezistenței la compresiune constă în comprimarea axială a unei epruvete până în momentul în care pe suprafața acesteia apar primele fisuri. Încercarea se realizează pe epruvete cu formă cilindrică sau tubulară. Principala provocare ridicată de încercarea la compresiune este realizarea unei stări de tensiune omogene pe epruvetă deoarece în timpul comprimării, starea de tensiune axială se modifică ca urmare a frecării între suprafețele de contact ale epruvetei și suprafețele de apăsare. Încercarea se efectuează prin aplicarea lentă și fără șocuri a sarcinii, cu o viteză de solicitare aleasă în funcție de materialul testat și de caracteristicile care vor fi determinare. În urma realizării încercării se pot determina: modulul de elasticitate convențional secant, limita de curgere aparentă, rezistența la compresiune și umflarea la rupere [363, 364].

Pentru încercările la compresiune din prezenta teză de doctorat, epruvetele sinterizate din microcompozite cu hidroxiapatită și argint (rezultate prezentate în cap. 4.4) au fost prelucrate pentru obținerea unor probe cilindrice cu suprafețe externe netede cu diametru final de  $10.0 \pm 0.5$  mm și înălțime finală de  $10.0 \pm 0.8$  mm. Epruvetele din compozite gelificate și corpuri sinterizate cu amidon (rezultate prezentate în cap. 4.5) au fost pregătite conform același proceduri, obținându-se probe cilindrice cu un diametru final de  $10.0 \pm 0.2$  mm și o înălțime finală de  $10.0 \pm 2.1$  mm.

Testarea rezistenței la compresiune a fost efectuată cu o mașină universală Walter + Bai LSB 300 cu forță de 300 kN. Viteza de deplasare a mașinii a fost setată la 1 mm/min, cu timp de achiziție a datelor la 0.05s.

### 3.2.11. Evaluarea unghiului de contact

Unghiul de contact este unghiul format la intersecția interfeței lichid-solid și interfeței lichid-gaz (obținut geometric prin trasarea unei linii tangente din punctul de contact de-a lungul interfeței lichid-vapor în profilul unei picături). Fig. 3.3. arată că atunci când lichidul picurat pe o suprafață se întinde, unghiul de contact are o valoare redusă, iar când picătura își menține forma la suprafața solidului, unghiul de contact are o valoare mai mare. Un unghi de contact mai mic de  $90^\circ$  indică o bună umectare a suprafeței, cu un fluid bine împrăștiat pe suprafața solidului, iar un unghi de contact mai mare de  $90^\circ$  arată că umectarea suprafeței nu este favorabilă, iar fluidul își va limita contactul cu suprafața solidă și va forma o picătură compactă. Umectarea completă are loc atunci când unghiul de contact este  $0^\circ$  și picătura se transformă într-o masă plată de lichid. În cazul suprafețelor superhidrofobice, unghiul de contact format de o picătură de apă depășește de obicei  $150^\circ$  [365].



**Figura 3. 3.** Ilustrare a unghiului de contact format de o picătură de lichid pe o suprafață omogenă [365]

Probele folosite pentru măsurarea unghiului de contact au fost obținute prin presarea unui amestec din pulbere de hidroxiapatită și apă distilată. Compactarea a fost efectuată în măriță cilindrică (diametru 12 mm), prin aplicarea unor presiuni de 0,1 MPa, 10 MPa și 25 MPa. Eșantioanele comprimate au fost uscate 24 de ore în etuvă ventilată, la 80°C. Au fost obținute astfel probe cu porozități și densități diferite.

Umectabilitatea și caracterul hidrofil/hidrofobic au fost evaluate prin măsurarea unghiului de contact format la depunerea unei picături de apă distilată pe probe din hidroxiapatită. Evaluarea umectabilității a fost realizată cu ajutorul unui instrument DSA 100 (Kruss). Experimentele au fost efectuate la temperatură de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  și umiditate de  $45 \pm 5\%$  RH. Captarea imaginii a fost realizată la 1 s după depunerea picături pe suprafața probei. Imaginile au fost prelucrate cu ajutorul software-ului ImageJ 1.50. Rezultatele reprezintă media a trei măsurări.

### 3.2.12. Evaluarea biocompatibilității *in vitro*

Evaluarea biocompatibilității *in vitro* a fost efectuată prin testarea citotoxicității pe linii celulare primare de celule preosteoblaste (linie celulară MC3T3-E1, subclona 4, furnizată de ATCC). Linia celulară selectată asigură un mediu stabil, omogen și reproductibil pentru a investiga factorii care influențează comportamentul celulelor osteoblaste, în special în ceea ce provochează secreția matricei extracelulară, asamblarea și mineralizarea acesteia.

Celulele MC3T3-E1 au fost cultivate pe plăci de polistiren (TCPS – ca referință) și pe suprafața probelor obținute din tratamentul termic al țesutului osos bovin efectuat la 1200°C, pentru 6 ore, cu o viteză de încălzire de 10°C/min și răcire lentă în cuptor. Produsele ceramice primare au fost măcinate într-o moară cu bile și incintă de agat. Pulberile ceramice obținute au fost comprimate cu o forță de apăsare de 25MPa.

- Evaluarea citotoxicității: având în vedere că celulele sunt sensibile la mediul înconjurător, în primul set de experimente s-a evaluat, ca indicator al citotoxicității, secreția de lactat dehidrogenaza (LDH) din preosteoblaste. Experimentele au fost efectuate utilizând un kit de detecție a citotoxicității (TOX-7, Sigma-Aldrich Co.) conform protocolului furnizat de producător
- Evaluarea calitativă a supraviețurii și proliferării celulare a fost efectuată prin colorarea simultană a celulelor vii și moarte cu doi flurocromi: calceină (Calcein AM) și ethidiu (Ethidium homodimer-1). Calceina colorează citoplasma celulelor vii în verde datorită conversiei în calceină fosforescentă, iar ethidiul penetrează membranele celulare degradate și reacționează cu acizii nucleici, colorând nucleul celulelor moarte în roșu. Morfologia celulelor a fost evaluată la 1, 3 și 5 zile de la cultivare. Imaginile au fost obținute cu ajutorul unui microscop cu fluorescență inversată (Olympus IX71) și înregistrate folosind programul de achiziție a imaginilor cell^F.
- Evaluarea cantitativă a supraviețurii și proliferării celulare a fost efectuată prin testare colorimetrică MTT, bazată pe reducerea colorantului galben MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliu] la un produs celular violet denumit formazan. Cantitatea de formazan produsă, a cărei absorbanță a fost înregistrată la 550nm utilizând

- un cititor automat de microplăci (Thermo Scientific Appliskan), este proporțională cu numărul de celule viabile, active din punct de vedere metabolic, prezente în probe.
- Morfologia și adeziunea osteoblastelor a fost evaluată prin microscopie electronică de baleiaj utilizând echipamentul descris în [cap. 3.3.1](#) și prin microscopie de fluorescență (echipament Olympus IX71) pe celulele marcate cu anticorpi verde-fluorescent (Alexa Fluor 488 Phalloidin) pentru detecția microfilamentelor de actină din citoschelet, și anti-vinculina (Alexa Fluor 546) pentru colorarea adeziunilor locale.
  - Mineralizarea matricei extracelulară a fost evaluată cantitativ la 3 și 6 săptămâni de la cultivare prin colorarea celulelor cu Alizarin red și evaluarea lor prin citirea absorbanței la 405 nm utilizând un cititor automat de microplăci (Thermo Scientific Appliskan, Vantaa, Finland) [5].

Experimentele au fost realizate în triplicat iar corelația statistică a rezultatelor cantitative a fost determinată cu ajutorul testului de comparație multiplă Bonferonni. Rezultatele sunt raportate ca medie  $\pm$  abatere standard și sunt considerate semnificative din punct de vedere statistic dacă  $p \leq 0.05$ .

### 3.2.13. Evaluarea efectului antibacterian in vitro

Analiza cantitativă comparativă prezentată s-a realizat în mediu lichid (bulion Mueller - Hinton), în plăci cu 96 de godeuri de 1.5mL. S-au realizat diluții specifice pentru pulberea ceramică în care a fost înglobat argint la diferite concentrații. Fiecare probă a fost inoculată cu 20  $\mu$ L de suspensie bacteriană, având densitatea conform standardului 0.5 McFarland ( $\sim 10^8$  celule bacteriene). Au fost folosite controale negative (plăci de politistiren) și pozitive (suspensie bacteriană în bulion nutritiv).

Plăcile au fost incubate timp de 24 ore, la o temperatură de 37°C, pentru a se stabili influența diferitelor concentrații de soluții asupra creșterii celulelor bacteriene. Evaluarea inhibiției bacteriene s-a efectuat prin testarea apariției turbidității mediului și prin citire a absorbanței la 620 nm.

Cantitatea de biofilm dezvoltată de speciile bacteriene în prezența hidroxiapatitei cu diferite concentrații de argint a fost evaluată după 24 de ore de la inoculare. Celulele au fost menținute la pre-aderență 24 ore, clătite de 3 ori în apă fiziologică sterilă, completate cu 200  $\mu$ L mediu de cultură proaspăt, și menținute pentru dezvoltarea de biofilme. Cuantificarea cantității de biofilm a fost efectuată prin colorarea cu cristal violet și evaluarea spectrofotometrică a absorbanței la 420 nm [366].

## 4. Rezultate și discuții

### 4.1. Influența parametrilor de tratament termic asupra morfologiei, structurii și compoziției produselor ceramice primare obținute din țesut osos bovin

#### 4.1.1. Influența temperaturii de tratament

Temperatura de tratament termic este principalul parametru care influențează caracteristicile morfologice, structurale și compoziționale ale țesutului osos bovin supus încălzirii. Degradarea termică a țesutului osos bovin începe la temperaturi mai mici de 100°C cu evaporarea apei adsorbite la suprafața osului și descompunerea componentei organice a acestuia. Aceste fenomene au loc concomitent până la 150 - 250°C. La ~600°C are loc combustia completă a componentei organice a țesutului osos; până la această temperatură, componenta minerală a țesutului osos bovin nu suferă transformări [82, 358, 359, 367, 368].

##### a) Morfologia țesutului osos bovin tratat termic

Aspectul morfologic al țesutului osos bovin tratat termic la temperaturi de 700 - 1200°C este prezentat în fig. 4.1. Probele prezintă o morfologie granulară, cu compoziție uniformă. Rezultatele SEM aferente țesutului osos bovin tratat termic la 700°C arată că proba conține numeroși pori de mici dimensiuni (0.5 – 1.0 µm) dispuși uniform în material și un număr mai redus de pori de dimensiuni mai mari, cu formă alungită (5 – 15 µm lungime). Porii rezultați sunt formați în zonele libere rămase după degradarea fibrelor organice din țesutului osos.

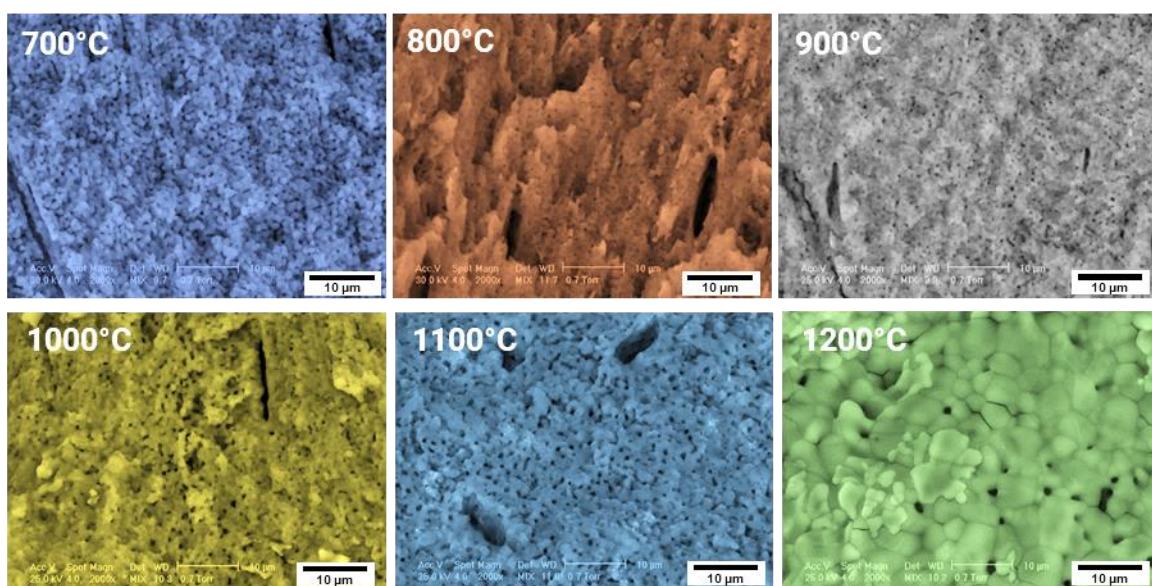


Figura 4. 1. Influența temperaturii de tratament asupra microstructurii țesutului osos bovin tratat termic

Creșterea temperaturii de tratament la 800 - 1100 °C a dus la obținerea unor morfologii similare cu cea descrisă pentru proba tratată la 700°C, dar în care forma grăunților ceramici este mai puțin definită. Probele tratate termic la 800 - 1100°C prezintă mai puțini pori de mici dimensiuni (prezența porilor mari și alungiți variază în mod aleator în funcție de zona analizată). Aceste modificări morfologice sunt consecințe ale fenomenelor de densificare și difuzie caracteristice tratamentelor termice aplicate țesuturilor osoase [74].

După tratamentul termic efectuat la 1200°C consecințele accelerării difuziei din materialul ceramic sunt semnalate de dimensiunile crescute prin coalescență ale grăunților ceramici, comparativ cu proba tratată termic la 700°C. Proba prezintă o microstructură caracteristică pentru materialele ceramice, cu grăunți cu formă poliedrică și limite bine definite. Proba conține pori reziduali de 0.5 – 2 µm situați în punctele de intersecție ale limitelor de grăunte.

Rezultatele SEM arată că efectuarea tratamentului termic al țesutului osos bovin la diferite temperaturi de tratament duce la obținerea unor materiale cu caracteristici morfologice variate. Stabilirea temperaturii optime de tratament depinde de cerințele impuse produsului de substituție osoasă. Pentru obținerea unor astfel de produse este necesar ca tratamentul termic al osului bovin să fie efectuat la o temperatură de minim 800°C, necesară pentru eliminarea riscurilor de contaminare microbiologică, este [369]. Luând în considerare cerințele de porozitate impuse produselor pentru reconstrucție osoasă, în care existența porilor micrometrici este favorabilă pentru pătrunderea țesutului fibros și capilarelor sanguine, și pentru transportul adecvat al fluidelor biologice, temperatura de tratament termic optimă pentru asigurarea unei morfologii adecvate variază între 900 - 1100°C.

### b) Compoziția țesutului osos bovin tratat termic

Rezultatele analizei compoziției probelor din țesut osos bovin tratat termic la temperaturi cuprinse între 700 - 1200°C sunt prezentate în tabelul 4.1. În compoziția probelor au fost identificate elementele chimice tipice pentru materialul studiat: O, Ca, P, C, Mg și Na. Elementele identificate și concentrațiile lor corespund celor specifice fosfaților de calciu cu substituții de Mg și Na.

**Tabel 4. 1.** Compoziția chimică a probelor de țesut osos bovin tratat termic la 700 - 1200°C. Rezultate EDS exprimate în procente atomice și raportul Ca/P calculat pe baza acestora.

Element chimic	Temperatura de tratament					
	1200°C	1100°C	1000°C	900°C	800°C	700°C
O	44.95	43.38	42.51	44.07	43.05	44.29
C	21.64	24.40	25.06	21.53	21.13	20.48
Ca	17.51	14.89	14.96	14.23	13.66	13.23
P	11.50	9.93	10.85	10.14	10.59	9.77
Mg	2.01	5.40	4.49	6.88	7.48	7.23
Na	2.40	2.01	2.15	3.17	4.10	5.01
Ca/P	<b>1.52</b>	<b>1.51</b>	<b>1.38</b>	<b>1.40</b>	<b>1.29</b>	<b>1.35</b>

Principalele elemente din compoziția probelor ceramice sunt O, C, Ca și P. Mg și Na sunt prezente în țesutul osos bovin ca elemente minore. Concentrația acestor elemente a fost puternic influențată de temperatura la care s-a efectuat tratamentul termic: creșterea temperaturii de tratament de la 700°C la 1200°C a dus la reducerea cu o treime concentrării de Mg, și la reducerea la jumătate a concentrării de Na. Variată semnificativă a celor două concentrării în funcție de temperatura de tratament termic este dată de caracteristicile fizice ale celor două elemente chimice. Sodiul (Na, Z = 11) și magneziul (Mg, Z = 12) sunt metale vecine în prima perioadă a sistemului periodic al elementelor și sunt singurele elemente chimice identificate în analizele EDS a căror temperatură de fierbere este mai mică decât temperatura maximă la care au fost efectuate tratamentele termice (1200°C). În tabelul 4.1. se observă că în cazul Na scăderea concentrării este aproximativ constantă în intervalul 700 - 1000°C (~1% at. scădere a concentrării de Na pentru o creștere a temperaturii cu 100°C). Debutul acestei scăderi de concentratie coincide cu punctul de fierbere al Na,  $T_f = 880^\circ\text{C}$  [370]. Pentru temperaturi de tratament termic mai mari de 1000°C, concentrăria de Na se stabilizează în jurul valorii de 2%.

O variație similară, corelată cu caracteristicile fizice elementale, a fost observată și în cazul Mg, a cărui concentrație a scăzut mai lent, de la ~7 at.% la temperaturi de tratament de 700 - 800°C la ~5% la 1100°C. După tratamentul termic efectuat la 1200°C s-a observat o scădere bruscă a concentrației de Mg la 2 at.%, cu mai mult de jumătate față de cea înregistrată pentru temperatura de tratament anterioară. Fenomenul este explicat de atingerea punctului de fierbere al Mg ( $T_f = 1100^\circ\text{C}$  [370]) în timpul tratamentului termic.

Pe baza rezultatelor EDS prezentate în tabelul 4.1. s-a calculat raportul atomic Ca/P. Din compararea rezultatelor obținute reiese raportul Ca/P calculat crește odată cu creșterea temperaturii de tratament termic .

### c) Evaluarea colorimetrică a țesutului osos bovin tratat termic

Materialele ceramice sunt utilizate intens în stomatologie datorită aspectului excelent, care mimează aspectul dinților naturali; această caracteristică este explicată de abilitatea materialelor ceramice de a reflecta și a transmite lumina în mod adecvat. Unul dintre cele mai importante caracteristici care asigură un aspect natural al unei restaurări dentare este culoarea biomaterialului utilizat; în mod ideal, diferențele de nuanță sau de ton între culoarea biomaterialului și cea a dinților naturali ar trebui să fie imperceptibile pentru ochiul uman, indiferent de tipul de lumină din mediul înconjurător.

Culoarea este un fenomen psihobiofizic complex rezultat din interacțiunea luminii, prin intermediul lungimii sale de undă, cu ochiul uman. Așadar, factorul responsabil în mod real pentru percepția culorii este lumina. În lipsa luminii, ochiul uman percep doar întunericul (negrul). Lumina este o undă electromagnetică. Undele electomagnetic pot fi descompuse în funcție de lungimea de undă a componentelor lor, iar din descompunere rezultă un spectru electromagnetic. Regiunea din spectrul electromagnetic care poate fi percepută de ochiul uman este denumită „lumină vizibilă” și este caracterizată de o lungime de undă de 400 – 700 nm. În această regiune se regăsesc toate culorile percepute de ochiul uman. Culorile percepute de indivizi reprezintă amestecuri de unde electomagnetic cu diferite lungimi de undă, din spectrul luminii vizibile.

Observarea culorii unui obiect poate fi efectuată în mod vizual sau instrumental. În analiza vizuală, percepția culorii este un proces subiectiv, iar interpretarea sa depinde de individualitatea vizuală a observatorului. Dacă observatorul este un individ instruit pentru analiza culorilor, aceste poate sesiza diferențe subtile în caracteristicile culorilor. Cu toate acestea, percepția culorilor depinde de vîrstă observatorului, durata expunerii la culoare, oboselă și afecțiuni de vedere referitoare la percepția culorilor (ex. daltonismul).

În analiza instrumentală, percepția și înregistrarea culorilor este efectuată în mod obiectiv de către instrumente colorimetrice. Aceste instrumente analizează cantitățile de radiație verde, roșie și albastră reflectate prin filtre specializate și exprimă aceste cantități în funcție de parametrii  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  conform unui sistem standardizat dezvoltat de International Comission d'Eclairage (CIE).

Coordonatele CIE ( $L^*a^*b^*$ ) caracteristice probelor din țesut osos bovin tratat termic la temperaturi de 700 - 1200°C sunt prezentate în fig. 4.2:

- Coordonata  $L^*$  este o măsură a intensității culorii; valoarea sa variază între 0 (corespunzătoare culorii negre) și 100 (corespunzătoare culorii albe). Valorile  $L^*$  caracteristice pentru probele din țesut osos bovin tratat termic variază între 96 – 99, cu un maxim înregistrat pentru proba tratată termic la 900°C, indicând că probele au o culoare foarte apropiată de culoarea albă.
- Coordonata  $a^*$  indică poziția tridimensională a culorii obiectului în spațiul și direcția culorilor (fig. 4.3.);  $a^*$  poate varia între -90 și +70. Valorile pozitive indică o culoare care tinde spre roșu, iar valorile negative indică o culoare verde. Valorile negative ale lui  $a^*$  obținute pentru probele de țesut osos bovin indică o ușoară colorare în verde a probelor. Cu

toate acestea, valorile foarte apropiate de 0 sugerează că nuanța verde este imperceptibilă de către ochiul uman.

- Cordonata  $b^*$  indică, în mod similar cu  $a^*$ , orientarea culorii către galben (valori pozitive) sau albastru (valori negative);  $b^*$  poate varia între -80 și 100. Valorile caracteristice pentru probele din țesut osos bovin tratat termic (pozitive, apropiate de 0) indică o ușoară colorare în galben a probelor, cu un maxim înregistrat pentru proba tratată termic la 700°C. Valorile mici sugerează, ca și în cazul coordonatei  $a^*$ , că nuanța de galben este imperceptibilă de către ochiul uman

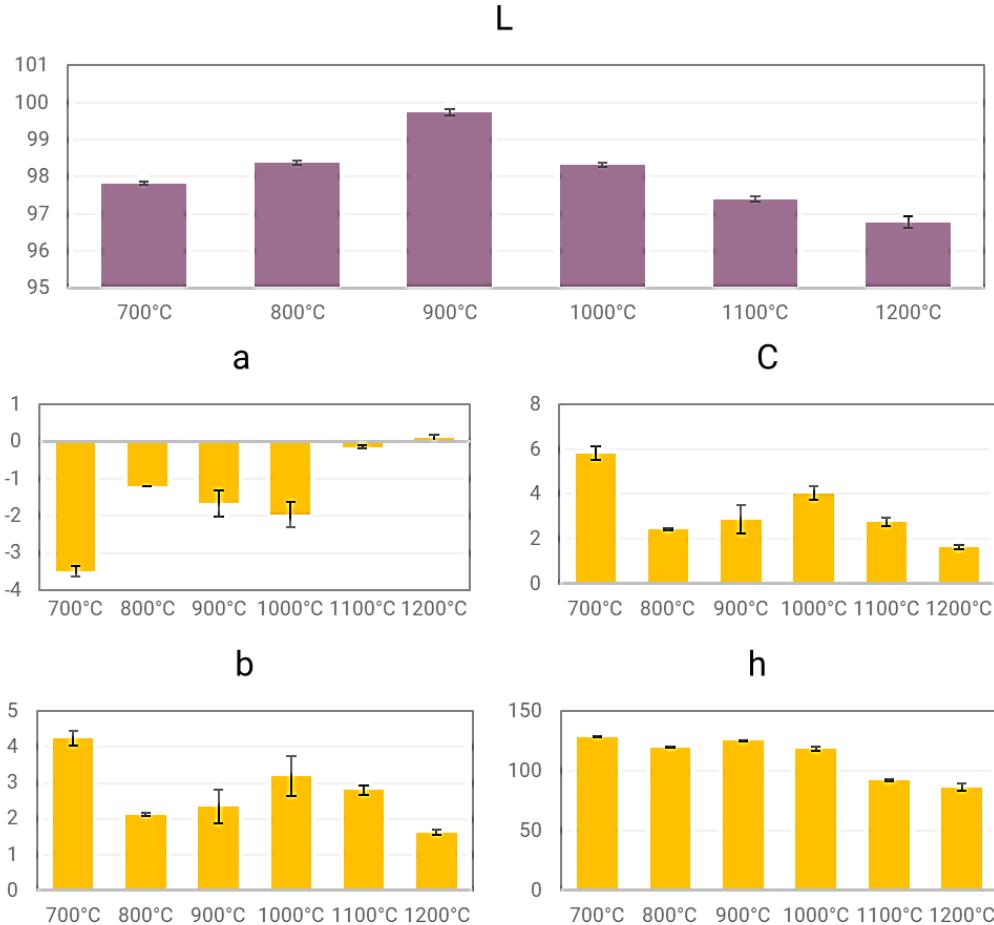


Figura 4.2. Variația coordonatelor CIE ( $L^*C^*h$ ) și ( $L^*a^*b^*$ ) pentru probele de țesut osos bovin tratate termic

- Cordonata  $h^*$  este o măsură a nuanței culorii (eng. *Hue*) și exprimă care este culoarea dominantă percepță de către instrument. Cordonata  $h^*$  depinde de coordonatele  $a^*$  și  $b^*$ , și reprezintă cotangentă unghiului format de acestea. Valorile  $h^*$  măsurate pentru țesutul osos bovin tratat termic (100 - 150) corespund culorii verzi. Intensitatea ridicată a culorii (valorile  $L^*$  mari) arată că această culoare este o nuanță de verde foarte apropiată de culoarea albă.
- Cordonata  $C^*$  este o măsură a saturăției culorii; cu cât o cluoare este mai deschisă cu atât saturăția să prezintă valori mai mici. În fig. 4.2., coordonata  $C^*$  prezintă valori foarte reduse ale saturăției (0 – 6), cu un maxim pentru probele tratate termic la 700°C.

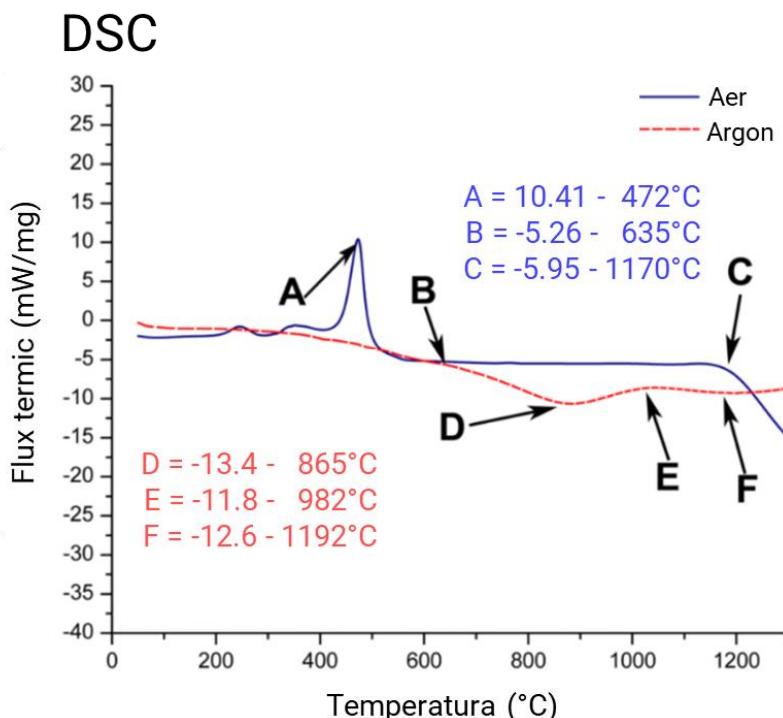
Rezultatele prezentate în fig. 4.2. sugerează că temperatura la care este efectuat tratamentul termic al țesutului osos bovin influențează culoarea materialului ceramic primar obținut. Pentru alegerea unei nuanțe adecvate din punct de vedere estetic valorile coordonatelor  $L^* a^*b^*C^*$  și  $h^*$  ale materialelor ceramic trebuie comparate cu valorile măsurate pe un material de referință (ex. dintele unui pacient).

#### 4.1.2. Influența mediului de tratament

Atmosfera în care are loc degradarea termică a țesuturilor dure contribuie la realizarea transferului de căldură și înlătură produșii și reactanții gazoși implicați în analiză. Întrucât influența mediului de tratament termic asupra degradării termice a țesutului animal poate fi evaluată prin intermediul metodelor de analiză termică [352, 371], în acest studiu, s-a urmărit evaluarea stabilității termice a țesutului osos bovin (prin analize DSC-TGA) la încălzirea în aer și argon în intervalul 25 - 1200°C. De asemenea, studiul a vizat identificarea principalelor modificări structurale (prin analize XRD) care au loc după încălzirea la 1000 - 1200°C în vederea identificării evenimentelor-cheie care să contribuie la elaborarea strategiilor de fabricare a unor produse cu compozitie fazică controlabilă.

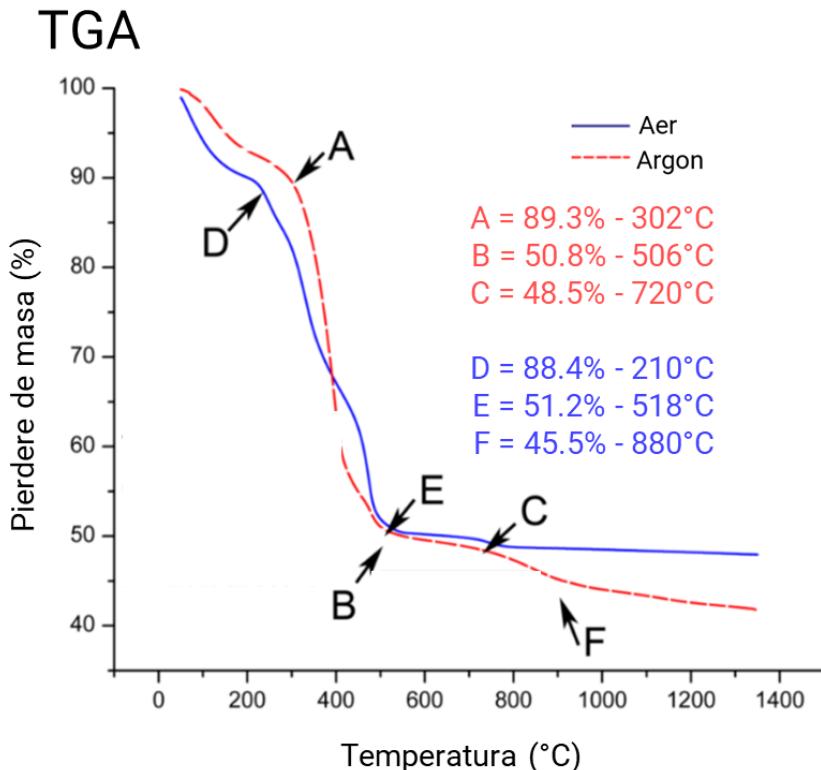
##### a) Stabilitatea termică a țesutului osos bovin

Rezultatele analizei DSC efectuate în timpul încălzirii în aer și prezentate în fig. 4.3. au permis identificarea unor evenimente termice caracteristice descompunerii țesutului osos bovin [5]. La încălzirea în aer au fost identificate: ● un eveniment ușor exoterm, la ~200°C, însoțit de o pierdere de masă de aproximativ 10%, corespunzătoare eliberării apei adsorbite la suprafața țesutului osos bovin; ● un eveniment puternic exoterm, între 400 - 500°C, însoțit de o pierdere de masă de aproximativ 30%, corespunzătoare degradării și combustiei componentei organice (predominant colagen de tip I) din țesutul osos; și ● un eveniment endoterm, la ~1200°C, fără pierdere de masă semnificativă, corespunzător descompunerii hidroxiapatitei de origine bovină în fosfat tricalcic. În intervalul 600 - 1200°C, rezultatele DSC se prezintă sub forma unui palier stabil, iar analiza termogravimetrică (fig. 4.4) a înregistrat o ușoară pierdere de masă, de ~2%; acestea corespund unor reorganizări structurale care au loc în componenta anorganică a țesutului osos (apatita biologică) după eliminarea completă a componentei organice [38, 56].



**Figura 4.3.** Evaluarea stabilității termice a țesutului osos bovin pentru evidențierea influenței mediului de tratament termic asupra transformărilor asociate procesării termice a ceramicelor derivate din surse naturale.

Variatia fluxului de căldură cu temperatura pentru os cortical, în aer și argon (10°C/min) [5].



**Figura 4.4.** Evaluarea stabilității termice a țesutului osos bovin pentru evidențierea influenței mediului de tratament termic asupra transformărilor asociate procesării termice a ceramicelor derivate din surse naturale.

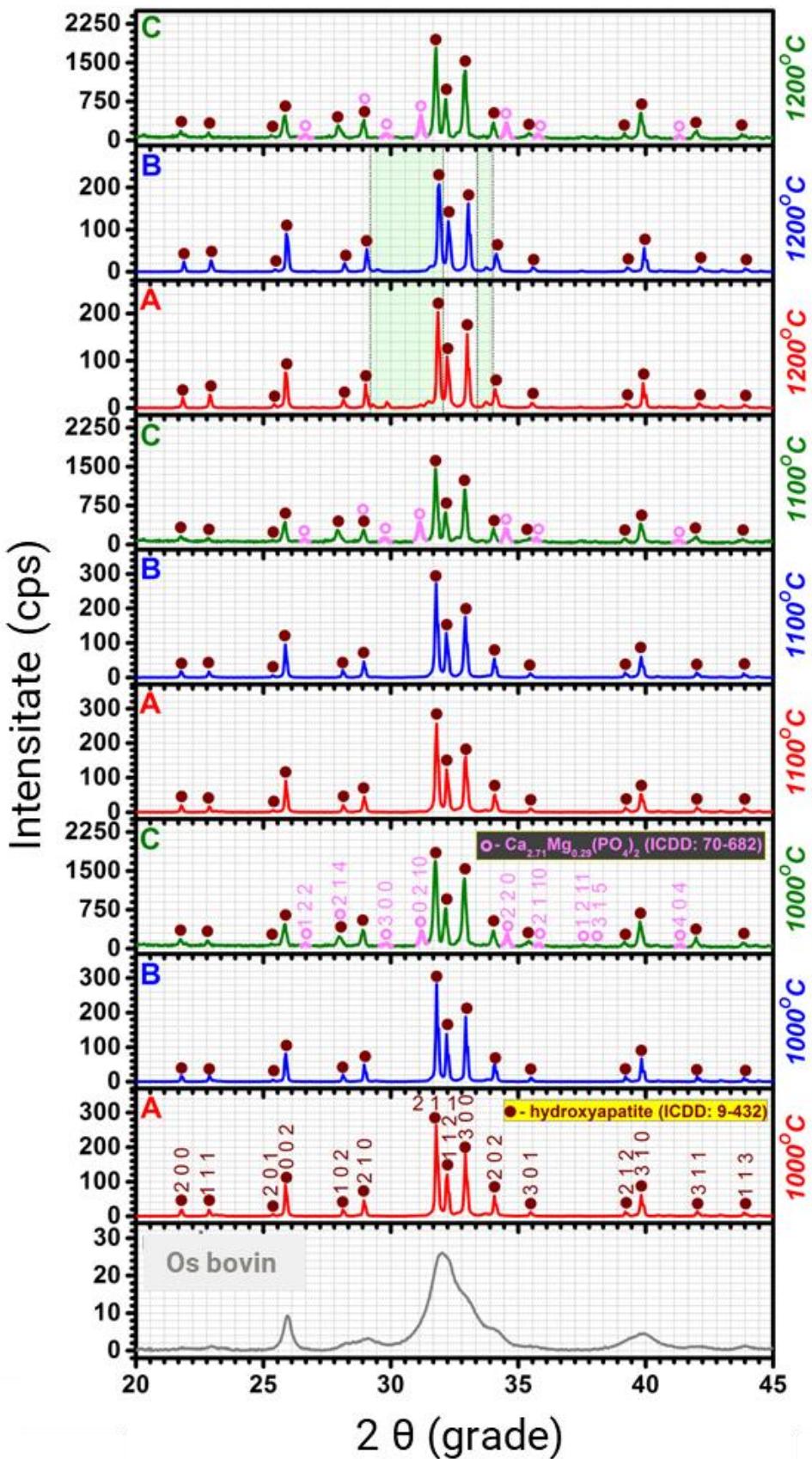
Variația pierderii de masă cu temperatura pentru os cortical, în aer și argon ( $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) [5].

Rezultatele din fig. 4.3. și fig. 4.4 pentru încălzirea în mediu inert (argon), sugerează că transformarea parțială a hidroxiapatitei în  $\beta$ -TCP este accelerată, un eveniment termic endoterm fiind identificat în intervalul  $850 - 1200^{\circ}\text{C}$ , cu un maxim exoterm apropiat de  $1000^{\circ}\text{C}$  și însoțit de o pierdere de masă de ~5%. Debutul unui alt eveniment termic poate fi identificat începând cu  $1200^{\circ}\text{C}$ , care sugerează transformarea  $\beta$ -TCP în alfa-fosfat tricalcic ( $\alpha$ -TCP) (care teoretic are loc la temperaturi de peste  $1125^{\circ}\text{C}$ ) [5].

### b) Structura cristalografică a țesutului osos bovin tratat termic

Evaluarea structurală a țesutului osos termic neprocesat și procesat termic este prezentată în fig. 4.5 [5]. O serie de rezultate raportate anterior în condiții similare [82] au arătat că descopunerea hidroxiapatitei de origine bovină nu are loc până la  $1200^{\circ}\text{C}$  atunci când tratamentul termic este efectuat în aer. Lipsa descompunerii poate fi atribuită variației structurale a osului, nivelelor diferite de hidratare și carbonatare, și dopării naturale cu specii precum Mg, Na sau Si, care depind de vârstă și specia animalului, precum și regiunea și dieta acestora.

Cu toate acestea, descompunerea hidroxiapatitei a fost facilitată atunci când tratamentele termice sunt efectuate în atmosferă inertă (i.e. argon). Vârfurile bine definite ale  $\beta$ -TCP (faza asemănătoare whitlockit, dopată cu ioni  $\text{Mg}^{2+}$  – ICDD: 001-070-0682) au fost identificate începând cu  $1000^{\circ}\text{C}$ , iar concentrația fazei crește progresiv odată cu creșterea temperaturii de tratament la  $1200^{\circ}\text{C}$ . Notabilă este și absența oxidului de calciu ( $\text{CaO}$ ) din structura materialului.



**Figura 4.5.** Comparație între structura țesutului osos termic tratat termic în argon sau aer, la temperaturi cuprinse în intervalul  $1000 - 1200^{\circ}\text{C}$ , față de țesutul osos bovin neprocesat. Analiza comparativă a relevanță diferențe sesizabile între probele tratate în medii diferite, sugerând posibilitatea formării de compuși bifazici HA/ $\beta$ -TCP la temperaturi mai joase dacă probele sunt tratate termic în mediu de argon [5].

Tratamentul termic la  $1200^{\circ}\text{C}$  a indus modificări structurale minore indiferent de mediul de răcire (aer sau apă cu gheăță): intensitatea vârfurilor din difractogramă a început să scadă, simultan cu apariția câtorva vârfuri imperceptibile în special în regiunea  $28 - 31^{\circ}$  (fig. 4.5). Aceste vârfuri nu pot fi identificate cu certitudine datorită structurii insuficient definite a fazelor (datorată dopării multiple). Calcitul, fosfatul de magneziu sau faze de tipul  $\text{CaMg}_2$  pot fi luate în considerare ca posibile faze [5].

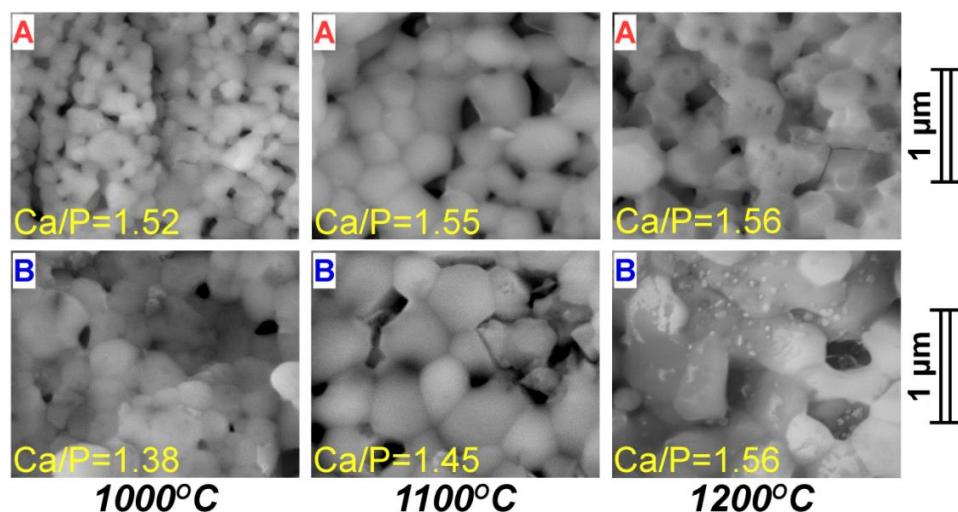
#### 4.1.3. Influența condițiilor de răcire

Modul de răcire este un parametru de tratament termic intens studiat în cazul materialelor metalice: este cunoscut, de exemplu, că răcirea lentă din timpul recoacerii contribuie la îmbunătățirea prelucrabilității oțelurilor, în vreme ce scopul răcirii rapide din timpul normalizării este redefinirea structurii grăunților și uniformizarea proprietăților mecanice ale aliajelor metalice. Călirea este un alt tratament termic care implică răcirea rapidă și este utilizat în industria oțelurilor pentru a durifica materialele. Mediul în care are loc călirea poate varia între aer, ulei sau apă [372]. Călirea materialelor ceramice este un subiect mai puțin abordat din punct de vedere al îmbunătățirii caracteristicilor de material, răcirea rapidă fiind utilizată în special în testarea rezistenței la soc termic a materialelor ceramice [373-376]. În cazul fosfaților de calciu obținuți prin tratament termic, controlul condițiilor de răcire poate contribui și la modificarea/ menținerea compoziției fazice a fosfaților de calciu: reacția de transformare a beta-fosfatului tricalcic ( $\beta\text{-TCP}$ ) în alfa-fosfat tricalcic ( $\alpha\text{-TCP}$ ) este reversibilă la răcire lentă. Păstrarea alfa-fosfatului tricalcic (resorbabil) în structura fosfaților de calciu procesați termic poate fi însă posibilă prin răcire rapidă [83].

Experimentele prezентate în acest capitol au vizat evaluarea influenței condițiilor de răcire (răcire lentă, în cuptor (aer) vs. răcire rapidă, în apă cu gheăță) asupra caracteristicilor morfologice ale țesutului osos bovin tratat termic și a grupărilor funcționale prezente în structura acestuia.

##### a) Morfologia țesutului osos bovin tratat termic

Încălzirea la  $1000^{\circ}\text{C}$  a dus la apariția cristalelor de hidroxiapatită cu morfologie granulară și la obținerea unei arhitecturi poroase (fig. 4.6) [5], rezultate în urma degradării termice și a eliminării componentei organice a țesutului osos bovin.



**Figura 4.6.** Morfologia țesutului termic procesat la temperaturi înalte și răcit în condiții diferite: răcirea rapidă în apă cu gheăță (B) a dus la o densificare mai accentuată a microstructurii, pentru toate temperaturile de tratament [5]

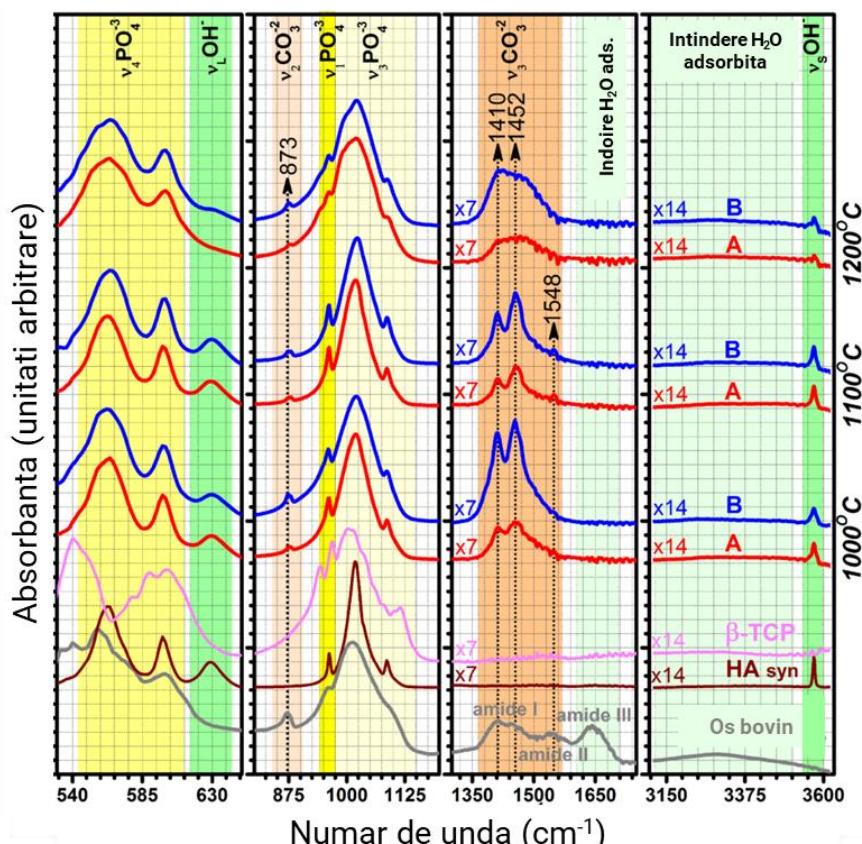
Aspecte similare ale microstructurii și porozității componentei minerale au fost raportate anterior pentru probe din țesut osos după tratamentul termic efectuat în intervalul 900

- 1050°C urmat de răcire în aer [39, 74, 377, 378]. Creșterea temperaturii de tratament la 1100 și 1200°C a dus la diminuarea porozității, concomitent cu creșterea dimensiunilor grăunților.

Aspectul morfologic al probelor de țesut osos bovin sugerează că densificarea microstructurii este accentuată la răcirea în apă. Analiza compozițională efectuată cu ajutorul EDS a relevat scăderea raportului Ca/P calculat pentru țesuturile dure tratate termic la temperaturi cuprinse între 1100 - 1200°C odată cu răcirea în apă cu gheață. Rezultatele indică accelerarea unor modificări morfologice la răcirea rapidă a țesutului dur tratat termic, care ar putea contribui la eficientizarea procesării fosfaților de calciu derivați din surse naturale [5].

### b) Prezența grupărilor funcționale în țesutul osos bovin tratat termic

Spectrul FT-IR al țesutului osos bovin neprocesat termic (fig. 4.7 [5]) este alcătuit dintr-o manta complicată în care se regăsesc benzile de vibrație ale grupărilor structurale caracteristice colagenului și hidroxiapatitei [361]. Banda largă și fără adâncime din domeniul 3700 – 3500 cm<sup>-1</sup> este generată de vibrațiile de alungire ale moleculelor de apă menținute în material prin legături de hidrogen. Benzile de absorbție caracteristice grupărilor funcționale de tip amidă I (în domeniul 1700 – 1600 cm<sup>-1</sup>), amidă II (în domeniul 1550 – 1500 cm<sup>-1</sup>) și amidă III (în domeniul 1300 – 1100 cm<sup>-1</sup>) din collagen sunt suprapuse peste benzile vibrațiilor de îndoire v<sub>2</sub> (~1640 cm<sup>-1</sup>) ale moleculelor de apă și peste vibrațiile de îndoire v<sub>3</sub> ale grupărilor carbonat. Benzile caracteristice apatitelor – vibrații de întindere și de alungire ale grupărilor fosfat – apar sub formă de vârfuri largi, indicație a structurii slab cristalizate a osului.



**Figura 4.7.** Arhitectura grupărilor funcționale din țesutul osos tratat termic în intervalul 1000 - 1200°C.

Evaluarea comparativă a spectrelor FT-IR a relevat modificări ale intensității vârfurilor caracteristice, cauzate de modificarea condițiilor de răcire (răcire lentă în aer – A vs. răcire rapidă în apă cu gheață – B) [5].

Analiza spectrelor IR ale materialelor obținute prin procesarea termică a osului sunt prezentate în fig. 4.7 [5] în patru regiuni, două dintre acestea localizate în regiunea de amprentă (650–530 cm<sup>-1</sup>: îndoirea v<sub>4</sub> a grupărilor fosfat și librația grupărilor hidroxil din structura materialului, și 1200 – 800 cm<sup>-1</sup>: îndoirea v<sub>2</sub> a grupărilor carbonat, îndoirea simetrică v<sub>1</sub> și

asimetrică  $v_3$  a grupărilor fosfat) și celelalte două în regiunea grupărilor funcționale ( $1750 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ : alungirea  $v_3$  a grupărilor carbonat și  $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ : vibrațiile de alungire ale moleculelor de apă adsorbită și ale grupărilor hidroxil din structura materialului) [379-381]. Probele de os tratate termic la  $1000^\circ\text{C}$  prezintă toate benzile de vibrație prezente în materialul de referință din hidroxiapatită sintetică pură. Pozițiile alungirii  $v_3$  a grupărilor carbonat (localizate la  $1140 \text{ cm}^{-1}$  și  $1452 \text{ cm}^{-1}$ ) denotă prevalența carbonatării de tip B, în care grupările  $(\text{CO}_3)^{2-}$  substituie grupările  $(\text{PO}_4)^{3-}$  din structura hidroxiapatitei. Banda fără adâncime a alungirii  $v_3$  a grupărilor carbonat localizată  $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$  arată că în material are loc într-o mai mică măsură și carbonatarea de tip A (în care grupările  $(\text{CO}_3)^{2-}$  substituie grupările  $(\text{OH})^-$  din structura hidroxiapatitei)[381].

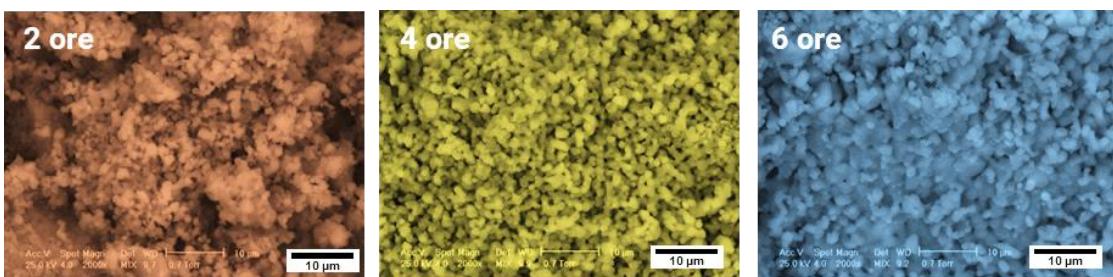
În acord cu observațiile XRD, creșterea temperaturii de tratament la  $1100^\circ\text{C}$  nu induce modificări semnificative în spectrele FT-IR. Singura mențiune notabilă este diminuarea intensității benzilor caracteristice carbonatării de tip B, acompaniată de o ușoară creștere a celor de tip A. Benzile ascuțite și bine definite aparținând vibrațiilor grupărilor fosfat și carbonat confirmă un grad mai ridicat de cristalizare a materialului. La  $1200^\circ\text{C}$  au loc schimbări majore. Intensitatea benzilor IR (vibrații de librație și de alungire) aferente grupărilor hidroxil din structura materialului sunt diminuate drastic. Aspectul benzii duble corespunzătoare vibrațiilor de alungire  $v_3$  a grupărilor carbonat este modificat radical, ceea ce sugerează modificarea mediului chimic al acestor grupări funcționale. Aceste rezultate completează rezultatele XRD menționate anterior, care au arătat că modificările structurale sunt în plină desfășurare la  $1200^\circ\text{C}$ . Rezultate raportate anterior [83] au sugerat că descompunerea hidroxiapatitei ca urmare a procesării termice este generată în principal de deshidratarea indusă de creșterea graduală a temperaturii de procesare.

#### 4.1.4. Influența duratei de menținere

##### a) Morfologia țesutului osos bovin tratat termic

Aspectul morfologic al țesutului osos bovin tratat termic la  $1000^\circ\text{C}$  pentru diferite perioade de menținere (2 – 6 ore) este prezentat în fig. 4.8. Proba tratată termic timp de 2 ore prezintă o microstructură alcătuită din microparticule ceramice care alcătuiesc un material compact, cu proi de mici dimensiuni formați în urma degradării componentei organice a țesutului osos bovin, dar și pori de dimensiuni mai mari, dispuși aleator.

Extinderea tratamentului termic la 4 ore (fig. 4.8) a dus la o dispunere mai uniformă a particulelor ceramice în microstructura materialului. Porii de mici dimensiuni sunt prezenti în întreaga microstructură a materialului, însă fără golurile și aglomerările de particule observate în microstructura probei tratate timp de 2 ore.



**Figura 4.8.** Influența duratei de menținere asupra microstructurii țesutului osos bovin tratat termic [382]

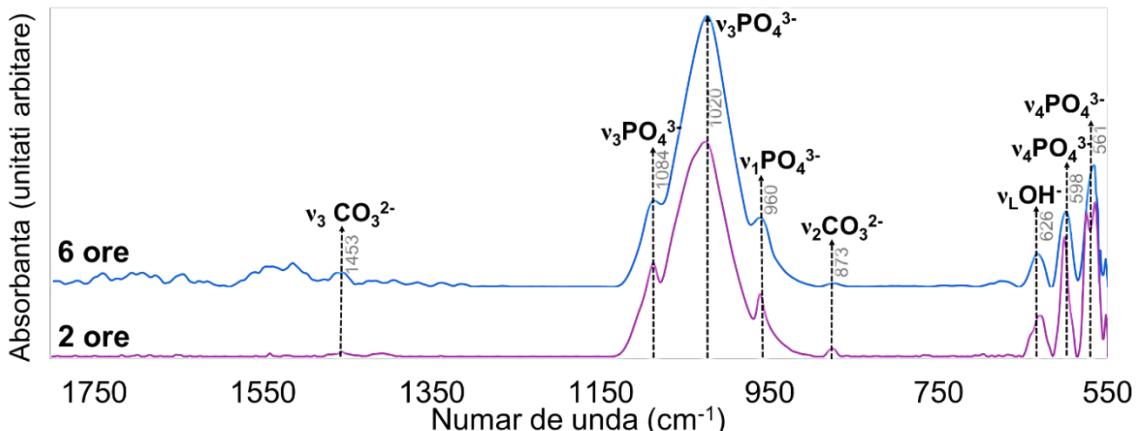
Efectuarea tratamentului termic pentru 6 ore a dus la obținerea unei microstructuri în care se pot observa efectele proceselor de densificare și difuzie. Acestea au dus la creșterea dimensiunii particulelor și unirea lor, cu diminuarea porozității materialului. Prezența porilor în zona superioară a fig. 4.8 – 6 ore sugerează că procesele de densificare și difuzie pot fi continuante prin extinderea duratei de menținere.

### b) Prezența grupărilor funcționale în țesutul osos bovin tratat termic

Influența variației durației de menținere asupra prezenței grupărilor funcționale din ceramicile derivate din țesut osos tratat termic a fost studiată prin compararea spectrelor FT-IR ale probelor de os bovin tratate termic la 1000°C timp de 2, respectiv 6 ore (fig. 4.9). Spectrele FT-IR sunt caracteristice pentru hidroxiapatita preparată din țesut osos bovin [5, 85, 381]. În fig. 4.9 și în Tabelul 4.2 sunt marcate și descrise vârfurile reprezentative, corespunzătoare grupărilor fosfat (îndoire  $v_4$  la  $561\text{-}598\text{ cm}^{-1}$ , întindere simetrică  $v_1$  la  $960\text{ cm}^{-1}$  și întindere asimetrică  $v_3$  la  $1020\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$ ), și hidroxil (librație la  $626\text{ cm}^{-1}$ ). Prezența vârfurilor caracteristice vibrațiilor grupărilor carbonat (îndoire simetrică  $v_2$  la  $870\text{ cm}^{-1}$  și întindere asimetrică  $v_3$  la  $1453\text{ cm}^{-1}$ ) confirmă ușoara carbonatare a materialului.

**Tabel 4. 2.** Atribuirea benzilor FT-IR în probele de țesut osos bovin tratat termic pentru 2 – 6 ore

Pozitie (cm <sup>-1</sup> )	Atribuirea benzii [381, 383, 384]
<b>561, 598</b>	Îndoire $v_4$ a grupărilor ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
<b>626</b>	Librație a grupărilor ( $\text{OH}^{-1}$ )
<b>873</b>	Îndoire simetrică $v_2$ a grupărilor ( $\text{CO}_3^{2-}$ )
<b>960</b>	Întindere simetrică $v_1$ a grupărilor ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
<b>1020, 1084</b>	Întindere asimetrică $v_3$ a grupărilor ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
<b>1453</b>	Întindere asimetrică $v_3$ a grupărilor ( $\text{CO}_3^{2-}$ )

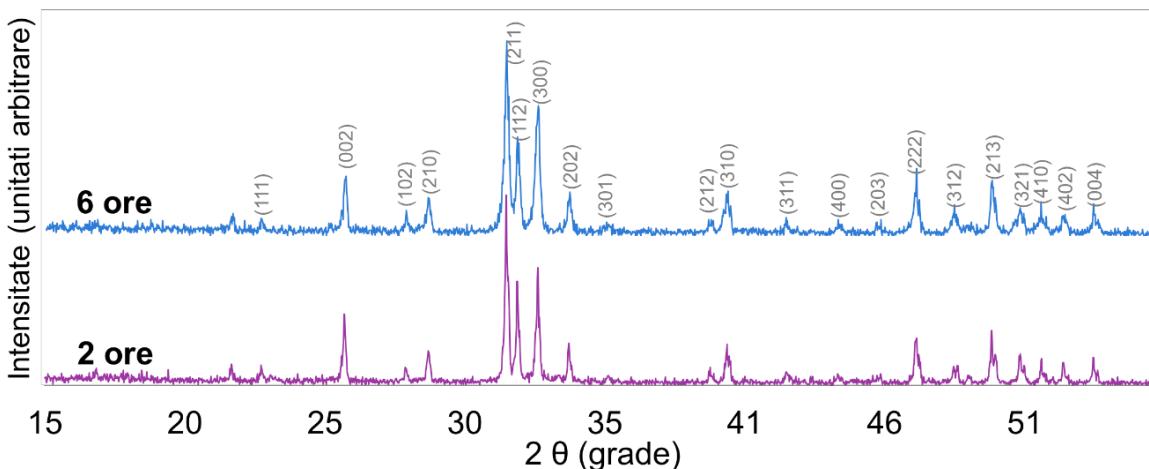


**Figura 4. 9.** Modificări ale arhitecturii grupărilor funcționale din țesutul osos bovin tratat termic la 1000°C, pentru diferite dure de menținere [382]

Extinderea durei de menținere nu a indus modificări semnificative în arhitectura grupărilor funcționale din țesutul osos bovin tratat termic, cu excepția unor modificări ale intensității vârfurilor caracteristice grupărilor fosfat: proba tratată termic pentru 6 ore a prezentat vârfuri caracteristice întinderii asimetrice  $v_3$  a grupărilor ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ( $1020\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$ ) cu o intensitate mai mare comparativ cu proba tratată termic pentru 2 ore, însă intensitatea vârfurilor caracteristice îndoirii  $v_4$  a acelorași grupări ( $560\text{-}590\text{ cm}^{-1}$ ) s-au diminuat după menținerea îndelungată. Modificări minore apar și în zona grupărilor ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) care indică o modificare a mediului chimic al acestor grupări după tratamentul termic efectuat timp de 6 ore.

### c) Structura cristalografică a țesutului osos bovin tratat termic

În acord cu observațiile FT-IR, investigațiile XRD efectuate pe probe din țesut osos bovin tratat termic pentru 2 – 6 ore (fig. 4.10) au arătat că, deși materialul își păstrează structura chiar și la dure de menținere de 6 ore (difractogramele sunt caracteristice pentru hidroxiapatită), tratamentul termic îndelungat induce ușoare modificări. În fig. 4.10 se observă cum extinderea duratei de menținere a dus la diminuarea intensității vârfurilor caracteristice planelor atomice (002), (211) și (300), concomitent cu creșterea intensității vârfurilor caracteristice planelor (311), (400), (203) și (312).



**Figura 4. 10.** Difractogramme reprezentative pentru țesutul osos bovin tratat termic la 1000°C, pentru diferite dure de menținere [382]

Modificările relevante de analizele SEM, FT-IR și XRD din acest subcapitol, observate și în analizele probelor tratate termic la diferite temperaturi sugerează că extinderea duratei de menținere poate induce modificări morfologice și structurale ale țesutului osos termic similare cu cele induse de creșterea temperaturii de tratament termic.

#### 4.1.5. Concluzii

Acest studiu a vizat evaluarea influenței principalelor parametri de tratament termic (temperatura de tratament, mediul în care are loc încălzirea, durata de menținere și condițiile de răcire) asupra caracteristicilor morfologice, compoziționale și structurale ale materialelor ceramic primare derive din țesut osos bovin. Cele mai importante observații rezultate în urma evaluării sunt:

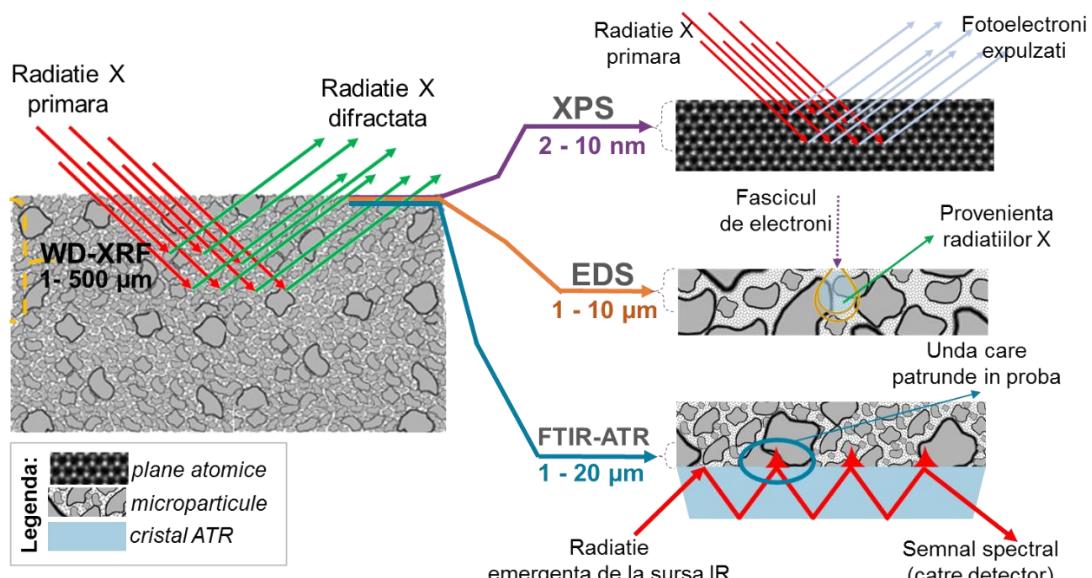
- Variația temperaturii de tratament a indus modificări semnificative ale morfologiei ceramicelor primare derive din țesut osos bovin;
- Raportul atomic Ca/P a variat direct proporțional cu temperatura la care are loc tratamentul termic; creșterea acestuia este datorată scăderii concentrației de elemente minore (Na și Mg) la temperaturi de tratament ridicate;
- Încălzirea în mediul inert (argon) a accelerat degradarea parțială a HA în  $\beta$ -TCP; acest fenomen poate fi controlat pentru obținerea de produse pe bază de fosfați de calciu bifazici;
- Accelerarea răcirii (în apă cu gheătă) și prelungirea durei de menținere au dus la accelerarea densificării microstructurii fără a induce modificări structurale semnificative.

## 4.2. Evaluarea caracteristicilor din volum și de suprafață ale pulberilor ceramice cu diferite dimensiuni ale particulelor obținute din țesut osos bovin tratat termic

Acest studiu combină metodele de analiză morfo-compozițională bulk (XRF, SEM-EDS, FT-IR) cu metode de analiză a suprafețelor (XPS, măsurarea unghiului de contact) pentru a corela caracteristicile morfologice, compozitionale și de suprafață a pulberilor de hidroxiapatită derivate din țesut osos bovin, cu diferite dimensiuni ale particulelor, în vederea utilizării acestora în aplicații medicale [347].

În prezent, un număr vast de studii ale fosfațiilor de calciu cuprind în programul lor experimental cel puțin o metodă de analiză compozitională. În cazul hidroxiapatitei, caracterizarea compozitională este efectuată preponderent prin metode de analiză în volum; analiza compozitionei suprafeței este efectuată în special pe filme subțiri depuse prin diferite metode [187]. Rareori, analiza compozitională este efectuată prin corelarea mai multor metode de analiză. În cazul hidroxiapatitei, Zeng et al. au corelat compozitiona filmelor subțiri de fosfați de calciu, analizată prin XPS, EDS și FT-IR, pentru a evalua parametrii de procesare ai depunerilor PLD [385]. De asemenea, Kleine-Boynemann et al. au corelat rezultatele EDS, XPS și ToF-SIMS pentru a dezvolta un protocol de diferențiere a fosfațiilor de calciu biocompatibili [386]; studiul reprezintă o completare la studiile XPS și ToF-SIMS efectuate anterior de Lu et. al. [387] și Chusuei et. al. [388].

Studiul experimental prezentat în acest capitol a vizat corelarea compozitionei chimice a pulberilor de la suprafață către volumul particulelor. Acest obiectiv a fost îndeplinit prin utilizarea de metode spectrale cu diferite adâncimi de analiză (Fig. 4.11).



**Figura 4. 11.** Reprezentare grafică a adâncimii la care au loc interacțiunile dintre radiația incidentă și probă în metodele de analiză XRF, EDS, FT-IR și XPS [347].

Clasificarea metodelor de analiză în metode de suprafață și metode pentru bulk depinde în mare măsură de adâncimea de analiză, adică adâncimea din care se obține semnalul analitic prelucrat pentru obținerea rezultatelor.

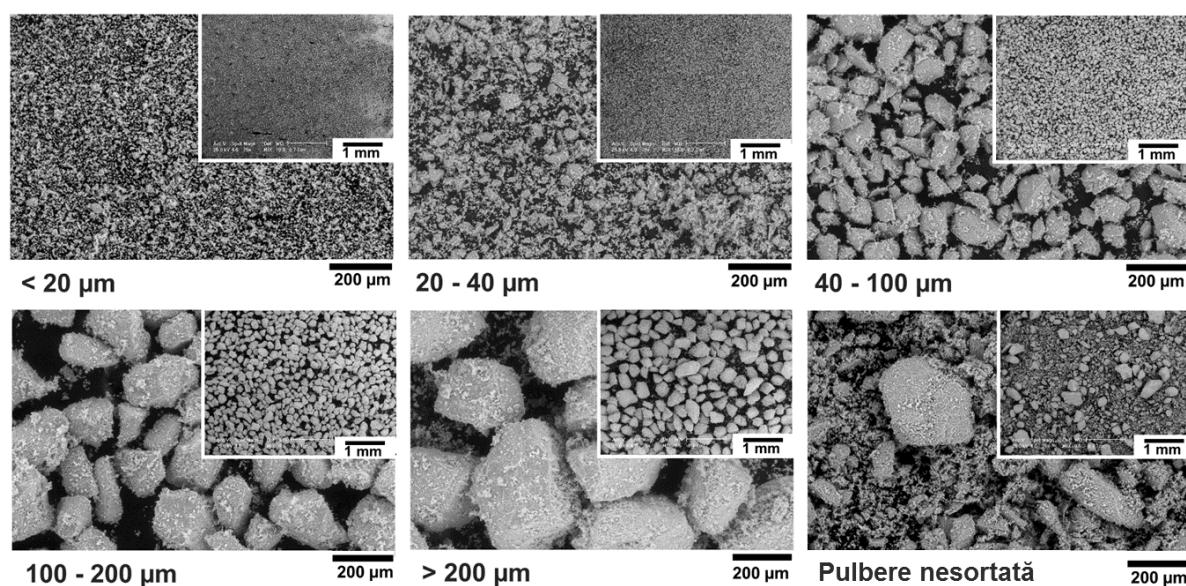
- În **XPS** radiația X incidentă penetrează aproximativ 1 μm din probă, dar informația analitică provine dintr-o adâncime a suprafeței de 10 - 100 Å (top 20 atomic layers). Adâncimea de analiză a XPS este calculată de software-ul instrumentului.

- În EDS, adâncimea de analiză (volumul de interacție) depinde de speciile atomice analizate; aceasta crește cu micșorarea numărului atomic și ajunge la 1 - 10  $\mu\text{m}$ , în funcție de tensiunea de accelerare a fasciculului de electroni, de compoziția chimică a probei și de morfologia suprafeței. Adâncimea de analiză a EDS fost aproximată cu Electron Flight Simulation software.
- FTIR-ATR procesează semnal analitic provenit dintr-o adâncime de 1 - 20 micrometri în funcție de lungimea de undă a radiației incidente, de indicele de refracție al cristalului ATR, de unghiul de incidență al radiației și de raportul dintre indicii de refracție ai probei și ai cristalului. Adâncimea de analiză a FT-IR se determină cu Harrick approximation.
- În analiza XRF, radiația X incidentă penetreză 1 – 500  $\mu\text{m}$  din grosimea probei, în funcție de unghiul de incidență al fascicului primar și de coeficientul de absorbție al elementelor (cu cât elementele sunt mai grele, cu atât atenuarea intensității radiației este mai mare - și adâncimea de analiză este mai mare). Ca și în cazul XPS, adâncimea de analiză a XRF este calculată de software-ul instrumentului.

Codul fiecărei probe reprezintă dimensiunea particulelor de pulbere din aceasta, exprimată ca interval. Dimensiunile particulelor probelor sunt date de dimensiunea ochiurilor sitelor utilizate pentru sortarea granulometrică

#### 4.2.1. Morfologia pulberilor de hidroxiapatită

Atât dimensiunea cât și forma particulelor influențează procesele de fabricare a produselor ceramice. În sinterizarea convențională, dimensiunea particulelor contribuie la definirea porozității și dimensiunii grăunților din produsul ceramic. și metodele de fabricație aditivă bazată pe pulberi sunt influențate de dimensiunea și de forma particulelor de pulbere precursoare; s-a raportat că acestea influențează acuratețea dimensională a produselor printate și reologia pastelor ceramice utilizate ca „cerneală” în metodele de tip robocasting [212]. Pe lângă acestea, dimensiunea particulelor mai influențează performanțele biologice ale hidroxiapatitei [182], capacitatea de adjuvare a acesteia în vaccinuri [389] sau cinetica eliberării de medicament din particulele transportoare [390].



**Figura 4. 12.** Morfologia pulberilor de țesut osos bovin tratat termic după măcinare și sortare granulometrică [347].

Fig. 4.12 cuprinde imagini reprezentative pentru aspectul morfologic al probelor sortate granulometric. Fiecare dintre probele analizate prezintă o distribuție dimensională uniformă a particulelor, fără aglomerări. Toate sorturile dimensionale investigate sunt formate din particule cu forme cvasi-fațetă complexe, cu un număr variabil de fațete care se intersectează prin muchii rotunjite. Morfoloziile submicronice ale suprafețelor prezintă pori, crevase și muchii tăietoare. Proba de referință, prelevată anterior sortării granulometrice conține particule de dimensiuni diferite, cu forme neregulate și colțuri rotunjite [347].

#### **4.2.2. Compoziția chimică a pulberilor ceramice – compararea și corelarea datelor obținute din suprafață și volum**

##### **a) Adâncimea de analiză: 1-10 nm. Rezultate XPS**

În Tabelul 4.3. sunt prezentate rezultatele analizei XPS efectuate pe pulberile de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni ale particulelor, în comparație cu valoarea de referință obținută din analiza unei probe de hidroxiapatită nesortată granulometric. Analiza a identificat O, C, Ca și P ca elemente principale în compoziția materialelor ceramice, precum și cantități mai mici de Mg și Na ca elemente minore, în acord cu rezultate din studii similare.

Rezultatele analitice în acest caz provin dintr-o profunzime în suprafață cuprinsă în domeniul 2-10 nm [180]. Variația dimensiunii particulelor în domeniul micrometric nu a indus variații în rezultatele XPS.

Pozițiile vârfurilor aferente carbonului s-au situat în apropierea valorii de 285 eV [391] ceea ce arată că o mare parte a carbonului prezent la suprafață probei este datorat de contaminarea naturală a probelor cu hidrocarburi (eng. *adventitious carbon*) [387]. Caracterul aleatoriu al adsorbției acestor hidrocarburi explică și variabilitatea concentrației de carbon, care a prezentat cele mai mari abateri standard. Spectrele XPS nu au prezentat semnale aferente carbonului din grupări carbonat, caracteristice pentru hidroxiapatita de origine bovină.

**Tabel 4. 3.** Compoziția chimică a suprafeței particulelor de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni. Rezultate XPS exprimate în procente atomice și raportul Ca/P calculat pe baza acestora [347].

Element	Dimensiunea particulelor					Valoare de referință Pulbere nesortată
	< 20 μm	20 - 40 μm	40 - 100 μm	100 - 200 μm	< 200 μm	
O 1s	45.9 ± 0.7	44.3 ± 0.7	44.7 ± 1.0	45.0 ± 0.9	43.7 ± 0.7	44.7 ± 1.2
C 1s	17.4 ± 1.3	20.5 ± 1.8	19.6 ± 2.0	21.0 ± 2.4	19.6 ± 0.5	20.4 ± 2.4
Ca 2p	13.5 ± 0.1	13.2 ± 0.1	13.9 ± 0.6	13.5 ± 0.1	13.4 ± 0.2	13.8 ± 0.4
P 2p	9.7 ± 0.4	9.8 ± 0.9	9.6 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.0 ± 0.9	10.5 ± 0.1
Mg 1s	7.3 ± 0.5	7.2 ± 0.2	7.1 ± 0.4	7.8 ± 1.3	7.6 ± 0.4	7.6 ± 0.6
Na 1s	5.3 ± 0.2	5.0 ± 0.3	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.5	5.1 ± 0.4
Ca/P	<b>1.39</b>	<b>1.35</b>	<b>1.42</b>	<b>1.32</b>	<b>1.34</b>	<b>1.31</b>

Raportul Ca/P calculat direct din rezultatele XPS variază între 1.31 – 1.42 . Aceste valori sunt apropriate de rezultate raportate anterior pentru probe din țesut osos tratat termic [387]. Cu toate acestea, mai mulți autori [386-388], atrag atenția asupra subevaluării raportului Ca/P calculat din rezultate XPS: pentru analiza unor materiale de referință din hidroxiapatită, cu Ca/P = 1.67 s-au calculat din rezultate XPS Ca/P = 1.48, respectiv Ca/P = 1.59 [387, 388].

##### **b) Adâncimea de analiză: 1-20 μm. Rezultate FTIR-ATR**

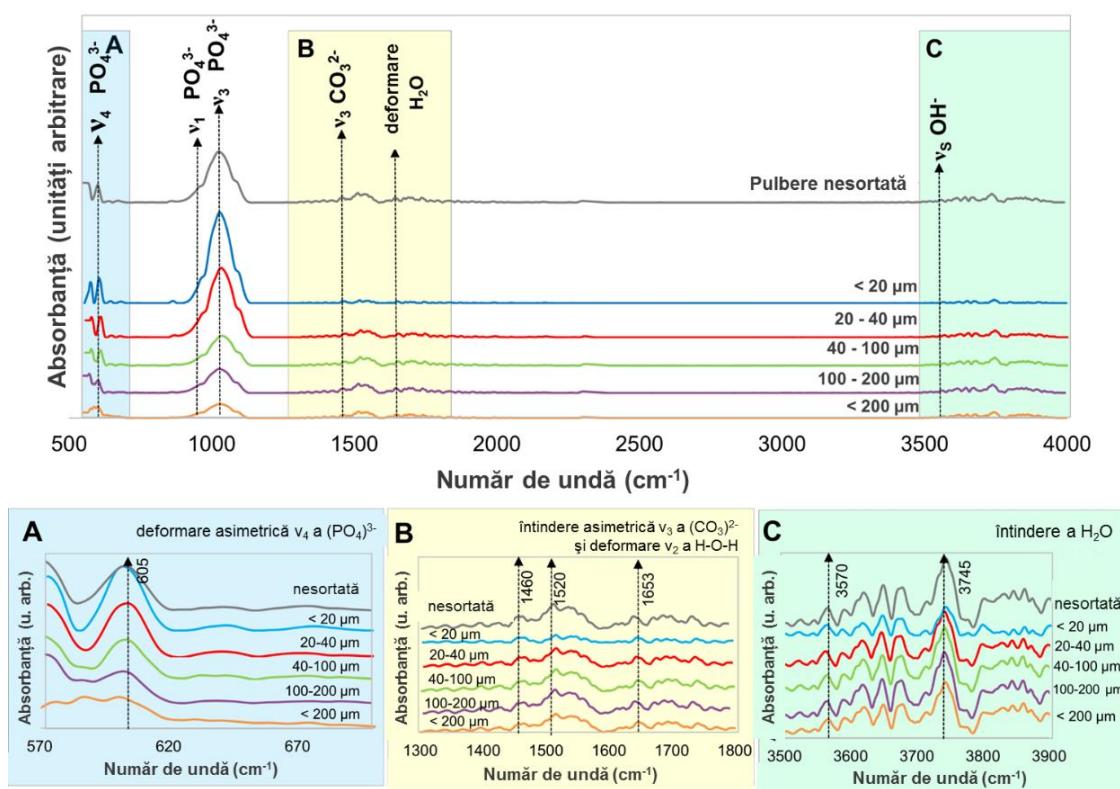
Prezența grupărilor funcționale din pulberile de hidroxiapatotă este prezentată în spectrul principal FT-IR – ATR (fig. 4.13). Vârfurile corespunzătoare vibrațiilor grupărilor ortofosfat au fost identificate la: at ~600 cm<sup>-1</sup> (îndoire v<sub>4</sub>), ~960 cm<sup>-1</sup> (alungire simetrică v<sub>1</sub>), 1000 – 1090 cm<sup>-1</sup> (alungire asimetrică v<sub>3</sub>). Deși analiza XPS nu a identificat vârfuri caracteristice grupărilor carbonat la suprafața materialelor, două vârfuri cu intensitate redusă au fost identificate la 1460 cm<sup>-1</sup> and 1520 cm<sup>-1</sup>; acestea corespund alungirii asimetrice v<sub>3</sub> a

grupărilor ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) și indică o ușoară carbonatare a materialului, tipică pentru apatitele derive din țesut osos bovin [381, 383, 384]. Vârfuri caracteristice hidroxiapatitei au fost înregistrate și la  $\sim 1653 \text{ cm}^{-1}$ , corespunzătoare deformării moleculelor de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Tabel 4. 4.** Atribuirea benzilor FT-IR în probele de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni ale particulelor

Pozitie ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuirea benzii
<b>605</b>	Îndoire $v_4$ a grupărilor ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) [381, 383, 384]
<b>962</b>	Întindere simetrică $v_1$ a grupărilor ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) [381, 383, 384]
<b>1010, 1090</b>	Întindere asimetrică $v_3$ a grupărilor ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) [381, 383, 384]
<b>1460, 1520</b>	Întindere asimetrică $v_3$ a grupărilor ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) [381, 383, 384]
<b>1653</b>	Îndoire a moleculelor de apă [381, 383, 384]
<b>3570</b>	Întindere a grupărilor ( $\text{OH}^-$ ) structurale [381, 383, 384]

Cele mai importante modificări ale spectrelor induse de dimensiunea particulelor au fost observate pentru vârfurile înregistrate la  $1000 - 1090 \text{ cm}^{-1}$ . Intensitatea acestor vârfuri crește odată cu scăderea dimensiunii particulelor. Modificările spectrelor dependente de dimensiunea particulelor sunt prezentate în detaliile A, B și C din fig. 4.13. Scăderea dimensiunii particulelor de hidroxiapatită a fost asociată cu o scădere a intensității vârfurilor caracteristice grupărilor fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) concomitent cu creșterea intensității vârfurilor caracteristice ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) și ( $\text{OH}^-$ ). Modificări notabile în spectrul IR au fost observate pentru probele cu particule mai mici de  $40 \mu\text{m}$  (probele cu particule cu dimensiuni  $< 20 \mu\text{m}$  și  $20-40 \mu\text{m}$  au fost caracterizate de spectre IR similare)



**Figura 4. 13.** Prezența grupărilor funcționale în pulberile de hidroxiapatită bovină cu diferite dimensiuni de particulă [347]

Principalii factori de influență care pot fi considerați la evaluarea modificărilor din spectrele IR sunt dimensiunea particulelor, adâncimea de analiză a metodei și lungimea de undă a radiației IR incidente. Dimensiunea particulelor este o cauză comună a modificărilor

din spectrele IR. În analiza prin transmisie, dimensiunea particulelor recomandată pentru obținerea unor spectre IR de calitate este 2-10  $\mu\text{m}$  [31]; progresele tehnologice permit în prezent și analiza particulelor cu dimensiuni mai mari, echipamentele moderne furnizând rezultate de calitate satisfăcătoare.

Și modul de analiză cu reflectanță totală atenuată (ATR) este însotit de erori induse de dimensiunea particulelor. În FT-IR ATR, s-a raportat că lărgimea, intensitatea și aria benzilor din spectrele mai multor substanțe minerale (cuart, feldspat, calcit și dolomit) prezintă o dependență explicită de dimensiunea particulelor din probe. A mai fost observat că intensitatea și aria benzilor IR scade, iar lărgimea acestora crește odată cu creșterea dimensiunii particulelor. Același studiu a conchis că, deși intensitatea crește odată cu creșterea dimensiunii particulelor, probele cu particule foarte mici vor duce la diminuări ale intensității vârfurilor datorită lungimii de undă și adâncimii de analiză ale radiației IR. Această observație este aplicabilă pentru evaluarea rezultatelor obținute pe proba nesortată din acest studiu (fig. 4.13) care prezintă un spectru IR asemănător cu cele ale probelor cu particule de dimensiuni mari datorită unei posibile subestimări a particulelor de dimensiuni mici [347].

### c) Adâncimea de analiză: 1-10 $\mu\text{m}$ . Rezultate EDS

Rezultatele EDS obținute pentru pulberile ceramice cu diferite dimensiuni ale particulelor sunt prezentate în Tabelul 4.5. Similar analizei efectuate prin XPS, rezultatele au relevat prezența elementelor O, C, Ca și P drept componente majore, și Mg și Na (caracteristice hidroxiapatitei obținute din osos bovin) drept componente minoritare. Raportul Ca/P calculat direct din rezultatele EDS variază între 1.56 – 1.85, valori apropiate de valoarea teoretică 1.67, caracteristică hidroxiapatitei stoechiometrice.

**Tabel 4. 5.** Compoziția chimică a particulelor de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni.

Rezultate EDS exprimate în procente atomice și raportul Ca/P calculat pe baza acestora[347].

Element	Dimensiunea particulelor					Valoare de referință Pulbere nesortată
	< 20 $\mu\text{m}$	20 - 40 $\mu\text{m}$	40 - 100 $\mu\text{m}$	100 - 200 $\mu\text{m}$	< 200 $\mu\text{m}$	
O	47.8 ± 0.8	36.4 ± 0.5	41.9 ± 0.8	43.5 ± 0.6	42.0 ± 0.6	43.1 ± 0.6
C	25.2 ± 1.2	28.44 ± 1.2	26.2 ± 1.5	26.6 ± 1.3	20.4 ± 1.2	18.7 ± 1.5
Ca	14.8 ± 0.8	21.64 ± 0.5	18.3 ± 0.8	16.4 ± 0.6	22.7 ± 0.6	20.3 ± 0.6
P	9.6 ± 0.5	11.7 ± 0.3	11.2 ± 0.5	10.5 ± 0.5	14.1 ± 0.1	12.0 ± 0.2
Mg	1.09 ± 0.22	0.94 ± 0.18	1.21 ± 0.31	1.17 ± 0.24	0.64 ± 0.28	0.68 ± 0.25
Na	1.45 ± 0.15	0.96 ± 0.20	1.14 ± 0.48	1.86 ± 0.42	0.17 ± 0.26	1.25 ± 0.38
Ca/P	<b>1.54</b>	<b>1.85</b>	<b>1.63</b>	<b>1.56</b>	<b>1.61</b>	<b>1.70</b>

În cazul metodei EDS, informația analitică provine dintr-o adâncime caracteristică în general pentru analiza filmelor subțiri (de 1-10  $\mu\text{m}$ ) [392]. În cazul de față, dimensiunea particulelor nu influențează în mod direct variația rezultatelor EDS, deoarece dimensiunile particulelor analizate în acest studiu depășesc adâncimea de analiză. Forma particulelor intervine însă în calitatea rezultatelor EDS datorită erorilor induse de analiza suprafețelor tridimensionale (programele EDS presupun că probele analizate sunt plate). Incertitudinea asociată acestor erori este dificil de determinat însă este estimată la aproximativ 10% din concentrația măsurată, variind în funcție de elementul chimic și de tipul probei analizate.

Metoda este utilizată frecvent împreună cu tehnici microscopice (SEM sau TEM) pentru a corela informațiile despre morfologia și compoziția fosfaților de calciu. Întrucât este considerată o metodă de analiză semicuantitativă, studiile recente tind să utilizeze în analize doar raportul Ca/P calculat din rezultate EDS pentru a identifica sau diferenția fosfații de calciu. Însă rezultatele obținute de EDS sunt însotite de erori sistematice care alterează raportul Ca/P calculat pe baza rezultatelor. Experiența noastră, corelată cu rezultate XRD [5], a arătat că

raportul Ca/P calculat pe baza rezultatelor EDS nu este întotdeauna un indicator cert pentru compoziția fazică a fosfaților de calciu. Această experiență este confirmată de observațiile altor autori [386] referitoare la numărul ridicat de identificări ale fosfaților de calciu pe baza metodelor EDS fără a se ține cont de limitările acestei tehnici analitice. Parametrii de lucru din acest studiu (durata de baleiere, scan mode și mărirea la care au fost efectuate analizele EDS) au fost alese pentru a reduce erorile induse de procedura de lucru [347, 393].

#### d) Adâncimea de analiză : 1 – 500 µm. Rezultate WD-XRF

Rezultatele WD-XRF obținute pentru pulberile analizate în acest studiu sunt prezentate comparativ în Tabelul 4.6, pentru fiecare element chimic identificat și în raport cu valorile de referință măsurate prin analiza XRF a probei nesortate. Rezultatele arată că probele conțin elementele chimice caracteristice componentei minerale a țesutului osos: Ca, și P (componente majore), Mg și Na (componente minore), Fe, Sr, S și K (urme elementale).

În cadrul spectrometriei XRF dimensiunea probei și a particulelor sale influențează rezultatele măsurărilor (efekte de matrice) deoarece concentrația estimată depinde de masa de substanță iradiată și de coeficienții de absorbție masici care depind, la rândul lor, de împachetarea particulelor fazelor din probă. Concentrația elementelor prezente în probele de hidroxiapatită (Tabelul 4.6) variază invers proporțional cu dimensiunea particulelor, fenomen observat și în analiza altor tipuri de materiale (regolit [394], sedimente din râu [395], etc). Din corelațiile raportate pentru aceste materiale, acuratețea rezultatelor XRF este puternic influențată de metoda de preparare a probelor; pentru rezultate optime este recomandată sortarea particulelor și analiza particulelor cu dimensiuni mai mici de 40 µm [347].

**Tabel 4.6.** Compoziția chimică a particulelor de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni. Rezultate WD-XRF exprimate în procente de masă și raportul Ca/P calculat pe baza acestora [347].

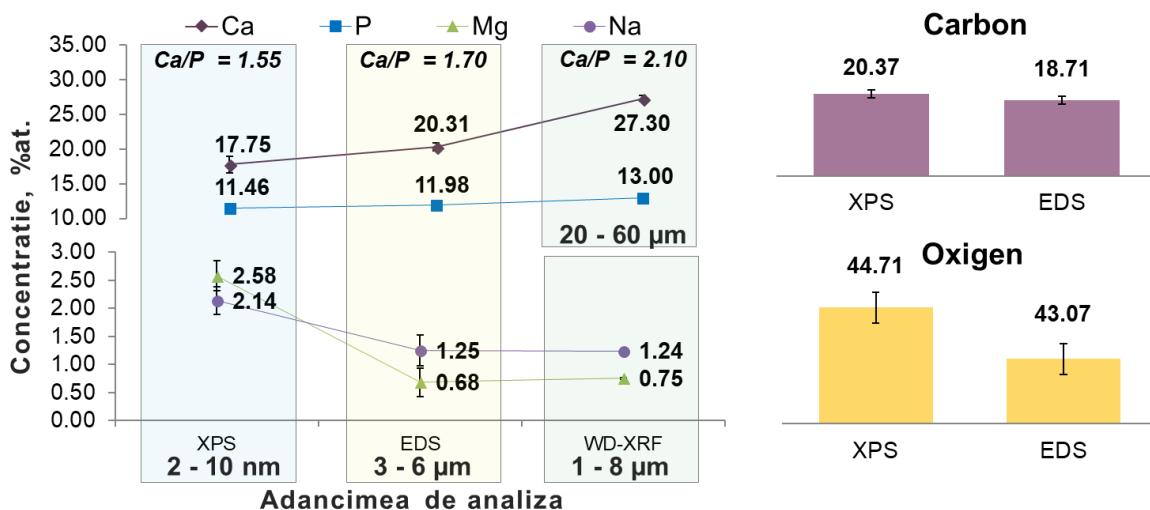
Element	Dimensiunea particulelor					Valoare de referință Pulbere nesortată
	< 20 µm	20 - 40 µm	40 - 100 µm	100 - 200 µm	< 200 µm	
Ca	48.1 ± 0.3	47.0 ± 0.4	45.2 ± 0.4	41.1 ± 0.5	39.7 ± 0.6	46.2 ± 0.4
P	17.5 ± 0.2	17.8 ± 0.2	16.5 ± 0.2	15.4 ± 0.23	14.9 ± 0.4	17.0 ± 0.2
Na	1.63 ± 0.014	1.55 ± 0.021	1.51 ± 0.019	1.34 ± 0.023	1.23 ± 0.029	1.2 ± 0.020
Mg	0.80 ± 0.006	0.80 ± 0.007	0.80 ± 0.007	0.70 ± 0.008	0.70 ± 0.010	0.80 ± 0.007
Fe	0.07 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.03 ± 0.001
S	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.04 ± 0.001
Sr	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.04 ± 0.001
K	0.03 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.001
Ca/P (wt.%)	2.74	2.64	2.73	2.66	2.66	2.71
Ca/P (at.%)	2.12	2.04	2.12	2.06	2.06	2.10

#### e) Corelația analizelor compoziționale la suprafață și în volum

În general, componenta minerală a țesutului osos prezintă variații compoziționale semnificative datorate substituțiilor din rețea cristalină a hidroxiapatitei biologice: (i) Ca<sup>2+</sup> poate fi înlocuit de cationi precum Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> sau K<sup>+</sup>; (ii) P poate fi înlocuit de atomi de C, As, V sau S iar (iii) grupările hidroxil (OH)<sup>-</sup> pot fi înlocuite de grupări carbonat (CO<sub>3</sub>)<sup>2-</sup>, ioni de fluor (F<sup>-</sup>) sau clor (Cl<sup>-</sup>), sau locul lor poate rămâne vacant. Din aceste motive, concentrațiile acestor elemente variază atât în funcție de probă cât și la nivel microscopic astfel încât prezența tuturor elementelor menționate nu este obligatorie [52, 396].

Fig. 4.14 prezintă o comparație între rezultatele compoziționale obținute pe pulberi de hidroxiapatită (nesortată) utilizând XPS, EDS și WD-XRF. Adâncimea de analiză pentru WD-XRF a fost furnizată de software-ul echipamentului, iar adâncimile aferente XPS și EDS au fost estimate din literatură [194, 392]. Rezultatele compoziționale pentru elementele majore

(Ca și P) arată o tendință de creștere a concentrației odată cu creșterea adâncimii de analiză. Creșterea mai pregnantă a concentrației de Ca conduce la creșterea semnificativă a raportului Ca/P calculat pe baza rezultatelor analizelor odată cu creșterea adâncimii de analiză.

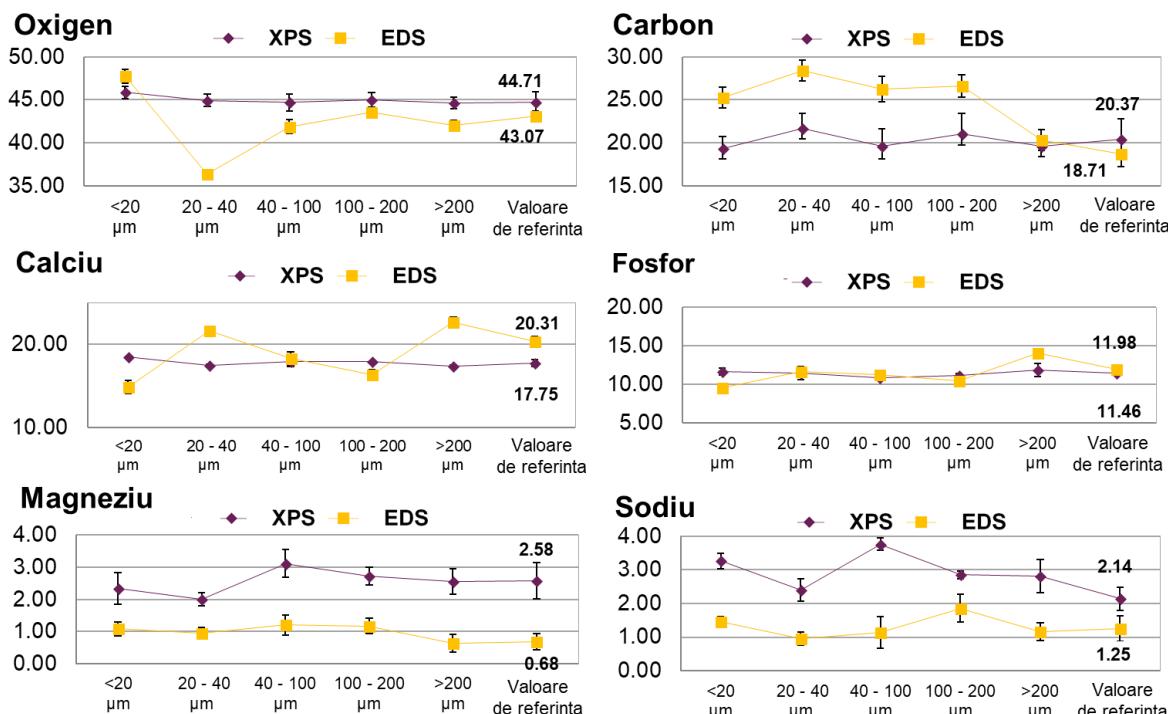


**Figura 4. 14.** Variația concentrației (at.%) elementelor chimice din pulbere de hidroxiapatită nesortată, determinată de prin metode spectrale cu diferite adâncimi de analiză [347]

Variația concentrației elementelor minore (Na și Mg) nu urmează aceeași tendință ascendentă observată în cazul elementelor majore. Compararea rezultatelor EDS și WD-XRF, corespunzătoare pentru adâncimi de analiză similare arată că, deși considerată semicantitativă, EDS este o metodă cu exactitate rezonabilă pentru analiza acestor elemente. Concentrația de Na scade odată cu creșterea adâncimii de analiză de la 2.14 at.% la 1.24 at.%. În cazul Mg, concentrația scade de la 2.58 at.% la 0.68 at% și crește ușor până la 0.75 at% în analiza XRF.

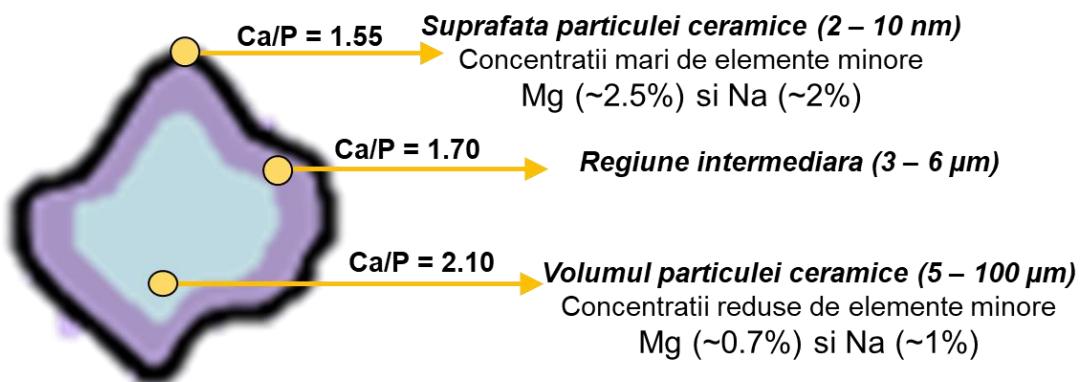
Posibile explicații pentru prezența acestor elemente în concentrații mai mari la suprafață sunt *i*) afinitatea Na și Mg pentru oxigen (present în concentrații ușor mai mari la suprafață, conform rezultatelor din tabelul 4.3 vs. tabelul 4.6) dar și *ii*) reorganizarea elementelor chimice ca urmare a tratamentelor termice efectuate la temperatură ridicată (superioară temperaturii de fierbere a celor două elemente) și răciri mai rapide la suprafață comparativ cu volumul particulelor. Prezența preferențială a magneziului la suprafața hidroxiapatitei este favorabilă, acesta având un rol pozitiv în proliferarea osteoblastelor, deci a regenerării osoase [397].

Incertitudinile de măsurare standard (calculate ca abaterile standard a trei măsurări efectuate în condiții de repetabilitate, multiplicate cu un factor de acoperire  $k = 2$ ) sunt reprezentate în fig. 4.14 și 4.15 ca bare de eroare. Întrucât dimensiunea particulelor induse efecte de matrice în analizele XRF, pentru evaluarea compozitionii pulberilor sortate granulometric au fost utilizate doar analizele XPS și EDS. În general, s-a observat că diferențele dintre concentrații depășesc erorile de măsurare. Excepții de la această observație sunt diferențele dintre concentrația de carbon măsurată la suprafață și în volum în proba nesortată și în probă cu particule  $>200\mu\text{m}$ ; aceste diferențe pot fi atribuite adsorbției aleatoare de hidrocarburi din mediul ambiant, care a determinat creșterea concentrației de carbon la suprafață. De asemenea, deși sunt caracterizate de incertitudini mici (bara de eroare nu depășește dimensiunea punctelor din grafic), rezultatele EDS și XPS pentru concentrația de fosfor nu au relevat o distribuție elementală diferită la suprafața particulelor comparativ cu volumul acestora (fig. 4.14 și 4.15).



**Figura 4. 15.** Variația concentrației (at.%) elementelor chimice din pulbere de hidroxiapatită sortată, determinată de prin metode spectrale cu diferite adâncimi de analiză [347]

Diferențele compoziționale dintre suprafața particulelor și volumul acestora sunt posibile datorită defectelor structurale caracteristice ale hidroxiapatitei derive din țesut osos bovin. Comparația dintre rezultatele EDS și XPS obținute pe pulberi sortate susține observațiile inițiale referitoare la orientarea preferențială a Mg și Na la suprafața particulelor. Rezultatele din acest studiu sugerează că tratamentul termic al hidroxiapatitei din țesut bovin conferă o îmbunătățire naturală a suprafeței materialului.



**Figura 4. 16.** Reprezentare a variației concentrării elementelor minor (at.%) într-o particulă ceramică de hidroxiapatită obținută din țesut osos bovin

Variabilitatea concentrației elementelor majore (Ca, P, O, C), observabilă în pulberile sortate, este atribuită substituțiilor cu grupări carbonat de tip A și B (vârfuri caracteristice grupărilor carbonat au fost identificate în spectrele FT-IR) care sunt distribuite aleator, în diferite cantități, în structura hidroxiapatitei obținute din țesut osos bovin. Deocamdată aplicarea acestei corelații pentru particule cu diferite dimensiuni necesită o validare bazată pe buna înțelegere a interacțiunilor fizice dintre radiațiile incidente utilizate în analizele spectrale și particulele de hidroxiapatită. Validarea reprezintă o provocare majoră deoarece elementele

majore prezente în hidroxiapatită sunt elemente ușoare, cu  $Z \leq 20$ , ceea ce afectează acuratețea multor metode spectrale, inclusiv, XPS, EDS și XRF [347].

#### 4.2.3. Concluzii

Dimensiunea particulelor a influențat rezultatele FT-IR și WD-XRF. În cazul FT-IR, analiza comparativă a spectrelor obținute pentru probe sortate granulometric a arătat că odată cu scăderea dimensiunii particulelor probelor are loc o creștere a intensității absorbtiei pentru grupările fosfat din structura materialului. Simultan, în regiunile caracteristice grupărilor carbonat și hidroxil, intensitatea absorbtiei s-a menținut la nivelul valorii de referință, cu excepția probelor care conțin particule mai mici de  $40\mu\text{m}$  (ale căror intensități s-au redus față de proba de referință). De asemenea, a fost confirmată influența dimensiunii particulelor probei asupra concentrației de Ca, P, Na și Mg determinată prin analiza WD-XRF a hidroxiapatitei.

Corelația suprafață - volum a compozиiei chimice a relevat organizarea preferențială a Na și Mg la suprafața materialului, posibil datorită afinității pentru oxigen a acestor elemente și tratamentelor termice efectuate la temperaturi ridicate. Modificările de compozиie afectează în mod direct raportul Ca/P calculat pe baza rezultatelor, acesta variind invers proporțional cu adâncimea de analiză a metodelor spectrale incluse în studiu. Compoziția diferă a suprafeței particulelor preconizează o influență pozitivă asupra comportamentului biologic al materialului datorită concentrației crescute de Mg. Rezultatele confirmă necesitatea adoptării unor programe de caracterizare complementară suprafață – volum a particulelor de hidroxiapatită [347].

### **4.3. Evaluarea *in vitro* a materialelor ceramice obținute după tratamentul termic al țesutului osos bovin**

Studiul experimental prezentat în acest capitol a vizat corelarea caracteristicilor de suprafață (umectabilitatea și caracterul hidrofil/hidrofob, exprimate de unghiul de contact măsurat după depunerea unei picături de apă pe suprafața hidroxiapatitei) cu morfologia probelor (dimensiunea particulelor). Apoi, s-a urmarit evaluarea *in vitro* a pulberilor ceramice obținute din procesarea țesutului osos bovin prin: evaluarea cantitativă a citotoxicității prin detectia secreției de lactat dehidrogenaza (LDH); evaluarea calitativă a supraviețurii și proliferării celulare și evaluarea morfologiei prin microscopie de fluorescentă; evaluarea cantitativă a supraviețurii și proliferării celulare prin evaluare colorimetrică MTT; evaluarea morfologiei și adeziunii osteoblastelor prin microscopie electronică de baleaj prin microscopie de fluorescentă și evaluarea cantitativă a mineralizării matricei extracelulare prin colorarea celulelor cu Alizarin red [6].

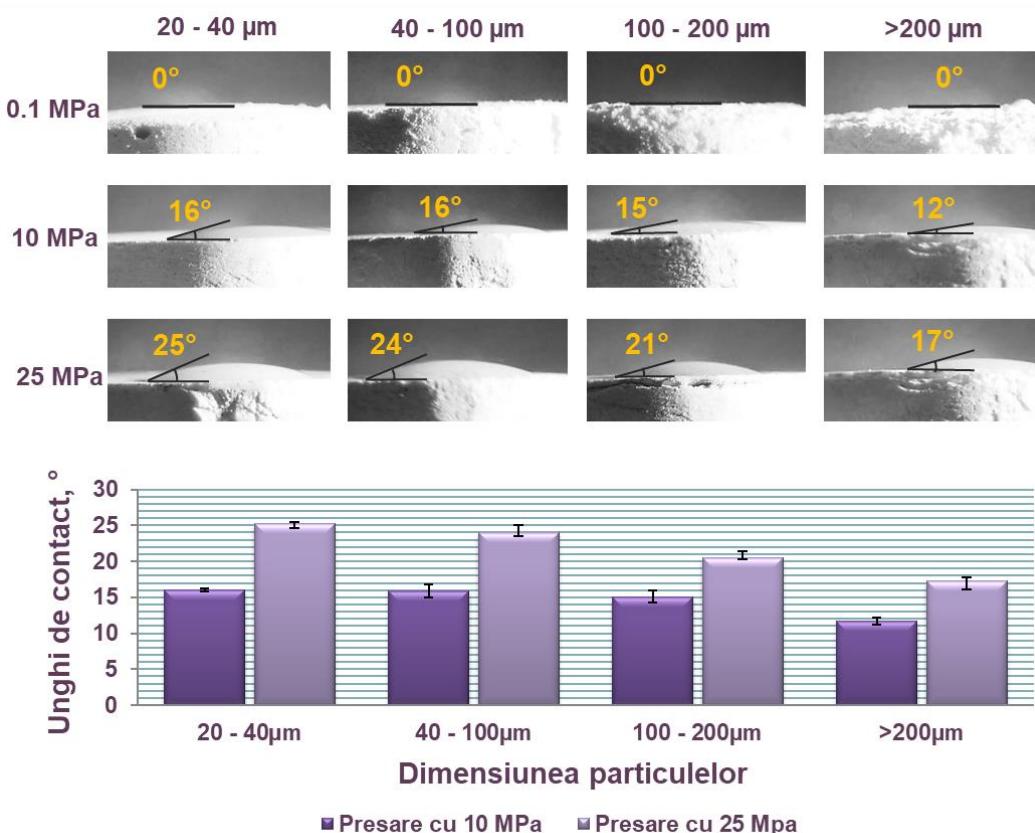
#### **4.3.1. Umectabilitatea suprafeței pulberilor de hidroxiapatită după presare**

Rezultatele evaluării unghiului de contact format la depunerea unei picături de apă pe suprafața probelor de hidroxiapatită preparate prin presare din diferite sorturi granulometrice sunt prezentate în fig. 4.17. Metoda de preparare a probelor a indus o variație semnificativă a unghiului de contact măsurat. În cazul probelor presate la 0.1 MPa, unghiul de contact a fost considerat  $0^\circ$  deoarece picăturile de apă au fost absorbite de suprafața ceramică într-un timp mai scurt decât timpul de captare a imaginii. Unghurile de contact măsurate variază între  $0 - 25^\circ$  și variază direct proporțional cu forța de apăsare utilizată pentru pregătirea comprimatelor. Aceste valori indică o bună umectare a suprafeței, probele având un caracter hidrofil.

Rezultatele sugerează că materialul prezintă caracteristici adecvate pentru favorizarea regenerării osoase. Fenomenele de bioactivitate și regenerare osoasă care au loc la interfața dintre biomaterialul ceramic și mediul biologic pornesc de la adsorbția spontană a moleculelor din fluidele biologice la suprafața biomaterialului, urmată de atașarea, proliferarea și migrarea celulară. La rândul său, adsorbția moleculelor biologice este influențată semnificativ de caracterul hidrofil/hidrofob al materialului și de caracteristicile intrinseci ale moleculei [398]. De exemplu, molecula de ADN aderă preferențial la suprafețe cu umectabilitate ridicată ( $\theta < 50^\circ$ ) datorită grupărilor fosfat prezente în moleculă, dar albumina serică bovină prezintă adeziune mai pronunțată pe suprafețe cu umectabilitate scăzută ( $\theta < 50^\circ$ ) [399].

Corelarea adeziunii și proliferării osteoblastelor cu umectabilitatea substratului a relevat că celulele osoase manifestă o preferință puternică pentru substraturi hidrofile [400] precum cele evaluate în acest studiu. Suplimentar, a fost raportat că materialele hidrofile ar poseda o rezistență mai bună la adeziunea bacteriană, comparativ cu materialele hidrofobe [399, 401].

Pe lângă influența asupra performanțelor biologice ale hidroxiapatitei, umectabilitatea joacă un rol important în fabricația aditivă a produselor ceramice. În printarea tridimensională capacitatea de umectare a pulberii de către liant va afecta acuratețea dimensională a structurii printate: o capacitate de umectare prea mare duce la împrăștierea excesivă a liantului și afectează rezoluția de printare, în vreme ce o capacitate de umectare insuficientă afectează integritatea mecanică a produsului printat. Capacitatea de umectare depinde de unghiul de contact dintre pulbere și liant, de vâscozitatea liantului, de reacțiile chimice care au loc între pulbere și liant, dar și de dimensiunea și forma particulelor de pulbere.



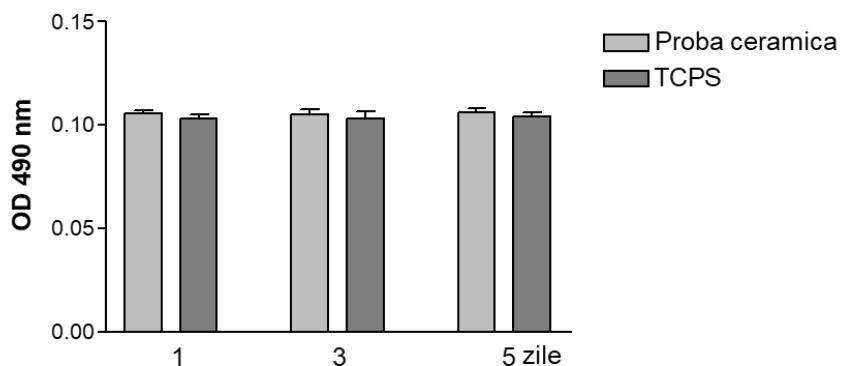
**Figura 4. 17.** Influența dimensiunii particulelor și a forței de presare asupra unghiului de contact format la depunerea unei picături de apă pe suprafața hidroxiapatitei derive din os bovin [347]

Atât adsorbția preferențială a moleculelor biologice la suprafața biomaterialelor cât și cerințele stringente impuse de printarea tridimensională a creat nevoie de suprafete cu caracter hidrofil/hidrofob eterogen. Asigurarea unor astfel de proprietăți necesită exercitarea unui nivel adecvat de control asupra umectabilității biomaterialului. În cazul hidroxiapatitei, inducerea unei umectabilități cu un interval larg de variație ( $10 - 100^\circ$ ) a fost posibilă până în prezent prin iradiere cu electroni [399, 401]. În acest studiu, varierea umectabilității hidroxiapatitei a fost asigurată pentru un palier mai redus de variație prin controlul dimensiunii particulelor și a forței de apăsare utilizate pentru obținerea comprimatelor. Conform rezultatelor din fig. 4.17, unghiul de contact măsurat la suprafața hidroxiapatitei crește odată cu creșterea forței de apăsare și scăderea dimensiunii particulelor. Cea mai bună variație a fost obținută în cazul în cazul probelor presate la 25 MPa, datorită impachetării mai bune a pulberilor ceramice. Variații controlate ale umectabilității hidroxiapatitei pot fi obținute utilizând pulberi de dimensiuni mai mici și aplicând forțe de apăsare mai mari.

#### 4.3.2. Evaluarea citotoxicității

Având în vedere că celulele sunt sensibile la mediul lor înconjurător, secreția de lactat dehidrogenaza (LDH) din preosteoblaste a fost considerată indicator al citotoxicității. Lactat dehidrogenaza este o enzimă prezentă în toate tipurile de celule, care este eliberată rapid în mediul de cultură în cazul deteriorării membranei celulare. Valori mari ale absorbanției măsurate la 490 nm indică inițierea lizei celulare.

### Lactat dehidrogenaza (LDH)



**Figura 4. 18.** Evaluarea citotoxicității prin măsurarea secreției de lactat dehidrogenază (LDH) din celule MC3T3-E1 cultivate în contact direct cu probe ceramice preparate din țesut osos bovin tratat termic și cu probe de referință (plăci de polistiren – TCPS). Măsurări efectuate la 1, 3, respectiv 5 zile de la cultivare.

\*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01 vs. valoarea măsurată pe aceeași probă la timpul de incubare anterior [6].

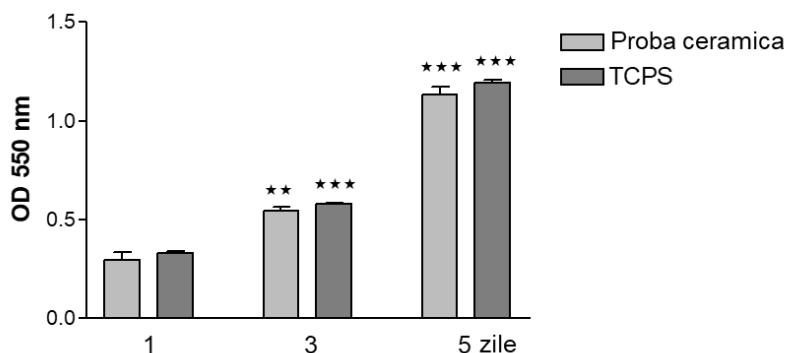
În rezultatele prezentate în fig. 4.18, valorile absorbanței pentru lactat dehidrogenaza secretată de celulele aflate în contact direct cu probele ceramice preparate din țesut osos bovin sunt foarte apropiate de valorile de referință (celule cultivate în plăci de polistiren – TCPS), ceea ce sugerează că materialul nu este citotoxic. Valorile absorbanței s-au menținut constante și la 3 și la 5 zile de la cultivare [6].

#### 4.3.3. Evaluarea cantitativă a supraviețuirii și proliferării celulare

Evaluarea cantitativă a supraviețuirii și proliferării celulare a fost efectuată prin evaluare colorimetrică MTT, bazată pe reducerea colorantului galben MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliu] la un produs celular violet denumit formazan. Cantitatea de formazan produsă, cuantificată prin măsurarea absorbanței este proporțională cu numărul de celule viabile, active din punct de vedere metabolic, prezente în probe.

Rezultatele din fig. 4.20 arată că valorile absorbanței corespunzătoare cantității de formazan produse de mediul celular în contact direct cu probele ceramice preparate din țesut osos bovin sunt apropiate de valorile de referință. Valorile absorbanței au crescut odată cu creșterea perioadei de timp de la cultivare, ceea ce sugerează creșterea numărului de celule viabile prezente pe suprafața materialelor

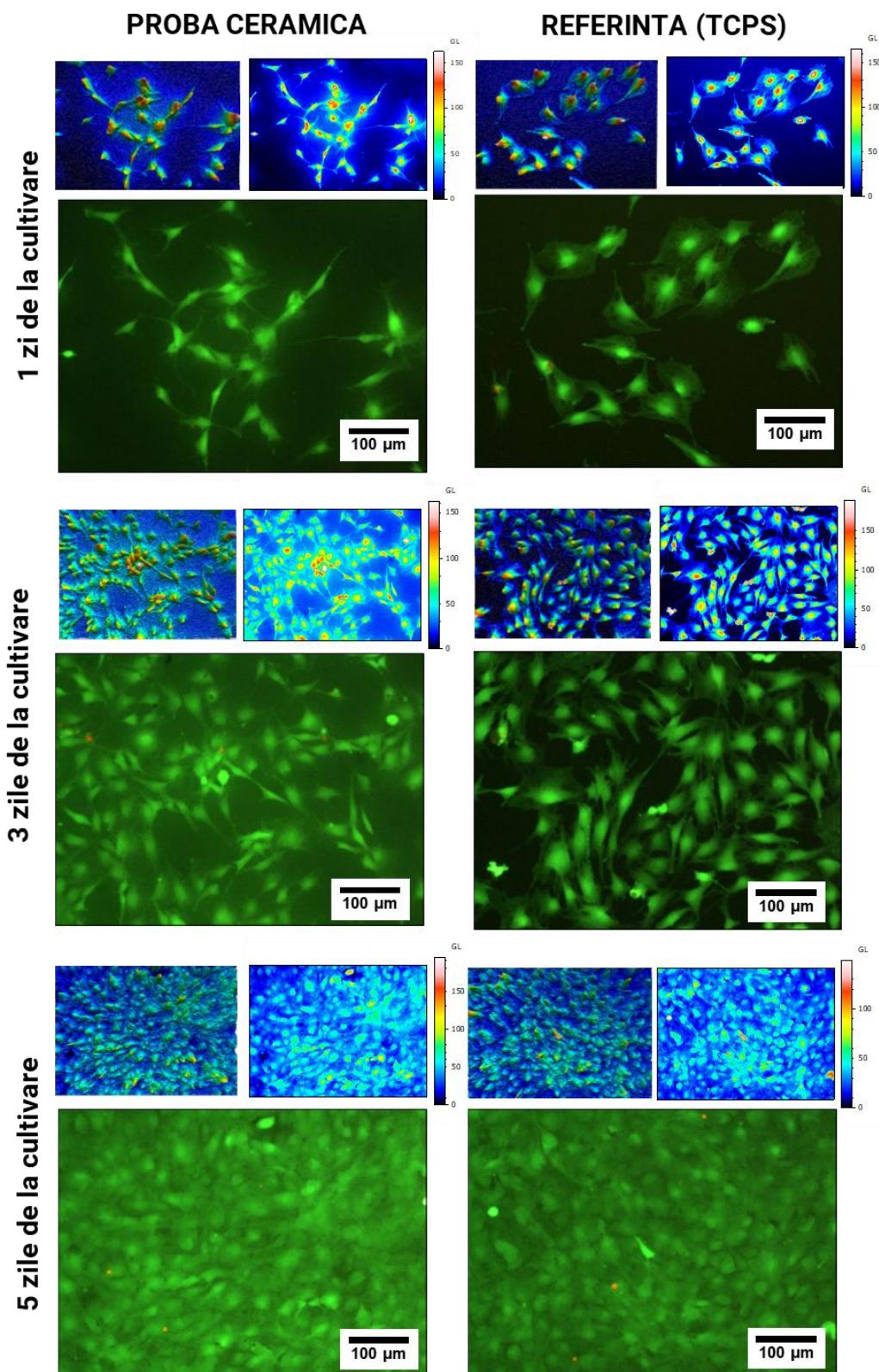
### Evaluare MTT



**Figura 4. 19.** Viabilitatea/proliferarea celulelor preosteoblaste MC3T3-E1 cultivate în contact direct cu probe ceramice și probe de referință (plăci de polistiren – TCPS) la 1-5 zile de la cultivare; evaluare MTT

\*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01 vs. valoarea măsurată pe aceeași probă la timpul de incubare anterior [6].

#### 4.3.4. Evaluarea calitativă a supraviețuirii și proliferării celulare

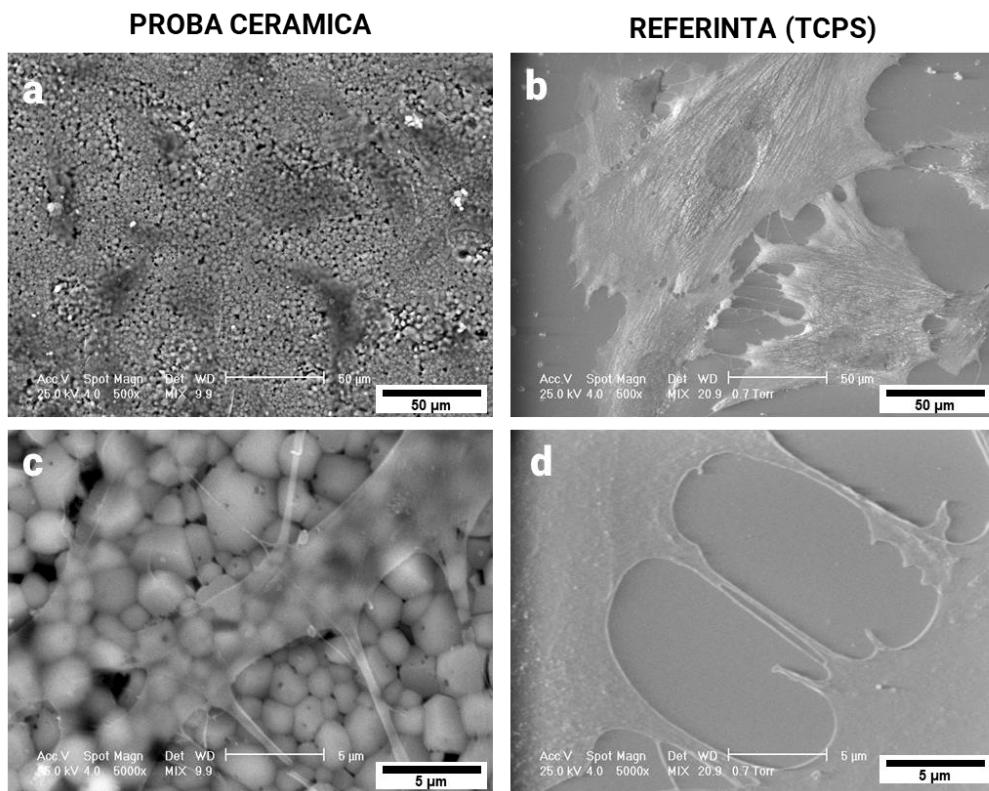


**Figura 4. 20.** Viabilitatea / proliferarea celulelor MC3T3-E1 cultivate timp de 1 – 5 zile în contact direct cu probe ceramice preparate din țesut osos bovin și probe de referință (plăci de polistiren) evaluată prin teste de viabilitate de tip LIVE/DEAD Cell Viability și imagini obținute din reconstrucția 3D și colorizarea imaginilor de microscopie cu ajutorul programului dedicat MountainsMap [6].

Evaluarea calitativă a supraviețurii și proliferării celulare a fost efectuată prin colorarea simultană a celulelor vii și moarte cu doi flurocromi: calceină (Calcein AM) și ethidiu (Ethidium homodimer-1). Calceina colorează citoplasma celulelor vii în verde datorită conversiei în calceina fosforescentă, iar ethidiu penetrează membranele celulare degradate și reacționează cu acizii nucleici, colorând nucleul celulelor moarte în roșu. În imaginile de microscopie din fig. 4.19 s-a observat că atât suprafața de referință (plăcuță de polistiren – TCPS) cât și suprafața probei ceramice derivate din țesut osos bovin sunt acoperite cu celule colorate în verde, al căror număr crește constant astfel că în a 5-a zi de la cultivare ambele suprafețe au fost acoperite cu un strat omogen de celule viabile [6].

#### 4.3.5. Morfologia și adeziunea osteoblastelor

Adeziunea celulelor la suprafața biomaterialului este esențială pentru integrarea in vivo a implantului și regenerarea ulterioară a țesutului-gazdă. Procesul este influențat de chimia și topografia suprafeței biomaterialului, care determină tipul și cantitatea de proteine adsorbite. Odată ce biomaterialul este introdus în organism, acesta este acoperit imediat cu proteine prezente în sânge și în fluidele interstitiale [402]. Glicoproteinele din matricea extracelulară, precum fibronectina și vitronectina, joacă un rol important în adeziunea celulelor pe biomaterial, precum și în procesele de migrare și diferențiere celulară, necesare pentru susținerea regenerării osoase.



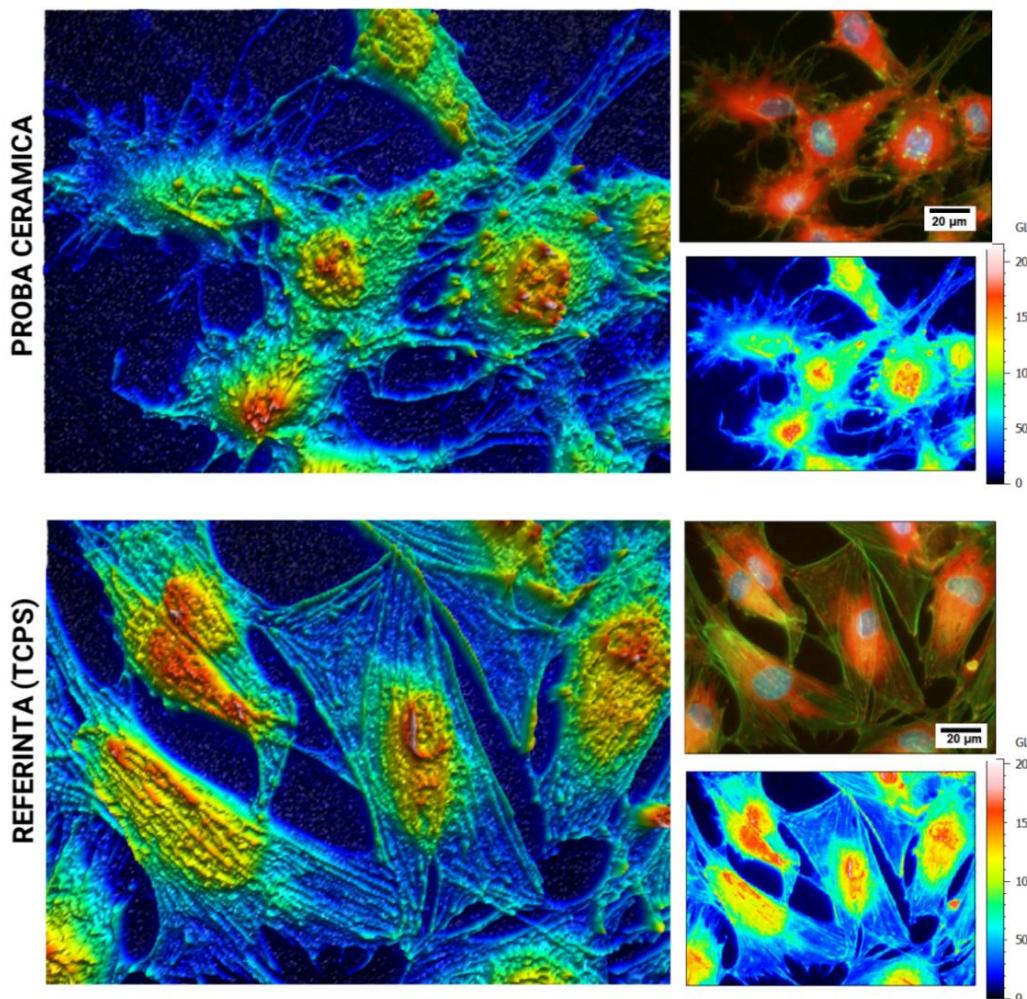
**Figura 4. 21.** Caracteristici morfologice ale celulelor preosteoblaste MC3T3-E1 la 24 ore după cultivarea pe probe ceramice și probe de referință (plăci de polistiren – TCPS) – rezultate SEM [6].

Rezultatele evaluării morfologiei și adeziunii osteoblastelor prin microscopie electronică de baleiaj sunt prezentate în fig. 4.21. Preosteoblastele MC3T3-E1 au aderat atât pe proba ceramică preparată din țesut osos bovin tratat termic cât și pe plăcile de polistiren utilizate ca referință. Celulele cultivate pe plăcile de polistiren (TCPS) prezintă o morfologie poligonală tipică osteoblastelor, dimensiuni mari și prelungiri citoplasmaticce care aderă la

suprafața materialului (observabile în detaliile SEM din fig. 4.21c și 4.21d). Morfologia osteoblastelor este asemănătoare și pe probele ceramice, însă cu o ușoară reducere a suprafeței ocupate de celule. Celulele se află în contact direct una cu celalată în cazul ambelor tipuri de probe.

Morfologia și adeziunea celulară, evaluate prin microscopie de fluorescență pe celule marcate cu anticorpi verde-fluorescent – pentru detecția microfilamentelor de actină din citoschelet, și anti-vinculina - pentru colorarea adeziunilor locale sunt prezentate în detaliile din fig. 4.22; imaginile principale sunt obținute prin reconstrucția 3D și colorizarea imaginilor de microscopie cu ajutorul programului dedicat MountainsMap.

În aceste imagini se observă că osteoblastele cu formă poligonală cultivate pe materialul de referință prezintă o formă mai alungită și stelată. Microfilamentele de actină din citoschelet (colorație verde-fluorescent) sunt vizibile atât în imaginile care corespund probelor ceramice cât și în imaginile obținute pe probele de referință. Microfilamentele de actină din celulele cultivate pe probă ceramic sunt mai puțin întinse în comparație cu microfilamentele bine definite și orientate paralel cu axa principală a celulelor, corespunzătoare proelor de referință. Locațiile imunoreactive ale vinculinei sunt poziționate în regiunile periferice ale ceulelor, la terminațiile microfilamentelor de actină și în regiunea din imediata vecinătate a nucleului [403].

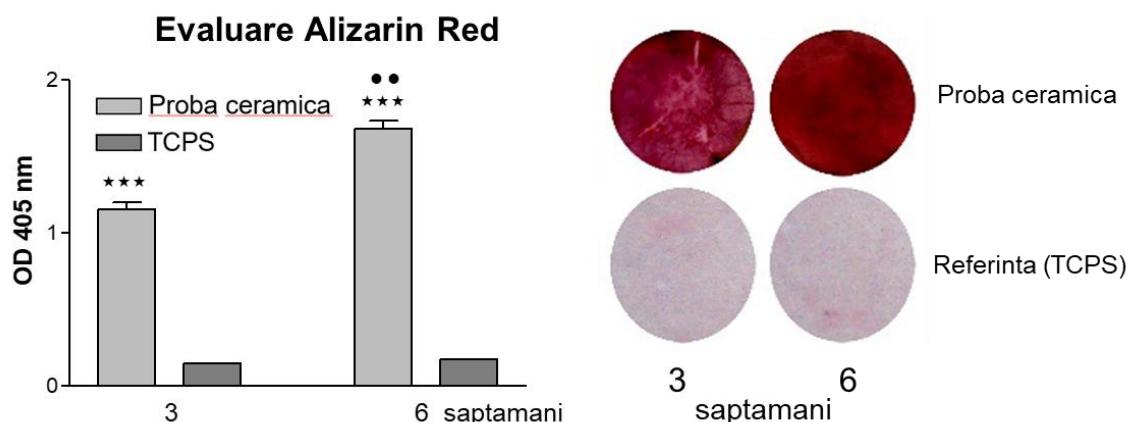


**Figura 4. 22.** Caracteristici morfologice ale celulelor preosteobaste MC3T3-E1 la 24 ore după cultivarea pe probe ceramice preparate din țesut osos bovin tratat termic și probe de referință (plăci de polistiren – TCPS) – rezultate de microscopie de fluorescență și imagini obținute din reconstrucția 3D și colorizarea imaginilor de microscopie cu ajutorul programului dedicat MountainsMap [6].

#### 4.3.6. Mineralizarea matricei extracelulare

Pentru ca un potențial biomaterial să încurajeze formarea țesutului osos pe suprafață sa este necesar ca acesta să prezinte abilitatea de a promova maturizarea și mineralizarea matricei osoase. Un indicator standard al diferențierii osteoblastelor *in vivo* și *in vitro* este formarea unei matrici extracelulare alcătuită în special din calciu. Așadar, mineralizarea culturilor osteogenice este considerată un punct final al evaluării *in vitro* care denotă diferențierea avansată a celulelor osteobaste [404].

În acest studiu, mineralizarea matricei extracelulare a fost cuantificată prin colorare cu Alizarin Red la 3, respectiv 6 săptămâni de la cultivare. După cultivare, preosteoblastele din linia celulară MC3T3-E1 au promovat semnificativ ( $p<0.001$ ) mineralizarea matricei extracelulare la interfața dintre celule și probele ceramice, comparativ cu probele de referință (plăci de polistiren – TCPS, fig. 4.23). Mai mult, acumularea de depozite minerale a crescut semnificativ ( $p<0.01$ ) pentru probele ceramice la 6 săptămâni de la cultivare, față de momentul testării anterioare (3 săptămâni de la cultivare), în timp ce valorile de referință au variat neglijabil. Rezultatele confirmă abilitatea hidroxiapatitei de a promova adeziunea, proliferarea și diferențierea celulară [5].



**Figura 4. 23.** Evaluarea mineralizării matricei extracelulare a preosteoblastelor MC3T3-E1 la 3 și 6 săptămâni după cultivarea pe probe ceramice preparate prin tratamentul termic al țesutului osos bovin și pe probe de referință (plăci de polistiren – TCPS). Stânga: rezultatele măsurării absorbanței după colorare cu Alizarin Red; dreapta: imagini digitale ale probelor analizate . \*\*\* $p<0.001$  vs. TCPS; •• $p < 0.01$  vs. proba analizată la 3 săptămâni de la cultivare [6].

#### 4.3.7. Concluzii

Rezultatele evaluarilor *in vitro* a citotoxicității, supraviețuirii și proliferării celulare, morfologiei și adeziunii osteoblastelor și a mineralizării matricei extracelulare a celulelor preosteoblaste de tip MC3T3-E1 în prezența pulberilor ceramice preparate din țesut osos tratat termic la 1200°C au arătat că materialele prezintă proprietăți adecvate pentru proliferarea și adeziunea celulară și facilitează procesele de mineralizare osteoblastică [6].

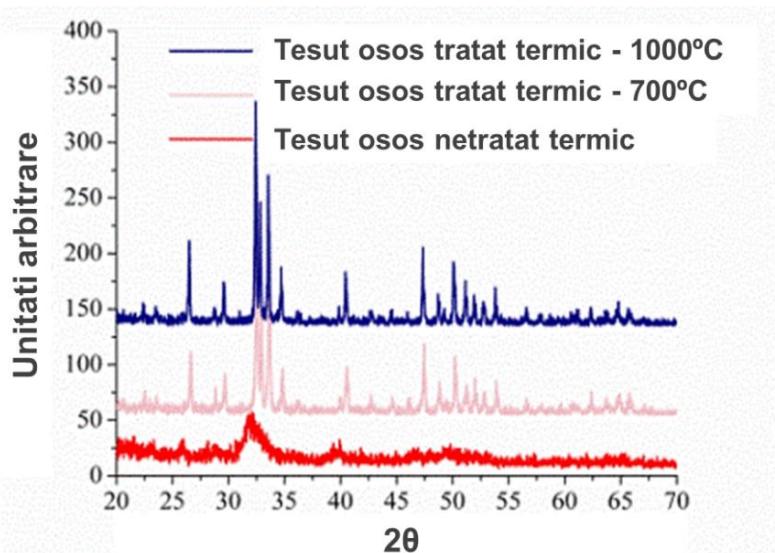
## 4.4. Obținerea și caracterizarea unor materiale microcompozite cu hidroxiapatită și argint

În acest studiu s-a urmărit evaluarea influenței concentrației de argint asupra caracteristicilor hidroxiapatitei sinterizate. Programul experimental a cuprins evaluarea hidroxiapatitei după adiția în amestecul destinat sinterizării a diferite concentrării de argint (mai mici de 2wt.%, considerate noncitotoxice [243, 255, 405]). Obiectivele studiului au fost: a) obținerea de probe ceramice presate cu diferite forțe de presare, utilizând pulbere de hidroxiapatită derivată din țesut osos bovin și particule de argint din comerț; b) caracterizarea morfologică a materialelor în fiecare etapă a sinterizării; c) evaluarea influenței argintului asupra rezultatelor analizelor compoziționale ale microcompozitelor pe bază de hidroxiapatită și argint și d) evaluarea efectului antibacterian al microcompozitelor după sinterizare [348, 349].

Probele sunt codificate **HA- x%Ag** în funcție de conținutul de argint, exprimat în procente de masă (unde  $x = 0\%, 0.1\%, 0.2\%, 0.5\%, 1.0\% \text{ și } 2.0\%$ )

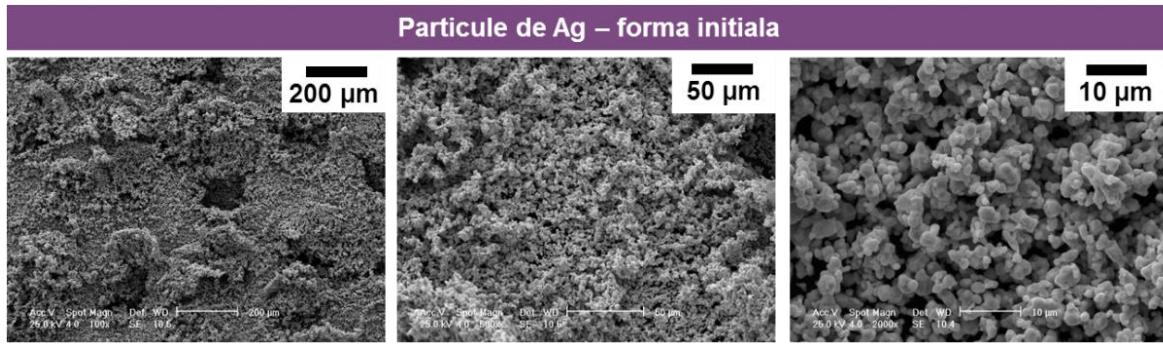
### 4.4.1. Caracterizarea pulberilor precursoare

Analiza structurală a materialului ceramic utilizat a fost efectuată pentru a confirma identitatea compusului obținut după tratamentul termic al țesutului osos bovin și a eventualilor compuși secundari formați. Difractograma prezentată în fig. 4.24 în comparație cu difractogramele ale țesutului osos nefiltrat termic și a unui material ceramic rezultat din tratamentul termic al țesutului osos efectuat la  $700^{\circ}\text{C}$  sunt reprezentative pentru structura hidroxiapatitei de origine bovină, confirmând rezultate obținute în condiții experimentale similare [67, 406]. Nu au fost identificați compuși suplimentari, componenta minerală a țesutului osos bovin fiind stabilă la procesarea termică în atmosferă de aer [407].



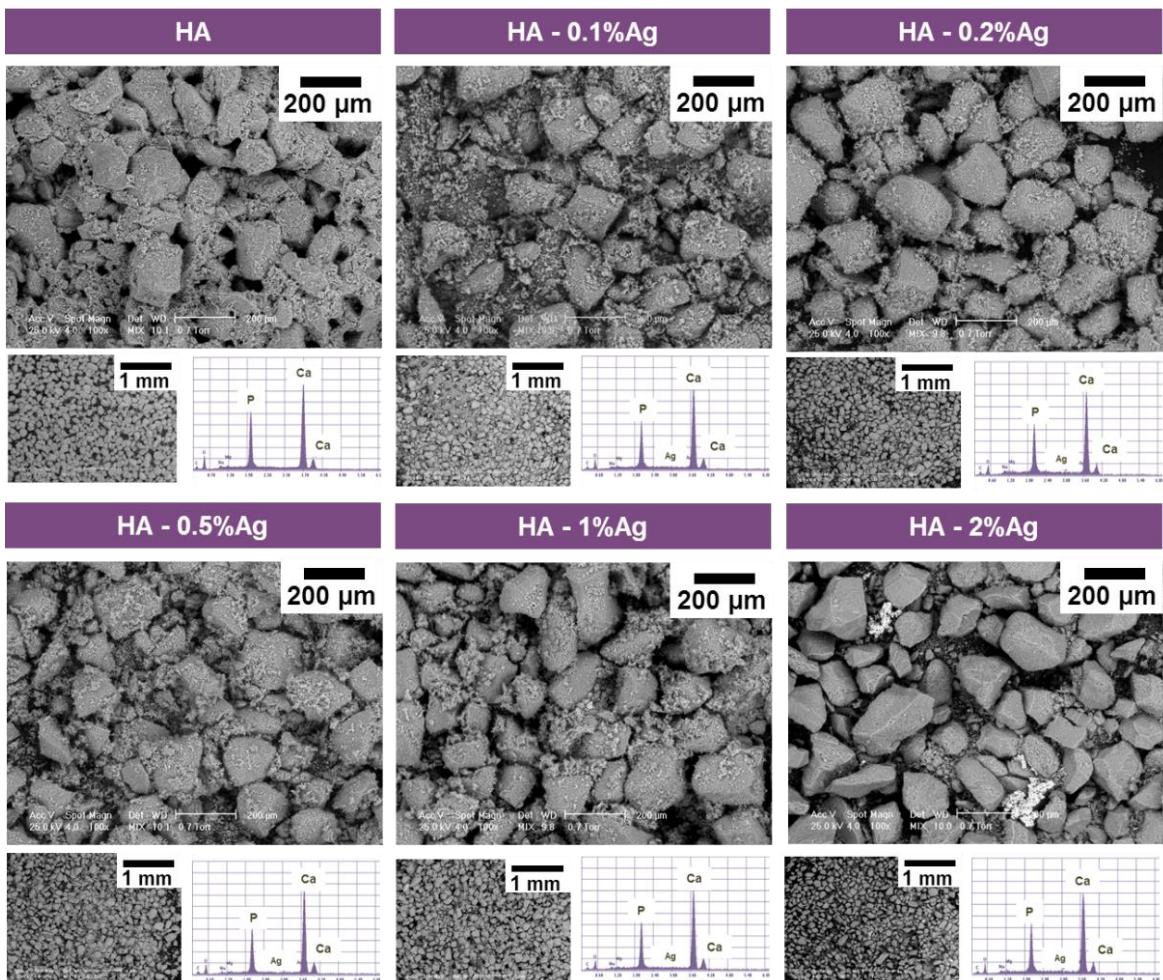
**Figura 4. 24.** Difractograme caracteristice pentru țesutul osos bovin tratat termic la  $700^{\circ}\text{C}$  și  $1000^{\circ}\text{C}$ . Rezultatele sunt prezentate comparative cu difractograma caracteristică țesutului osos nefiltrat termic [349]

Aspectul morfologic (Fig. 4.25) al pulberii de argint în starea inițială a relevat o distribuție uniformă a dimensiunii particulelor de argint, cu un diametru mediu al particulelor cuprins între  $2 - 10 \mu\text{m}$ . Particulele metalice au un aspect rotunjit, cu o ușoară tendință de aglomerare.



**Figura 4. 25.** Caracteristici morfo-compoziționale ale particulelor de argint utilizate ca precursori [348].

Analiza pulberii de HA (Fig. 4.26) a confirmat dimensiunile sugerate de sortarea granulometrică. Pulberea ceramică prezintă o distribuție uniformă a dimensiunii particulelor. Particulele au o formă neregulată, multifațetată, cu margini rotunjite.



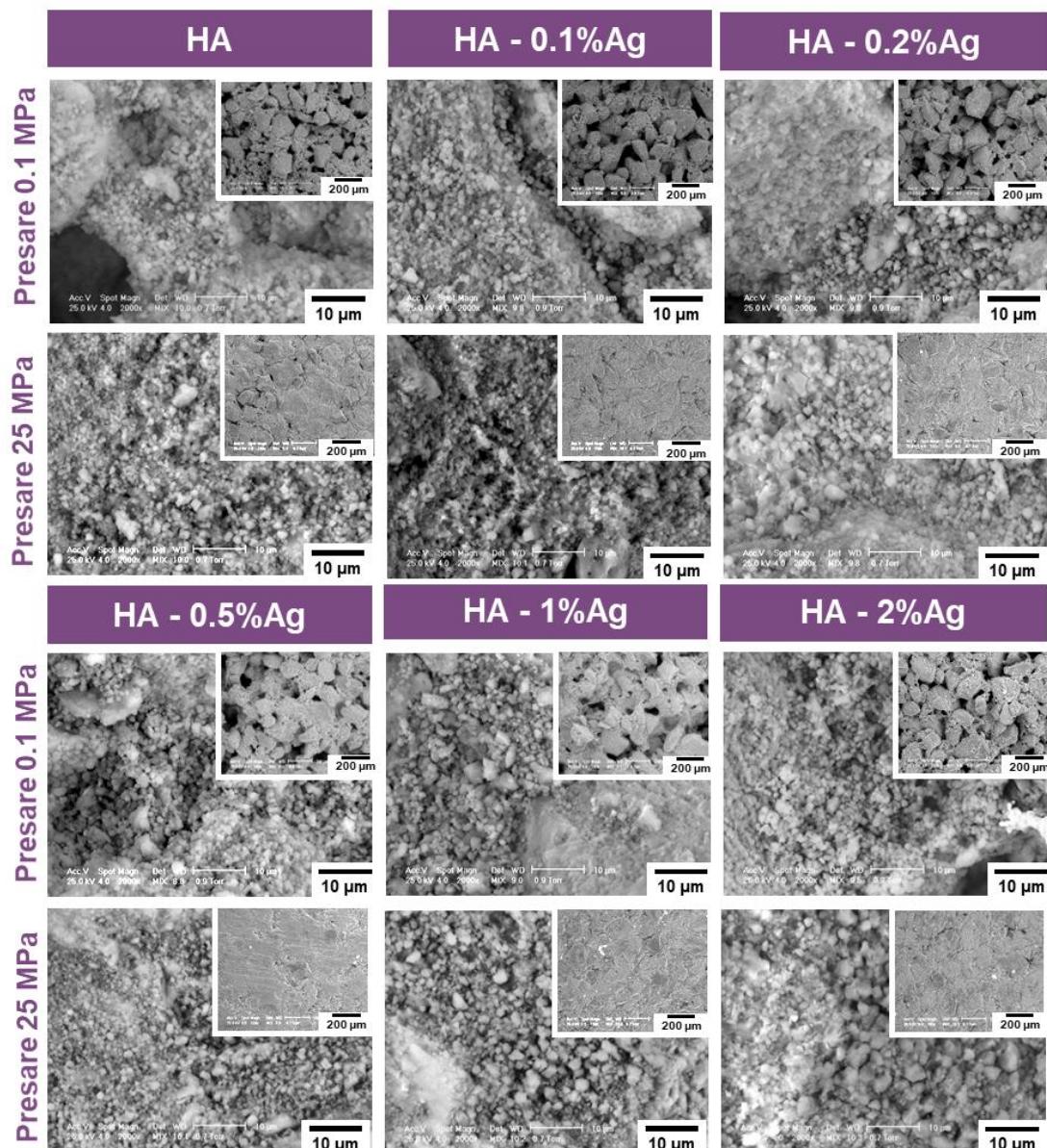
**Figura 4. 26.** Caracteristici morfo-compoziționale ale hidroxiapatitei inițiale și ale amestecurilor pulverulente [348]

Încorporarea argintului prin amestecare mecanică a asigurat distribuirea uniformă a particulelor de argint pe suprafața particulelor de hidroxiapatită. Observația este valabilă pentru toate probele analizate, cu excepția probei HA-2%Ag, în care particulele de argint au manifestat o tendință de aglomerare în spațiile dintre particulele ceramice. Aglomerări similare au fost observate de alți autori pentru concentrații de 1-5% Ag în cazul dopării hidroxiapatitei destinate scaffold-urilor poroase [246] sau acoperirilor [245].

Prezența argintului a fost identificată în spectrele EDS reprezentative pentru toate probele analizate (fig. 4.26). Raportul atomic Ca/P al probelor de hidroxiapatită cu argint variază între 1.73 – 1.91. Nu a fost identificată o corelație reprezentativă din punct de vedere statistic între raportul Ca/P și concentrația de argint încorporată în probe. Evaluarea acestei corelații este influențată însă de caracterul local al analizei EDS și de tendința de aglomerare a particulelor de argint odată cu creșterea concentrației acestuia [348].

#### 4.4.2. Caracterizarea semifabricatelor microcompozite

Aspectele morfologice ale corpurilor obținute după formarea amestecurilor (fig. 4.27) sunt caracteristice pentru hidroxiapatita de origine bovină. În imaginile principale se observă morfologia granulară a hidroxiapatitei, cu grăunți poliedrici bine definiți, de diferite dimensiuni.



**Figura 4. 27.** Comparație între morfologia corpurilor presate obținute din hidroxiapatită cu diferite concentrații (wt.%) de argint[348] .

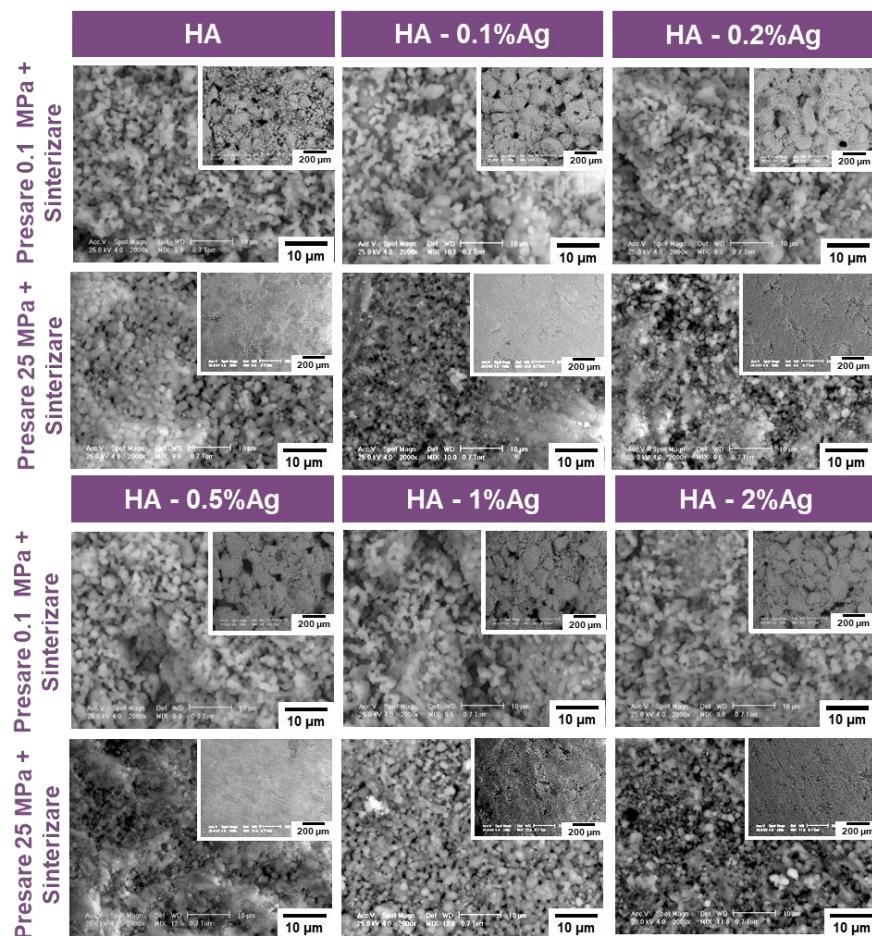
Corpurile presate cu 0.1 MPa sunt alcătuite din particule ceramice unite în structuri poroase, în care forma particulelor de hidroxiapatită este bine diferențiată. În probele care conțin argint particulele de metal sunt uniform distribuite pe suprafața hidroxiapatitei, contribuind local la îmbunătățirea adeziunii dintre particule. Tendința de aglomerare a particulelor de argint este observabilă și în această etapă a obținerii materialelor. Aglomerările de argint au fost observate pentru probele cu 1-2 wt% Ag (vizibile îndeosebi în rezultatele SEM prezentate în detaliile din fig.4.28).

După presarea probelor cu 25 MPa au fost obținute materiale cu puțini pori, în care forma particulelor de hidroxiapatită se diferențiază mai puțin decât în cazul probelor presate cu 0.1 MPa. Creșterea concentrației de argint a dus la o îmbunătățire a împachetării pulberilor, cu compromisul intensificării tendinței de aglomerare a particulelor metalice.

#### 4.4.3. Caracterizarea corpurilor sinterizate

##### a) Morfologia corpurilor sinterizate

Sinterizarea probelor de hidroxiapatită și argint a avut loc la temperatura de 1000°C pentru a evita descompunerea hidroxiapatitei (hidroxiapatita de origine bovină este stabilă termic până la aproximativ 1200°C [5, 407]). Procesarea la această temperatură, situată între temperatura de topire (961.8°C) și temperatura de vaporizare (1950°C) a argintului, a facilitat topirea microparticulelor de argint și peliculizarea acestuia pe suprafața particulelor de hidroxiapatită, fără a reacționa cu aceasta.



**Figura 4. 28.** Comparație între morfologia corpurilor sinterizate după presarea hidroxiapatitei cu diferite concentrații (wt.%) de argint [348].

Topirea argintului a contribuit local la: a) menținerea constantă a dimensiunii grăunților, favorizând densificarea materialului ceramic fără difuzie și b) umectarea particulelor de hidroxiapatită, favorizând detensionarea aglomerărilor de particule ceramice și reorganizarea acestora în materiale compacte. Influența favorabilă a adiției de argint asupra probelor sinterizate este mai bine observată pentru probele obținute prin presare cu 0.1 MPa, a căror porozitate scade odată cu creșterea concentrației de argint (fig. 4.28, detalii). După sinterizare (fig. 4.28) aspectul compact al probelor este mai pronunțat datorită coalescenței particulelor de hidroxiapatită, fenomen însotit de apariția unor pori izolați de dimensiuni reduse.

Dispunerea argintului în microstructură sugerează rolul său de agent de umectare locală în procesul de sinterizare, cu influențe favorabile asupra detensionării aglomerărilor de particule de hidroxiapatită, prin diminuarea forțelor de legătură între particule și de aderență a acestora la particulele adiacente [180]. De asemenea, efectul de peliculizare a microparticulelor de argint pe suprafața particulelor de hidroxiapatită a ușurat alunecarea particulelor ceramice, contribuind la compactarea materialelor.

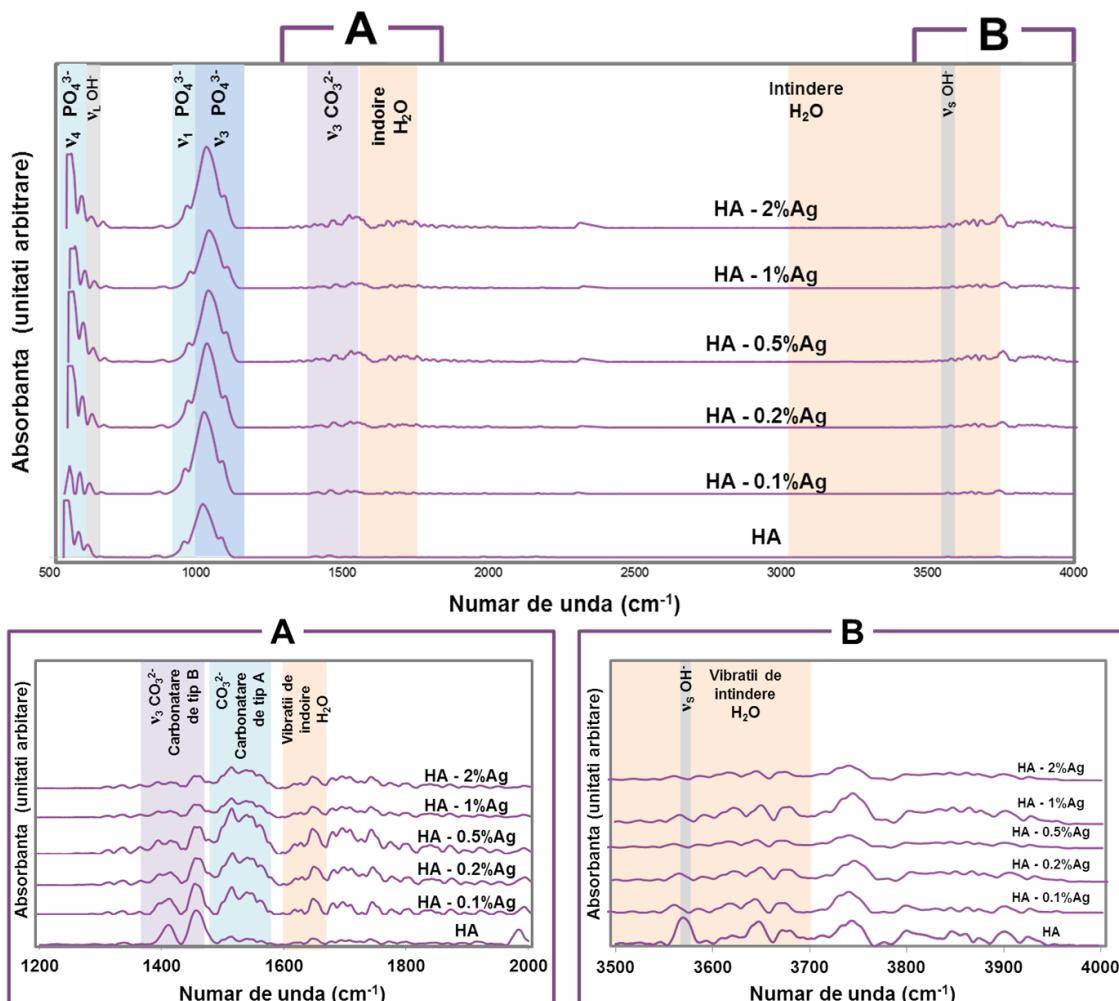
Modificările induse de sinterizare asupra argintului înglobat în HA (care definesc potențialul utilizării lui în detensionarea structurilor ceramice) se manifestă diferit în funcție de compoziția hidroxiapatitei utilizate, concentrația de argint înglobată și temperatura de sinterizare a materialelor. Pentru hidroxiapatita obținută prin sinteză chimică, s-a raportat că sinterizarea cu 0.2 – 1.2% Ag la 1150°C a dus la recristalizarea și evaporarea argintului, urmată de formarea de oxid de argint (AgO) la suprafața particulelor de hidroxiapatită [251]. Pentru concentrații mai mari de argint (5 - 30%), topirea acestuia a fost observată la sinterizarea între 1000 și 1200 °C a hidroxiapatitei comerciale, sub forma unor picături prezente la suprafața materialului (a căror dimensiune este influențată de concentrația de argint încorporată); înglobarea argintului în concentrație de 30% a dus nu numai la absența peliculizării ci și la organizarea argintului topit în particule (cu aglomerarea locală a particulelor și formarea de incluziuni de dimensiuni mari) prezente la suprafața hidroxiapatitei [253, 254] fenomen atribuit umectării reduse a argintului [253].

O observație imediată bazată pe fenomenele descrise în acest experiment confirmă că, în cazul hidroxiapatitei procesate termic la temperaturi superioare temperaturii de topire a argintului, încorporarea acestuia într-o formă nanostructurată nu este necesară. Topirea argintului și tendința de aglomerare a nanoparticulelor de argint - descrise în cazul dopării hidroxiapatitei utilizate pentru obținerea scaffold-urilor poroase [246] sau a acoperirilor [245], au fost raportate drept principalele cauze ale pierderii parțiale a nanostructurii argintului și formării de particule cu dimensiuni micrometrice la suprafața particulelor de hidroxiapatită.

### b) Prezența grupărilor funcționale

Spectrele FT-IR ale probelor de hidroxiapatită și argint obținute prin presare și sinterizare (fig. 4.29) conțin benzi caracteristice grupărilor fosfat prezente în hidroxiapatită:  $570\text{ cm}^{-1}$  ( $v_4\text{PO}_4^{3-}$ ),  $970\text{ cm}^{-1}$  ( $v_1\text{PO}_4^{3-}$ ) și  $1040\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$  ( $v_3\text{PO}_4^{3-}$ ). Benzile din regiunea  $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  indică prezența grupărilor carbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), deci o ușoară carbonatare a materialului, caracteristică pentru ceramicele preparate din țesut osos bovin. Benzile caracteristice grupărilor hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) au fost identificate la  $640\text{ cm}^{-1}$  și la  $3570\text{ cm}^{-1}$  [381].

Adiția argintului în probele de hidroxiapatită a adus modificări ale spectrelor în regiunile  $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ , corespunzătoare grupărilor carbonat, respectiv  $3500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , interval caracteristic vibrațiilor de întindere ale moleculelor de apă din hidroxiapatită. Ușoare modificări ale intensității benzilor au fost observate și în regiunea corespunzătoare  $v_4\text{PO}_4^{3-}$ . Variațiile de intensitate se manifestă în prezența argintului, însă nu sunt influențate de cantitatea încorporată.



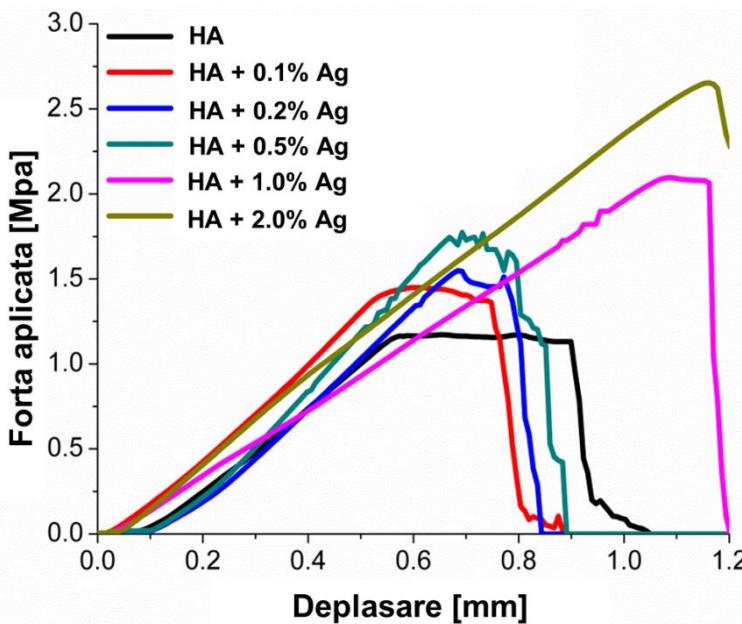
**Figura 4.29.** Prezența grupărilor funcționale în probele obținute după presarea cu 25MPa și sinterizarea hidroxiapatitei cu diferite concentrații (wt.%) de argint [348].

### c) Rezistență la compresiune

Creșterea adeziunii dintre particule odată cu creșterea concentrației de argint din microcompozitele cu hidroxiapatită este sugerată de morfologia probelor sinterizate (fig. 4.30). Influența argintului asupra detensionării aglomerărilor de particule de hidroxiapatită și o compactare mai bună a materialelor a fost observată îndeosebi pentru probele cu 1 wt.% și 2 wt% Ag.

Această ipoteză a fost verificată prin efectuarea unor încercări la compresiune pentru a stabili influența concentrației de argint asupra comportării mecanice a microcompozitelor sinterizate. Din curbele caracteristice, prezentate în fig. 4.30, se observă că rezistența la compresiune este îmbunătățită de adiția argintului. Epruvetele au prezentat o comportare mecanică similară în intervalul de concentrație 0.1 – 0.5 wt% Ag (rezistență la compresiune îmbunătățită moderat) și 1 – 2% (rezistență la compresiune îmbunătățită semnificativ)

Rezistența la compresiune este un indicator implicit al îmbunătățirii adeziunii dintre particule, deoarece reprezintă o exprimare cantitativă a unui grad de compactare mai ridicat, asociat cu suprafețe de contact extinse între particulele de hidroxiapatită și argint [180].



**Figura 4.30.** Curbe caracteristice obținute după încercarea la compresiune a microcompozitelor sinterizate din hidroxiapatită cu diferite concentrații de argint (exprimate ca procente de masă) [349]

#### d) Evaluarea efectului antibacterian al microcompozitelor HA-Ag

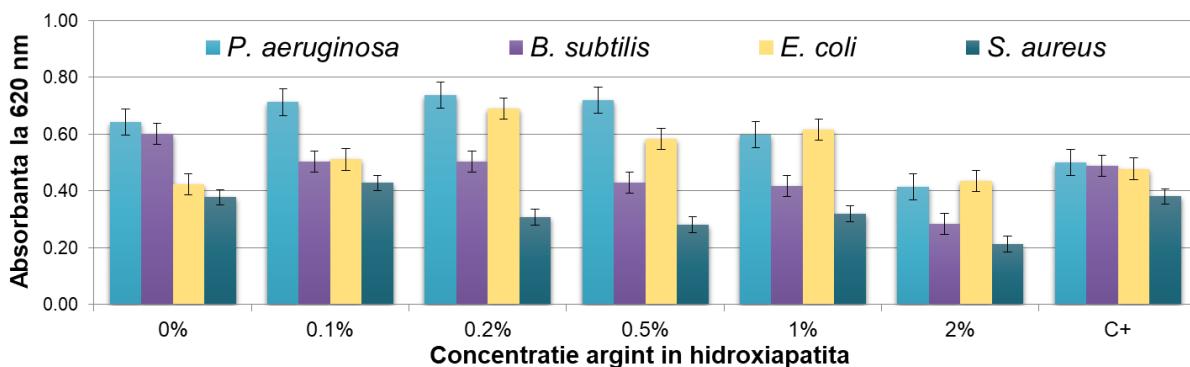
Etiologia infecțioasă a dispozitivelor medicale implantabile este caracterizată de o prevalență ridicată a speciilor stafilococice, între care *S. aureus* și *S. epidermidis*, dar și a altor patogeni precum *P. aeruginosa* și *E. Faecalis*. Într-un studiu efectuat pe un eșantion de 1027 de cazuri, cele 4 specii amintite au reprezentat cauza a 75% din infecțiile asociate diferitelor implanturi ortopedice, în vreme ce pentru restul de 25% dintre infecții au fost identificați 50 de alți agenți patogeni [408, 409]. Orientarea către cele câteva specii responsabile pentru majoritatea infecțiilor asociate implanturilor este considerată o strategie viabilă de reducere a incidenței acestor afectiuni [409]. Două dintre speciile amintite, *S. aureus* și *P. aeruginosa* alături de *B. subtilis* și *E.coli*, au fost utilizate pentru evaluarea efectului antibacterian al probelor obținute după adiția microparticulelor de argint în hidroxiapatita derivată din țesut osos bovin.

Evaluarea inhibiției creșterii bacteriene (fig. 4.31a) a arătat, pe de o parte, că hidroxiapatita obținută prin procesarea termică a țesutului osos bovin nu prezintă efect antibacterian, iar pe de altă parte că adiția de microparticule de argint cu concentrații cuprinse între 0.1 – 2% inhibă dezvoltarea speciilor bacteriene incluse în studiu și organizarea acestora în biofilme.

Compararea valorilor absorbanței soluțiilor de hidroxiapatită cu diferite concentrații de argint cu valorile obținute pentru martorul negativ a arătat că inhibiția creșterii bacteriene se manifestă direct proporțional cu concentrația de argint pentru toate speciile bacteriene testate (fig. 4.31a). Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru probele de hidroxiapatită cu 2% Ag (pentru care inhibiția creșterii bacteriene a fost observată pentru toate speciile testate) și respectiv pentru probele cu 1% Ag (care au inhibat activitatea speciilor *B. subtilis*, și *S. aureus*). Pentru probele de hidroxiapatită cu 2%Ag, cele mai puternice inhibiții, în raport cu martorul pozitiv, au fost observate pentru *B. subtilis* și *S. aureus* (reducere cu 45% a creșterii bacteriene). Aceste rezultate confirmă concluziile generale al unor studii similare, atât cu privire la lipsa caracterului antibacterian al hidroxiapatitei [241, 251] cât și cu privire la corelația dintre efectul antibacterian observat și concentrația de argint încorporată în material [240-244, 251, 410].

Evaluarea inhibiției biofilmului bacterian (fig. 4.31b) include rezultate însăcăzite de discrepanțe care sugerează că după dezvoltarea biofilmului (care odată ajuns la maturitate împiedică acțiunea antibioticelor [405, 411, 412]), inhibiția bacteriană este influențată de prezența argintului, însă nu depinde de concentrația sa. Aceste date confirmă faptul că argintul are rolul de agent antibacterian în hidroxiapatită însă fără a putea fi considerat un panaceu.

### a. Inhibitia cresterii bacteriene



### b. Inhibitia cresterii biofilmului bacterian

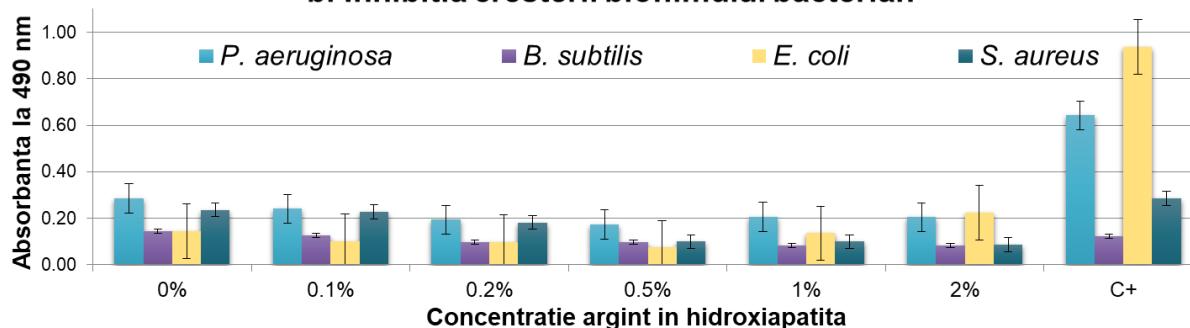


Figura 4. 31. Activitatea antibacteriană a hidroxiapatitei bovine cu diferite concentrații de argint [349]

Din analiza rezultatelor similare raportate anterior pentru diverse specii bacteriene reiese insuficiența informațiilor disponibile cu privire la: a) metoda optimă de încorporare a argintului în hidroxiapatită, b) concentrația de argint necesară pentru asigurarea unui efect antibacterian optim al hidroxiapatitei și c) necesitatea standardizării metodelor de evaluare a efectului antibacterian. Pentru unele specii bacteriene, precum *P. aeruginosa*, atât adăugarea a 2% Ag<sub>2</sub>O în hidroxiapatită utilizată pentru acoperiri ale unor metale biocompatibile [405] cât și încorporarea a 1-2% nanoparticule de argint în structura materialului [251, 252] au dus la concluzii similare indiferent de metodele de preparare sau de caracterizare utilizate; aceste concentrații asigură o inhibiție bacteriană satisfăcătoare. Însă pentru speciile bacteriene mai puternice, precum *E.coli* sau *S.aureus*, rezultatele nu sunt concludente: efectul antibacterian al argintului a fost raportat încă de la concentrații foarte mici (0.27 – 2.2 ppm) în hidroxiapatită [255, 413, 414] însă rezultatele obținute pentru probe cu concentrații mai mari de Ag - 0.05% [242], 0.5% sau 1.2% [240] (evaluate prin metode diferite) - au raportat că argintul fie induce doar un efect ușor antibacterian fie nu inhibă deloc dezvoltarea speciilor bacteriene. Astfel, concentrația minimă recomandată pentru asigurarea inhibiției speciilor rezistente la acțiunea antibioticelor variază între 0.2 – 0.3% [242] și 3% [241].

Stabilirea nivelului optim de concentrație a argintului pentru asigurarea unui efect antibacterian eficient se confruntă și cu limitări datorate caracterului toxic al concentrațiilor

mari de argint asupra celulelor mamiferelor [241, 255, 415-417]. Limita de toxicitate asociată argintului este un alt indicator care necesită elucidări. De exemplu, atât concentrațiile de 0.27 - 2.2 ppm Ag în HA propuse de Shi et. al [255] cât și concentrația de 3% în HA propusă de Rajendran et al [241] îndeplinește limitele de toxicitate impuse de programele experimentale respective (evaluate prin testare *in vitro*).

Evaluarea corectă a caracterului toxic al argintului ar putea deriva din înțelegerea mecanismului de acțiune al acestuia asupra celulelor bacteriene și umane deopotrivă. În prezent, mecanismul activității argintului asupra celulelor bacteriene nu este pe deplin elucidat, însă au fost formulate o serie de ipoteze complementare care descriu efectul bactericid al acestuia:

- ionii de argint penetrează membrana celulară și o separă, prin plasmoliză, de citoplasmă, apoi intervin la nivelul ADN-ului bacterian, afectând procesele de replicatie și producția de adenozin trifosfat (ATP), care stochează energia celulei și contribuie la conversia ei în funcție de necesitățile metabolice ale acesteia [418].
- nanoparticulele de argint acționează asupra membranei celulare prin interacțiuni electrostatice indusă de încărcările de la suprafața acestora apoi pătrund în citoplasmă și nucleu într-o mod similar acțiunii ionilor de argint [248, 419],

Mecanismul de acțiune al argintului asupra celulelor mamiferelor este incomplet descris în literatura de specialitate. Cu toate acestea, este cunoscut faptul că expunerea organismului uman la concentrații mari de argint poate induce efecte secundare indiferent de forma în care acesta se regăsește. Printre aceste efecte secundare se numără vătămarea rinichilor și a ficatului, iar expunerea pe termen lung duce la argyria, o afecțiune medicală generală sau localizată în care cele mai proeminent simptome sunt colorarea pielii și a tegumentelor într-o nuanță albastră [255, 420]. De asemenea, o serie de teste complementare ale nanocompozitelor de argint și hidroxiapatită, cu potențial efect antibacterian au arătat că nu există o formulă care să satisfacă concomitent cerințele de siguranță și de eficiență antibacteriană, datorită lipsei de selectivitate a argintului, care utilizează același mecanism de acțiune atât în cazul celulelor bacteriene cât și în cazul celulelor mamiferelor [421]. Deși aceste observații vizează materialele capabile să elibereze simultan argint sub formă ionică și sub formă de nanoparticule, clarificarea biocompatibilității hidroxiapatitei după adiția argintului rămâne una dintre principalele direcții de cercetare pentru validarea acestor materiale ca soluții pentru reconstrucția osoasă.

#### 4.4.4. Concluzii

În acest studiu a fost evaluat efectul antibacterian al argintului și utilizarea sa ca aditiv în sinterizarea hidroxiapatitei derive din țesut osos bovin. Evaluarea efectului antibacterian a confirmat influența concentrației de argint asupra inhibiției creșterii bacteriene a speciilor incluse în studiu, arătând totodată că în cazul dezvoltării biofilmului bacterian (circumstanță probabilă după implantare) argintul nu este un potențial panaceu, inhibiția biofilmelor nefiind corelată cu concentrația de argint încorporată.

Pe lângă efectul său antibacterian binecunoscut, argintul poate fi utilizat ca aditiv în sinterizarea hidroxiapatitei derive din țesut osos bovin. Particulele de argint utilizate în acest studiu au asigurat o distribuție bimodală a particulelor în amestecul pulverulent destinat sinterizării, contribuind la o mai bună împachetare a amestecului pulverulent în etapa de formare.

După tratamentul termic, mecanismul acțiunii argintului ca aditiv în sinterizare cuprinde: formarea unei topituri metalice, umectarea locală și peliculizarea pe suprafața particulelor ceramice, cu consecințe favorabile asupra detensionării aglomerărilor de particule de hidroxiapatită formate în etapele anterioare sinterizării. Rezultatele actuale necesită

completări pentru caracterizarea exhaustivă a adeziunii dintre particulele ceramice după acțiunea argintului: adeziunea mecanică este favorizată de morfologia hidroxiapatitei derive din țesut osos bovin, care facilitează pătrunderea și retenția topiturii de argint în spațiile dintre particule.

Acțiunea argintului a fost similară în sinterizarea probelor presate cu 0.1 MPa și 25 MPa. Sinterizarea cu argint a dus la obținerea unor materiale ceramice dense în cazul probelor presate cu 25 MPa, respectiv poroase în cazul probelor presate cu 0.1 MPa. Strategia de sinterizare a pulberilor poate fi îmbunătățită prin adiția unor agenți suplimentari pentru formarea porilor.

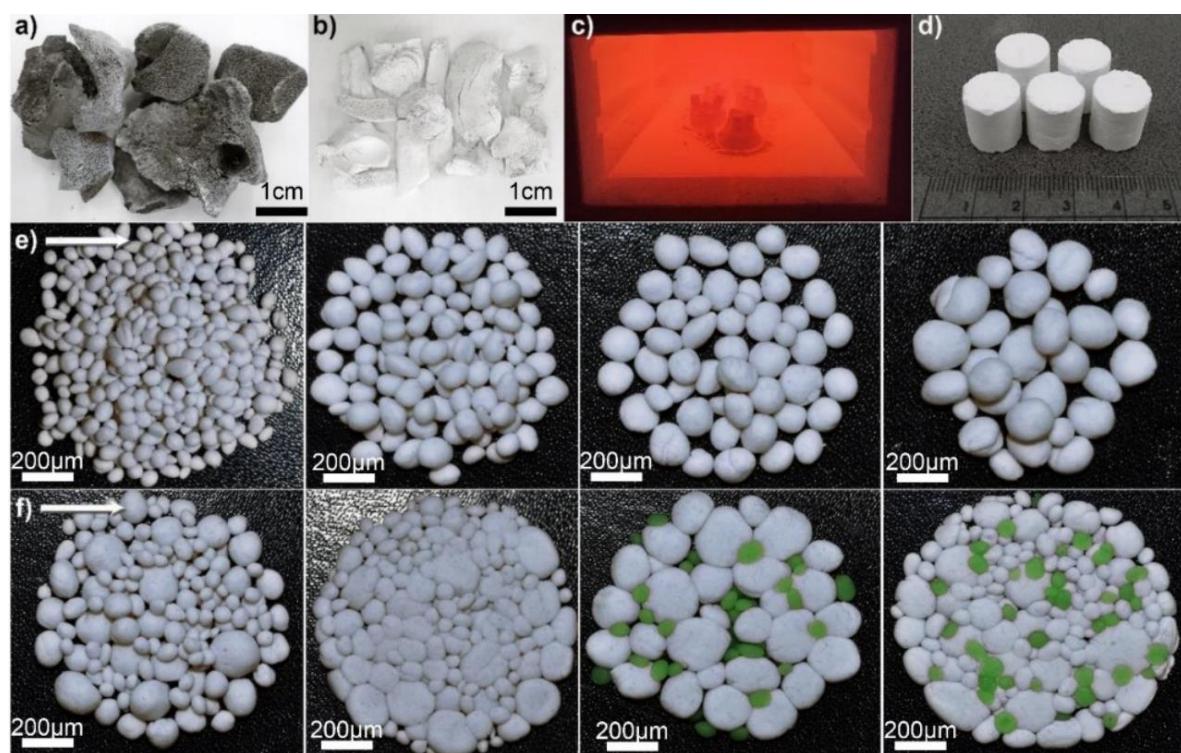
Utilizarea argintului sub formă de particule cu dimensiuni micrometrice creează perspective optimiste cu privire la perfecționarea metodelor de procesare și a proprietăților antibacteriene ale hidroxiapatitei derive din țesut osos bovin. Evaluarea acestor materiale necesită testarea complementară în cadrul unor studii extinse, pentru stabilirea biocompatibilității materialelor și a posibilităților de îmbunătățire a caracteristicilor acestora [348, 349].

## 4.5. Obținerea și caracterizarea unor structuri tridimensionale poroase din hidroxiapatită cu aplicații biomedicale

Acest studiu își propune să investigheze perspectivele fabricării produselor de reconstrucție osoasă din hidroxiapatită utilizând amidonul ca agent de consolidare și agent porogen. Hidroxiapatita derivată din țesut osos bovin și amidonul alimentar au fost materialele selectate ca precursori datorită caracterului non-toxic și adevărată pentru aplicațiile medicale [92, 256].

Probele din hidroxiapatită și amidon au fost preparate cu apă, fără a utiliza aditivi suplimentari, conform procedurii descrise în cap. 3.2.5. al prezentei lucrări. Concentrația de amidon și distribuția dimensiunii particulelor de hidroxiapatită au fost principalele variabile investigate; observații utile cu privire la influența dimensiunii și geometriei particulelor au fost de asemenea incluse în studiu [85]. Amestecurile de hidroxiapatită și amidon au fost presate la rece și au fost sinterizate într-un cuptor electric, în atmosferă de aer, la 1200°C, timp de 4 ore.

În acest studiu au fost utilizate următoarele notații: **HA a.p.** = pulberea inițială de hidroxiapatită; **Amidon a.p.** = pulberea inițială de amidon; **Gelificat** = referitor la compozitele gelificate; **Sinterizat** = referitor la corpurile sinterizate. Termenii „gelificat” și „sinterizat” sunt însotiti de conținutul de amidon, exprimat în procente de masă și raportat la concentrația de hidroxiapatită din probe (0%, 5%, 10%, 25% și respectiv 50%).

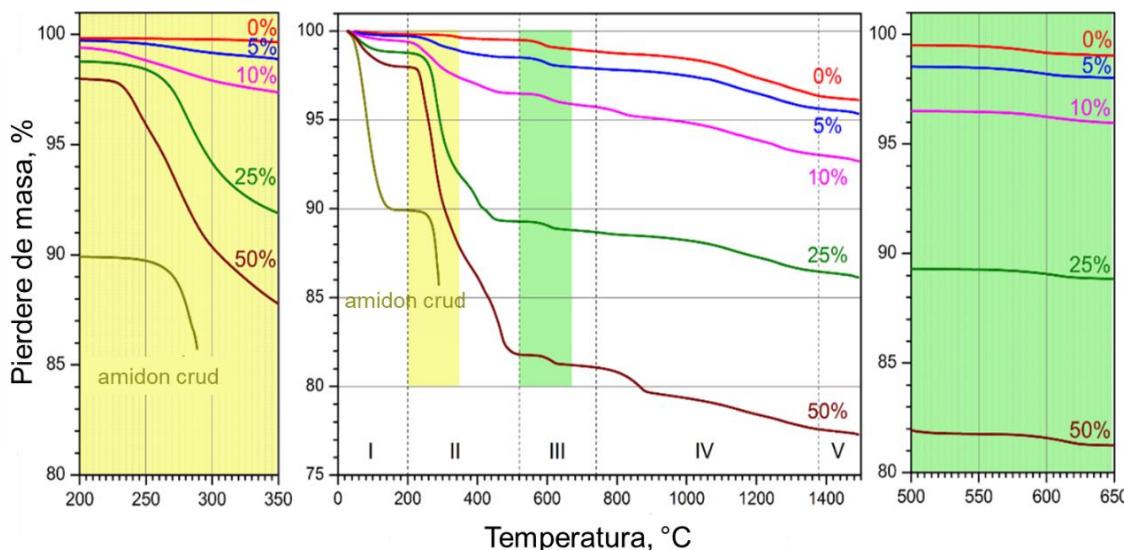


**Figura 4. 32.** Reprezentare grafică a metodei de preparare a compozitelor gelificate cu amidon:  
Țesut oso bovin deproteinizat; b) hidroxiapatită obținută după tratamentul termic la 1000°C; c) probe presate în timpul tratamentului termic; d) epruvete pentru caracterizare; e) reprezentare a pulberilor sortate utilizate pentru pregătirea probelor; f) reprezentare a materialelor HA-amidon după presare și tratament termic [85]

### 4.5.1. Stabilitatea termică a pulberilor precursoare

Rezultatele analizei termogravimetrice efectuate în timpul încălzirii în aer au permis împărțirea transformărilor termice în cinci domenii distincte (fig. 4.33):

- În primul domeniu, notat **I**, care începe la temperatura camerei și se încheie la 200°C, a fost înregistrată o pierdere de masă de ~10 % în cazul amidonului a.p. și ~0.2 % în cazul hidroxiapatitei a.p.
- În al doilea domeniu, notat **II**, între 200 și ~520°C, a fost înregistrată o pierdere de masă de ~3.8 % în cazul amidonului a.p. și de ~0.34% în cazul hidroxiapatitei a.p. Analiza termică a amidonului a.p. a fost înregistrată până la 288°C; după depășirea acestei temperaturi, gazul acumulat pe parcursul reacțiilor induse de încălzire a dus la o explozie violentă, deci datele TGA-DSC înregistrate pentru amidon peste acest nivel de temperatură nu sunt utilizabile pentru interpretare.
- În al treilea domeniu, notat **III**, între 520 și ~740°C, a fost înregistrată o pierdere de masă de 0.65% în cazul hidroxiapatitei a.p.
- În al patrulea domeniu, notat **IV**, 740 - 1379°C, a fost înregistrată o pierdere de masă de 2.50 % în cazul hidroxiapatitei a.p.
- În al cincilea domeniu, notat **V**, 1379-1500°C, a fost înregistrată o pierdere de masă de 0.23% în cazul hidroxiapatitei a.p.

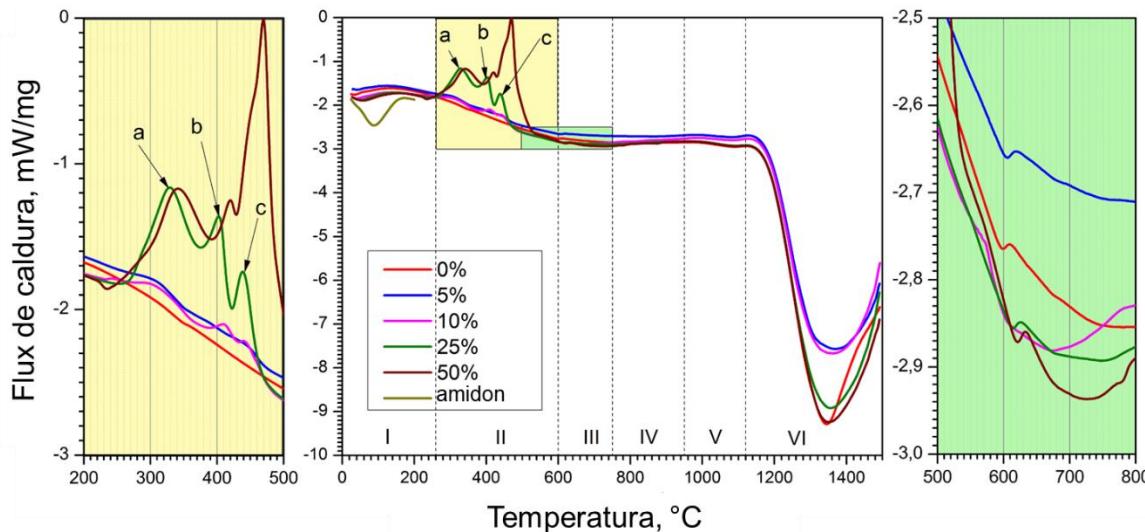


**Figura 4.33.** Curbe TGA ale HA a.p., amidonului a.p., și amestecurilor HA-amidon.  
Conținutul de amidon este exprimat ca procente de masă (%) [85]

Rezultatele DSC au identificat diferite transformări endotermice și exotermice aproximativ corespunzătoare domeniilor identificate de analiza TGA (fig. 4.34, tabelul 4.7):

- Primul domeniu DSC, selectat între temperatura camerei și 250°C, conține un vârf exotermic larg în cazul hidroxiapatitei a.p. și un vârf endotermic în cazul amidonului a.p., corespunzătoare transformărilor identificate în analiza TGA;
- Al doilea domeniu DSC, 250 - 600°C, conține un vârf exotermic larg și de intensitate redusă în cazul hidroxiapatitei și trei vârfuri exotermice (a, b și c) corespunzătoare amidonului.
- Al treilea domeniu, 600 - 750°C, include un vârf ușor exotermic corespunzător hidroxiapatitei
- Ultimele domenii conțin două vârfuri ușor endotermice (IV, V) și un vârf endotermic intens (VI), corespunzătoare hidroxiapatitei.

Transformarea endotermică a amidonului a fost asociată cu gelificarea acestuia [422] și evaporarea apei în exces, așa cum sugerează datele TGA (fig. 4.33). Efectele termice induse de amidon au fost observate în amestecurile pulverulente cu hidroxiapatită de la 200°C. Ulterior, amidon s-a descompus complet odată cu creșterea temperaturii (domeniile II-V, fig. 4.33).



**Figura 4. 34.** Curbe DSC ale HA a.p., amidonului a.p., și amestecurilor HA-amidon.  
Conținutul de amidon este exprimat ca procente de masă (%) [85]

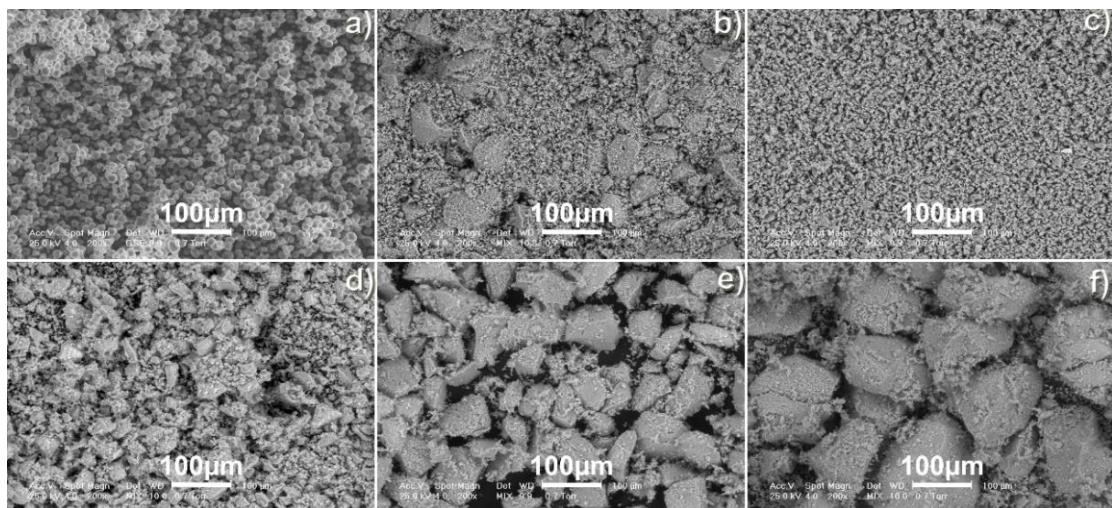
Hidroxiapatita a suferit o succesiune de transformări însoțite de pierderi de masă (fig. 4.34, Tabelul 4.7). La temperaturi joase, transformările au fost asociate cu evaporarea apei adsorbite și a grupărilor hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) de la suprafața materialului [317, 423]. Hidroxiapatita a demonstrat stabilitate termică până la  $\sim 1200^\circ\text{C}$ .

**Tabel 4. 7.** Domeniile transformărilor DSC, temperaturile de inițiere/finalizare a reacțiilor și pierderea de masă la temperatura de încheiere a reacțiilor pentru HA a.p., amidon a.p. și pulberi HA-amidon [85]

Domeniu	Tip fenomen termic	DSC		Pierdere de masă la $T_{\text{finală}}^\circ\text{C}$ (%)
		(încălzire în aer) $T_{\text{initială}}^\circ\text{C}$	$T_{\text{finală}}^\circ\text{C}$	
Amidon a.p.				
I	Endoterm	53.3	150.9	10
HA a.p.				
I	Exoterm	76	348	0.4
II	Exoterm	362	594	0.8
III	Exoterm	602	747	1.2
IV	Endoterm	848	950	1.5
V	Endoterm	996	1114	2.1
VI	Endoterm	1189	1431	3.8
50% HA- 50% amidon				
a	Exoterm	304	384	13.3
b	Exoterm	401	427	14.9
c	Exoterm	433	519	18.2

#### 4.5.2. Morfologia pulberilor precursoare

Morfologiile pulberilor precursoare de amidon și HA (sortată și amestecată) sunt prezentate comparativ în fig. 4.35. Pulberea de amidon (fig. 4.35a) conține particule cu aspect sferic și dimensiuni de  $10 - 20 \mu\text{m}$ . Suprafața particulelor de amidon este netedă, fără pori sau defecte. În pulberea de HA amestecată (fig. 4.35b) se disting particule din sorturile granulometrice prezentate în fig 4.35c – 4.35f. Forma și dimensiunea particulelor au permis umplerea spațiilor dintre particulele de mari dimensiuni cu particule de dimensiuni reduse.



**Figura 4. 35.** Morfologia pulberilor precursoare: a) amidon a.p. și HA a.p. cu diferite dimensiuni ale particulelor; b) amestec de HA (părți egale din sorturile din Fig. 4c-4f); c)  $<20\mu\text{m}$ ; d)  $<50\mu\text{m}$ ; e)  $<100\mu\text{m}$ ; f)  $<200\mu\text{m}$ . [85]

Pulberile de hidroxiapatită sortată cu dimensiuni mai mici de  $100\mu\text{m}$  (fig. 4.35c – 4.35e) conțin un număr redus de particule cu formă alungită și preponderent particule cu formă poliedrică neregulată, cu muchii ascuțite și suprafețe rugoase. Pulberea cu dimensiuni de  $100 - 200\mu\text{m}$  (fig. 4.35f) conține particule cu formă poliedrică și muchii rotunjite. La suprafața particulelor de dimensiuni mari au fost observate aglomerări de particule ceramice de mici dimensiuni ( $< 20\mu\text{m}$ ). Suprafața particulelor de HA prezintă pori de dimensiuni submicrometrice, formați în urma eliminării componentei organice din țesutul osos tratat termic [424]. O parte dintre particule prezintă fisuri, generate de măcinarea și sortarea granulometrică.

#### 4.5.3. Aspectul materialelor după formarea amestecurilor și după sinterizare

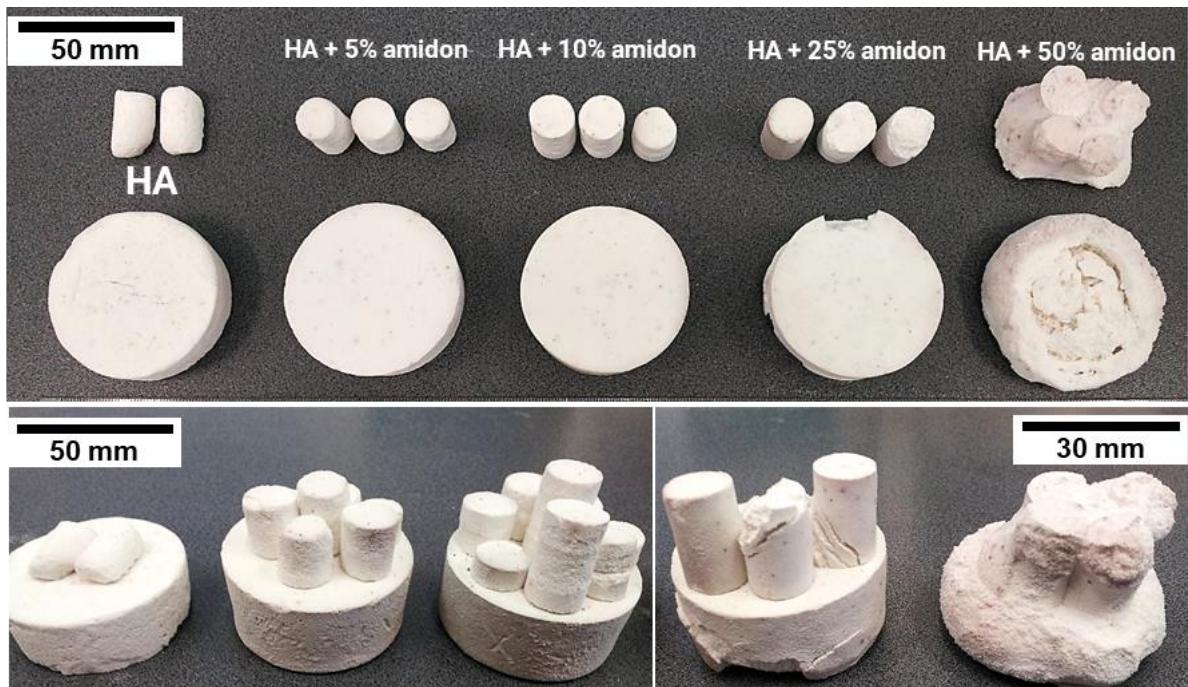
Amidonul a fost adăugat ca aditiv în amestecul destinat sinterizării hidroxiapatitei obținute din țesut osos bovin datorită capacitatei sale a a forma un gel în soluțiile apoase încălzite la temperatura de aproximativ  $70^\circ\text{C}$ . Utilizarea de geluri cu diferite concentrații de amidon a influențat procesul de formare a amestecurilor destinate sinterizării, facilitând modelarea acestora în forme cilindrice cu diferite dimensiuni. Aspectul semifabricatelor gelificate cu diferite concentrații de amidon este prezentat în fig. 4.36. Din imagine se observă că probele care conțin cantități mai mari de amidon au o formă mai definită, cu muchii ascuțite și suprafețe netede.



**Figura 4. 36.** Aspectul compozitelor gelificate cu diferite concentrații de amidon înaintea efectuării tratamentului termic de sinterizare (de la stânga la dreapta: 0, 5, 10, 25, 50wt. % )

După tratamentul termic de sinterizare, particulele de amidon din compozitia amestecurilor destinate sinterizării s-au degradat complet iar zonele din material în care au fost localizate aceste particule s-au transformat în pori. Aspectul probelor din hidroxiapatită și amidon după tratamentul termic este prezentat în fig.4.37. În imagine se observă că adiția unor

cantități crescute de amidon a afectat integritatea probelor tratate termic. Cea mai puternică influență a fost observată în cazul probelor preparate cu 50 wt.% amidon, a căror integritate a fost puternic afectată după tratamentul termic și nu a permis efectuarea încercărilor la compresiune programate în strategia experimentală. Depozitarea acestor probe în condiții normale de temperatură și umiditate a dus la pierderea completă a formei.



**Figura 4. 37.** Aspectul compozitelor gelificate cu diferite concentrații de amidon după efectuarea tratamentului termic de sinterizare (de la stânga la dreapta: 0, 5, 10, 25, 50wt. % )

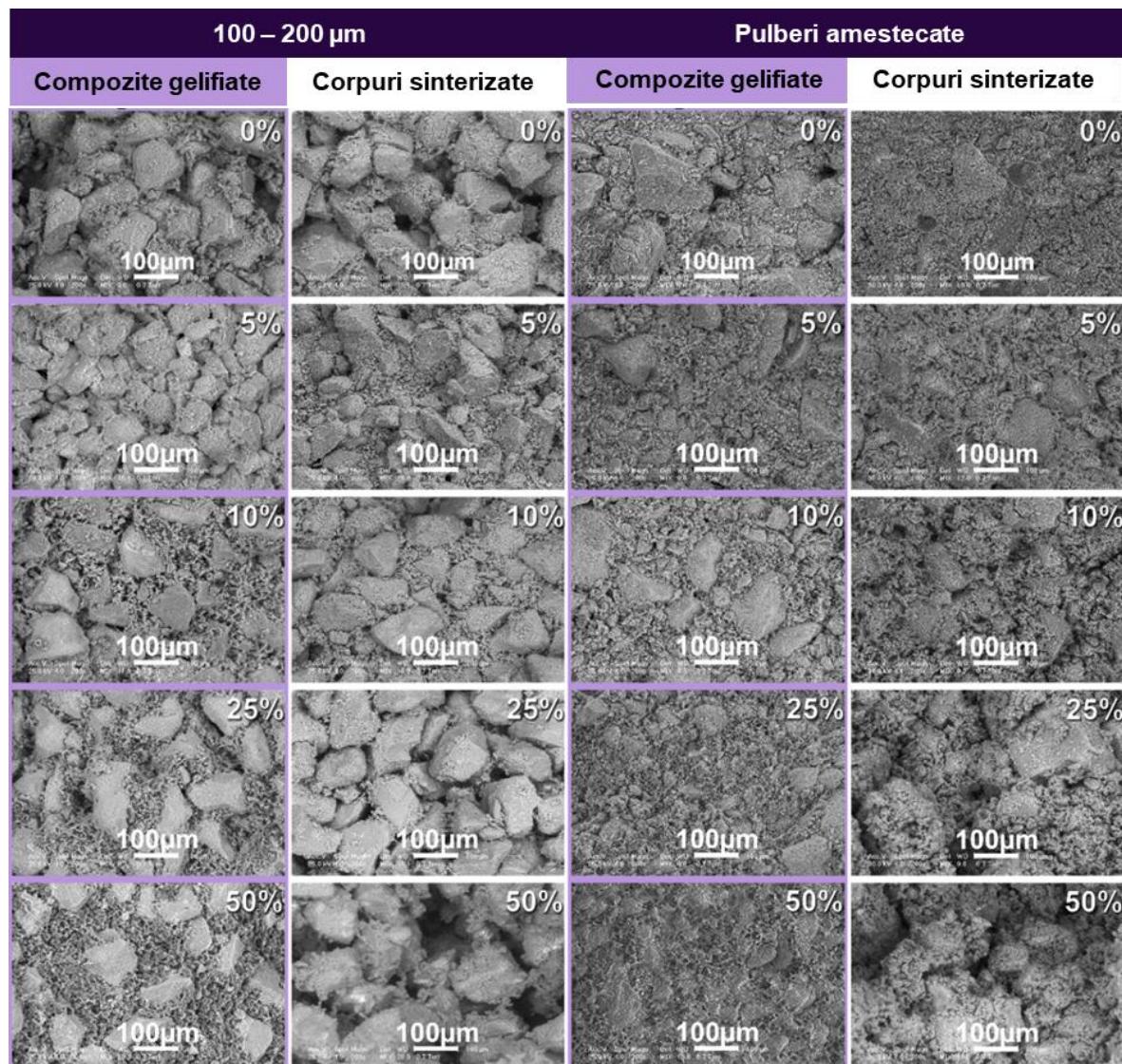
#### 4.5.4. Morfologia compozitelor gelificate și a corpurilor sinterizate

Morfologia compozitelor gelificate și a corpurilor sinterizate este prezentată comparativ în fig. 4.38 pentru diferite concentrații de amidon și distribuții granulometrice ale pulberilor precursoroare. Pentru evaluare au fost incluse în analiză probe de control constând din semifabricate și corpuri sinterizate din hidroxiapatită fără amidon.

Compozitele preparate cu pulberi sortate (100-200  $\mu\text{m}$ ) și diferite concentrații de amidon, prezentate în fig. 4.38, au un aspect compact, datorat presării isostatice. În componit se disting particule ceramice cu formă poliedrică. Probele conțin pori cu dimensiuni și forme variate, formati în spațiile dintre particulele ceramice. Adiția de amidon în concentrații reduse (HA- 5% amidon) a dus la compactizarea suplimentară a probelor datorită umplerii porilor. În probele cu concentrații de amidon mai mari de 10%, particulele de amidon, sferice și mai închise la culoare, s-au unit într-o rețea polimerică care a înconjurat particulele de hidroxiapatită. Adiția de amidon a asigurat o distribuție bimodală a pulberilor precursoroare, contribuind la reducerea porozității și consolidarea corpului semifabricat; observația este susținută de experimente similare, în care adiția de amidon în hidroxiapatită a contribuit la obținerea de cimenturi cu morfologii mai compacte, îmbunătățind totodată proprietățile mecanice ale datorită reducerii porozității [272].

Utilizarea pulberilor amestecate (fig. 4.38) a dus la compactarea suplimentară a semifabricatelor, porozitatea reducându-se semnificativ în comparație cu probele preparate cu pulberi sortate. Influența adiției amidonului este observată în probele cu concentrații crescute (25-50% amidon) în care particulele ceramice de dimensiuni mari sunt acoperite cu o peliculă de gel formată din particule de amidon și particule ceramice de mici dimensiuni.

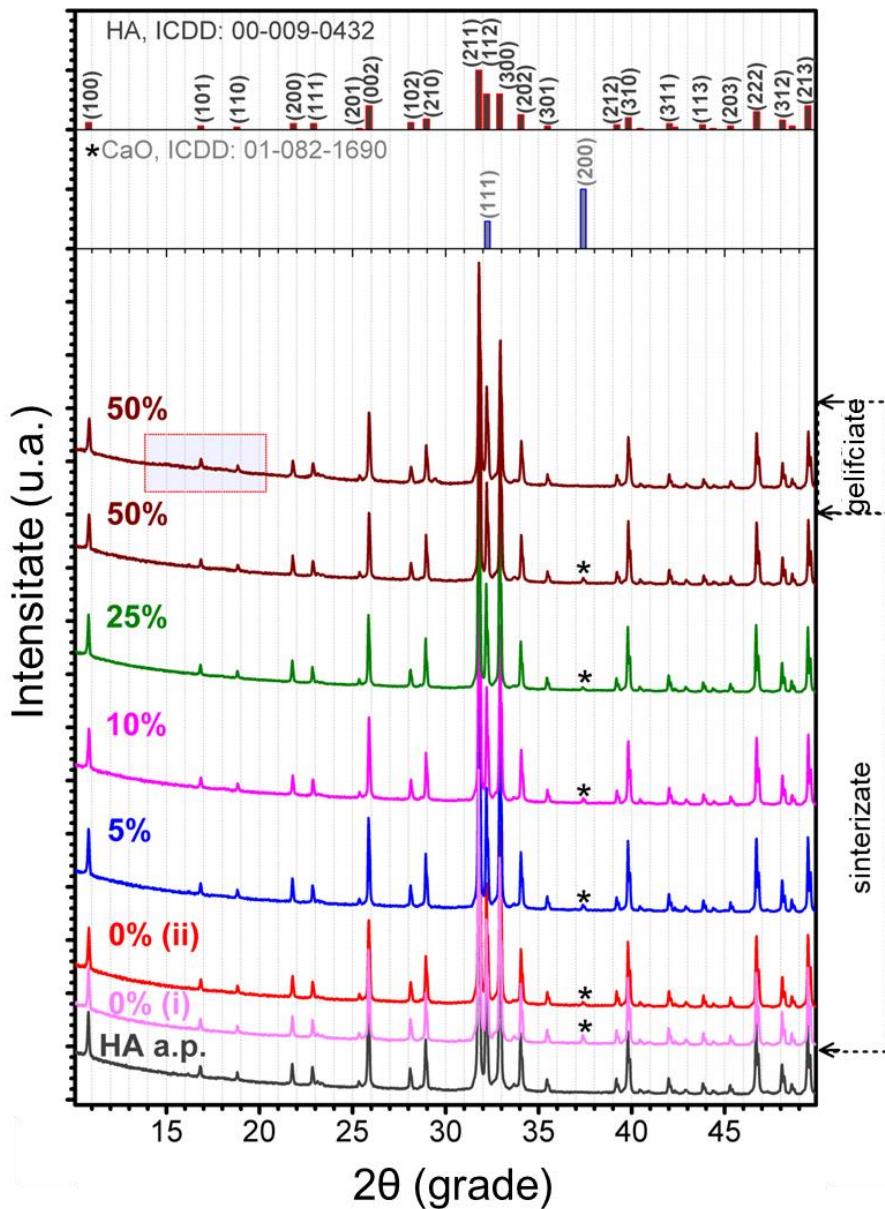
Tratamentul termic aplicat compozitelor a dus la degradarea termică și îndepărarea completă a amidonului. S-au obținut coruri ceramice poroase formate din particule consolidate de dimensiuni mari, la suprafața cărora aderă particule ceramice de dimensiuni reduse. Porozitatea corespunde formei și cantității particulelor de amidon gelificat [164]. Degradarea rețelelor polimerice observate în semifabricatele preparate cu concentrații mari de amidon a dus la formarea de pori interconectați, în acord cu studii similare [157, 164, 265, 269].



**Figura 4. 38.** Morfologia compozitelor gelificate HA-amidon (exprimat în wt.%) și a corpurilor sinterizate preparate cu pulberi de hidroxiapatită sortate (100 - 200µm) și amestecate [85]

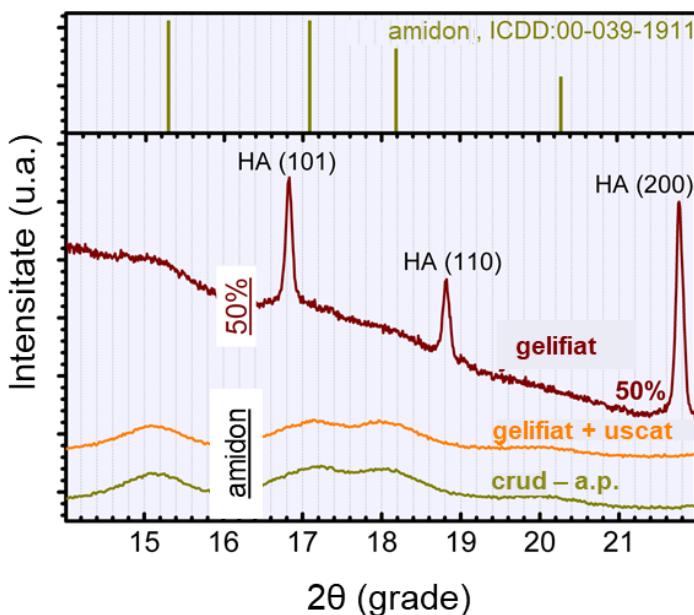
#### 4.5.5. Modificările structurale din timpul gelificării și sinterizării

Difractogramele pulberii de HA a.p. și a probelor de HA-amidon sunt prezentate comparativ în fig. 4.39. În figură sunt incluse, pentru evaluare, și difractogramele compozitului gelificat preparat cu 50% HA – 50% amidon, precum și cele ale materialelor de referință: pulbere de HA simplă, tratată termic, (i) în absență și (ii) în prezență probelor HA-amidon.



**Figura 4. 39.** Comparație între difractogramele reprezentative pentru pulberea de HA și amestecurile de HA-amidon, înainte și după tratamentul termic [85]

Prezența amidonului a fost evidențiată de XRD doar în cazul probei 50% HA – 50% amidon, sub forma unor proeminente diminuate în regiunea  $2\theta \approx 10\text{--}22^\circ$  (regiunea corespunzătoare evidențiată în fig. 4.39 este prezentată în detaliu în fig. 4.40). Acest fenomen este datorat stării cristaline (fig. 4.40) și densității reduse a amidonului, ceea ce se traduce într-o intensitate difractată redusă. În probele cu conținut redus de amidon, semnalul este ascuns în zgromotul de fundal. Din compararea pulberii de amidon a.p. și a amidonului gelificat (fig. 4.40) nu se observă modificarea ordonării cristaline a amidonului pe parcursul procesului de gelificare.



**Figura 4. 40.** Difractograma amestecului 50% HA-50% amidon înainte de tratamentul termic, prezentată în comparație cu difractogramele amidonului crud, gelificat, și respectiv gelificat și uscat [85]

După aplicarea tratamentului termic (*i.e.*, 1200°C/4h in aer) asupra amestecurilor HA-amidon, XRD nu a identificat modificări structurale semnificative, cu excepția apariției oxidului de calciu (CaO) ca fază secundară reziduală (fig. 4.39 – vârful marcat cu asterisc). S-a observat că atât dimensiunea medie a cristalitelor (~250 nm) cât și parametrii de rețea ( $a=9.419 \text{ \AA}$ ;  $c=6.882 \text{ \AA}$ ) ai HA au rămas relativ constanți în cazul tuturor amestecurilor sinterizate. Nu a fost observată o influență a prezenței amidonului asupra conținutul de CaO (fig. 4.39); conținutul său a fost estimat, prin metoda de rafinare Rietveld, la 0.35 – 0.70 wt.% în toate probele. De asemenea, prezența CaO într-o concentrație similară în ambele loturi de pulbere de HA – (i) tratată termic în absență și (ii) în prezența amidonului – întărește această ipoteză.

Este util de menționat că în standardele ISO 13779 [63, 367], care reglementează fabricarea implanturilor, un conținut de maxim 5 wt.% impurități (*i.e.*,  $\alpha$ -fosfat tricalcic,  $\beta$ -fosfat tricalcic, fosfat tetracalcic, și/sau CaO) în materialele hidroxiapatitice este considerat acceptabile pentru aplicații clinice. În consecință, concentrația de impurități din materialele propuse în acest studiu este situată semnificativ sub limitele impuse de standardele ISO 13779. Rezultatele din aceste studiu au precedent; studii anterioare au observat prezența CaO chiar și la 1000°C în materiale de tipul HA cu rapoarte molare Ca/P mai mari decât valoarea stoechiometrică teoretică (*i.e.*, 1.67) [93, 94].

#### 4.5.6. Grupările funcționale prezente în compozitele gelificate și structurile sinterizate

Spectrele FT-IR ale compozitelor gelificate și sinterizate sunt prezentate comparativ în fig. 4.41, respectiv fig. 4.43. Pentru o vizualizare facilă a rezultatelor, acestea sunt prezentate separat pentru regiunea de amprentă (fig. 4.41a și 4.43a) și pentru regiunea grupărilor funcționale (fig. 4.41 și fig. 4.43b). Spectrele pulberilor de HA a.p., amidon a.p. și oxid de calciu de puritate analitică (Sigma-Aldrich) sunt prezentate în fig. 4.41 și 4.43 ca materiale de referință.

Benzile tipice ale hidroxiapatitei [381] au fost identificate de FT-IR în toate probele analizate (Fig. 12): librație (~629 cm<sup>-1</sup>) și întindere (~3570 cm<sup>-1</sup>) a grupărilor hidroxil din

structura HA; și îndoire  $v_4$  ( $\sim 560 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ), întindere simetrică  $v_1$  ( $\sim 962 \text{ cm}^{-1}$ ), și întindere asimetrică  $v_3$  ( $1000 - 1090 \text{ cm}^{-1}$ ) a grupărilor ortofosfat [381, 383, 384].

În cazul amestecurilor HA-amidon, o parte dintre benzile IR caracteristice amidonului sunt acoperite de vârfuri de intensitate mai mare, caracteristice HA. O atribuire completă a grupărilor funcționale din amidon și hidroxiapatită este furnizată în Tabelul 4.8 [85].

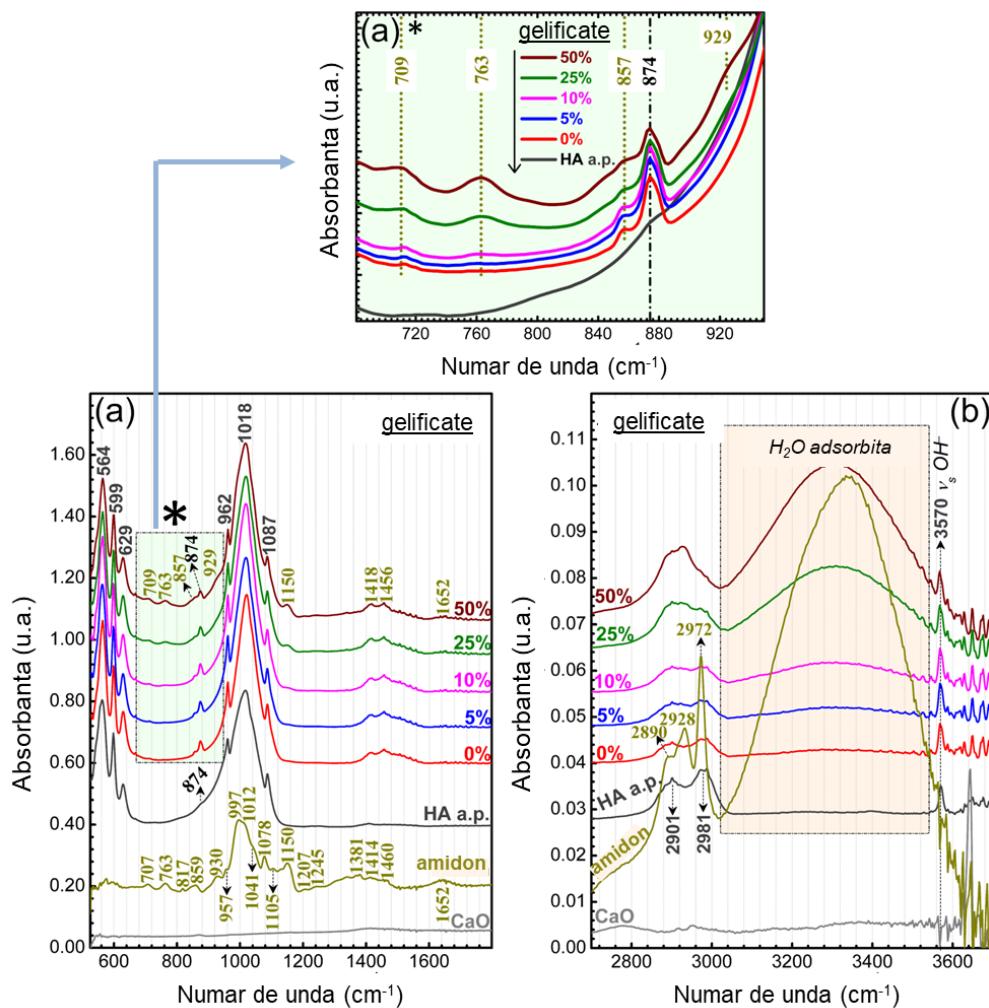
**Tabel 4.8.** Atribuirea benzilor FT-IR în probele de hidroxiapatită-amidon [85]

Pozitie ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuirea benzii
<b>564, 599</b>	Îndoire $v_4$ a grupărilor $(\text{PO}_4)^{3-}$ [381, 383, 384]
<b>629</b>	Librație a grupărilor $(\text{OH})^-$ structurale [381, 383, 384]
<b>709</b>	Îndoire a grupărilor $\text{OH}^-$ legate prin legături de hidrogen [425-427]
<b>763</b>	Oscilație a grupărilor $-\text{CH}_2$ [425-427]
<b>857</b>	Îndoire a legăturilor C–H [425-427]
<b>874 – 876</b>	Îndoire $v_2$ a grupărilor $(\text{CO}_3)^{2-}$ [381, 383, 384]
<b>929 – 930</b>	Vibrații în inelele benzenice; Îndoire a legăturilor C–O [425-427]
<b>957</b>	Îndoire a legăturilor C–O–C, C–O–H; Întindere a legăturilor CO [425-427]
<b>962</b>	Întindere simetrică $v_1$ a grupărilor $(\text{PO}_4)^{3-}$ [381, 383, 384]
<b>1018, 1087</b>	Întindere asimetrică $v_3$ a grupărilor $(\text{PO}_4)^{3-}$ [381, 383, 384]
<b>997, 1012, 1041, 1078, 1105, 1150, 1207, 1245</b>	Diverse vibrații de întindere ale legăturilor C–O–C și C–O–H [425-427]
<b>1381</b>	Îndoire în plan a grupărilor $-\text{CH}$ [425-427]
<b>1414</b>	Vibrații de întindere a legăturilor C–C [425-427]
<b>1460</b>	Întindere asimetrică $v_3$ a grupărilor $(\text{CO}_3)^{2-}$ [381, 383, 384]
<b>1652</b>	Îndoire a moleculelor de apă [381, 383, 384]
<b>2890 – 2901</b>	Întindere simetrică $v_2$ a legăturilor (C–H) din grupările $(-\text{CH}_2)$ [425-427]
<b>2928</b>	Întindere simetrică a legăturilor (C–H) din inelele benzenice [425-427]
<b>2972 – 2981</b>	Întindere asimetrică a grupărilor $(-\text{CH}_2)$ [425-427]
<b>3570</b>	Întindere a grupărilor $(\text{OH})^-$ structurale [381, 383, 384]
<b>3642</b>	Vibrații de întindere ale grupărilor $(\text{OH})^-$ de la suprafața compușilor $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [428-430]
<b>2500 – 3600</b>	Vibrații de întindere ale legăturilor (O–H) în moleculele de apă adsorbite [381, 383, 384]

În regiunile de absorbție redusă în cazul HA (fig. 4.41a), benzile de vibrație caracteristice amidonului au fost observate cu ușurință, având o intensitate similară și fără a prezenta modificări ale numărului de undă comparativ cu pulberea de amidon a.p.(fig. 4.42): îndoarea defazată a grupărilor  $\text{OH}^-$  legate prin legături de hidrogen ( $709 \text{ cm}^{-1}$ ), oscilația grupărilor  $-\text{CH}_2$  ( $763 \text{ cm}^{-1}$ ), îndoarea legăturilor C–H ( $857 \text{ cm}^{-1}$ ), vibrația inelelor benzenice și îndoarea legăturilor C–O ( $929 \text{ cm}^{-1}$ ), întinderea legăturilor C–O–C și C–O–H ( $1050 \text{ cm}^{-1}$ ), îndoarea ( $1652 \text{ cm}^{-1}$ ) și întinderea ( $2500 – 3600 \text{ cm}^{-1}$ ) moleculelor de apă adsorbită [381, 425-427]. Aceste rezultate oferă o primă indicație că structura amidonului nu este modificată semnificativ în timpul procesului de gelatinizare, confirmând rezultatele XRD [85].

Creșterea conținutului de amidon din materiale a dus la înregistrarea unor benzii mai proeminente, însotit de creșterea nivelului de hidratare al acestora (fig. 4.41). Ușoare modificări ale benzilor de vibrație au fost înregistrate în cazul vibrațiilor de întindere ale legăturilor C–C ( $1414 - 1418 \text{ cm}^{-1}$ ) și a vibrațiilor de îndoire în plan a grupărilor  $-\text{CH}_2$  ( $1460 - 1456 \text{ cm}^{-1}$ ) au fost observat pentru amidonul pur și amestecurile HA-amidon (fig. 4.41a). În aceeași regiune se suprapun benzile vibrațiilor de întindere în plan  $v_3$  a grupărilor carbonat prezente în structura HA [381, 383, 384], ceea ce a dus la modificarea aspectului vârfurilor. Prezența grupărilor carbonat în structura HA este susținută de vârful superficial poziționat la  $\sim 874 \text{ cm}^{-1}$  - corespunzător vibrațiilor de îndoire ale grupărilor - atât în cazul HA a.p. cât și în cazul

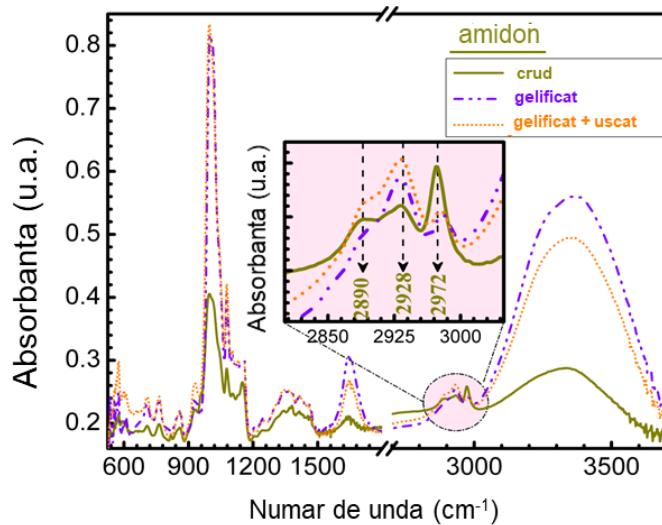
amestecurilor HA-amidon [381, 383, 384]. Carbonatarea este un fenomen tipic pentru materialele derivate din oase animale [431].



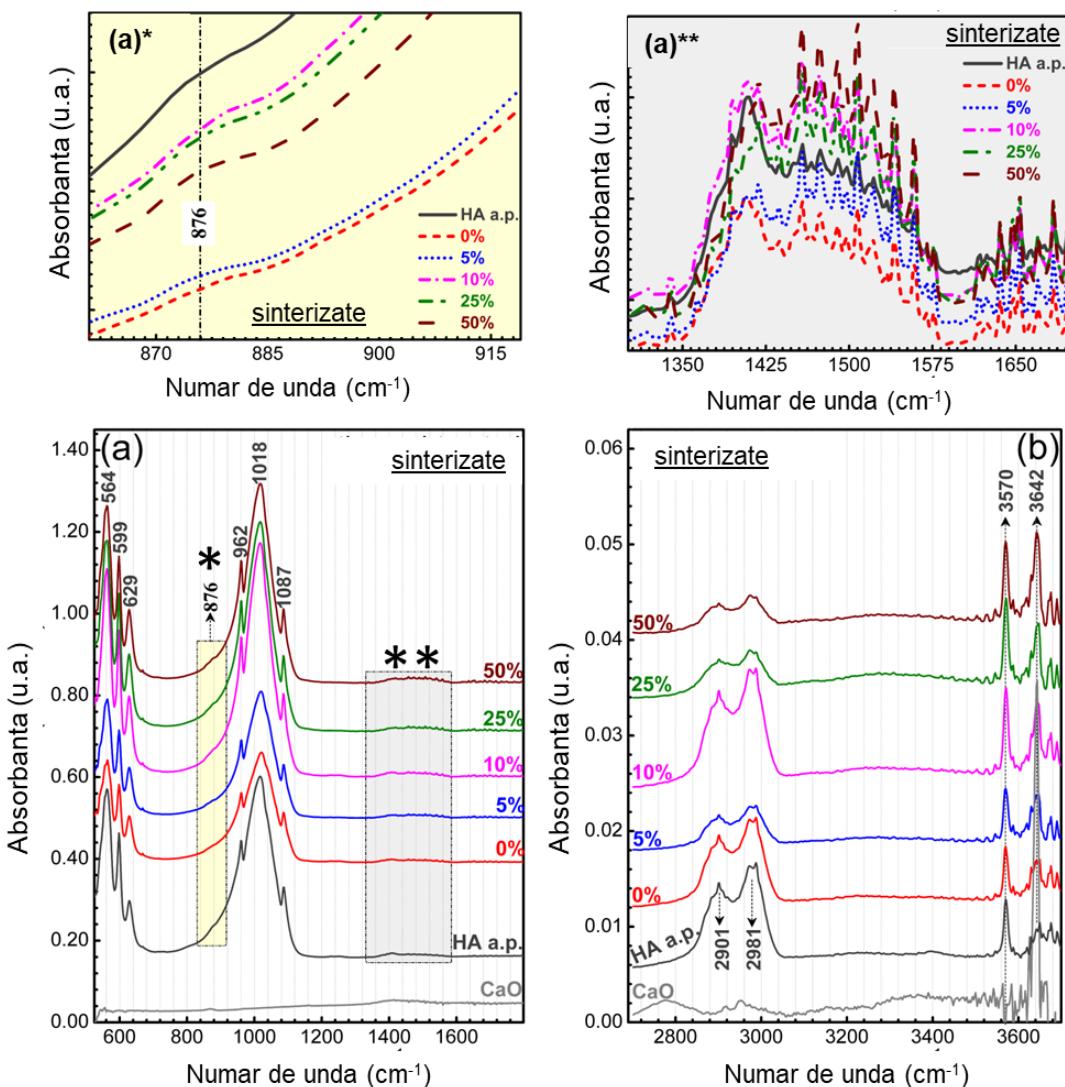
**Figura 4. 41.** Comparație între spectrele FT-IR înregistrate în regiunea de amprentă (a) și în regiunea grupărilor funcționale (b) ale pulberilor de HA, CaO și amidon, și ale compozitelor HA-amidon. Detaliu (a)\*regiunea 700-900 cm<sup>-1</sup>[85]

În continuare, sunt prezentate rezultatele unor măsurări FT-IR comparative efectuate pe probe de amidon în trei forme: crud, gelificat și gelificat + uscat la temperatura camerei (fig. 4.42). Amidonul a absorbit o cantitate semnificativă de apă în timpul gelificării, fenomen demonstrat de creșterea intensității benzilor corespunzătoare vibrațiilor de îndoire ( $1652\text{ cm}^{-1}$ ) și întindere ale moleculelor de apă adsorbită ( $2500 - 3600\text{ cm}^{-1}$ ). Pe lângă aceasta, au fost observate modificări ale intensității benzilor caracteristice vibrațiilor de întindere simetrică a legăturilor (C–H) din inelele benzenice ( $2928\text{ cm}^{-1}$ ) și întindere asimetrică a grupărilor ( $-\text{CH}_2$ ) ( $2972\text{ cm}^{-1}$ ) (fig. 4.42-detaliu), ceea ce sugerează că pe parcursul gelificării au avut loc ușoare perturbații ale mediilor chimice specifice acestor grupări [85].

Benzile duble poziționate în regiunea  $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  (fig. 4.41b și 4.43b), observate atât în cazul HA a.p. cât și amestecurilor HA-amidon, sunt atribuite diferitelor vibrații de întindere a legăturilor C-H determinate de contaminarea naturală a probelor cu hidrocarburi (*eng. adventitious hydrocarbons*) din timpul manevrării și depozitării în aer atmosferic. Forma acestor benzi este modificată numai în prezența unor cantități mai mari de amidon în probe.



**Figura 4.42.** Comparație între spectrele FT-IR ale amidonului în formă crudă, gelificată, respectiv gelificată și uscată. Detaliu: regiunea benzilor de întindere C-H ( $2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ ) [85]



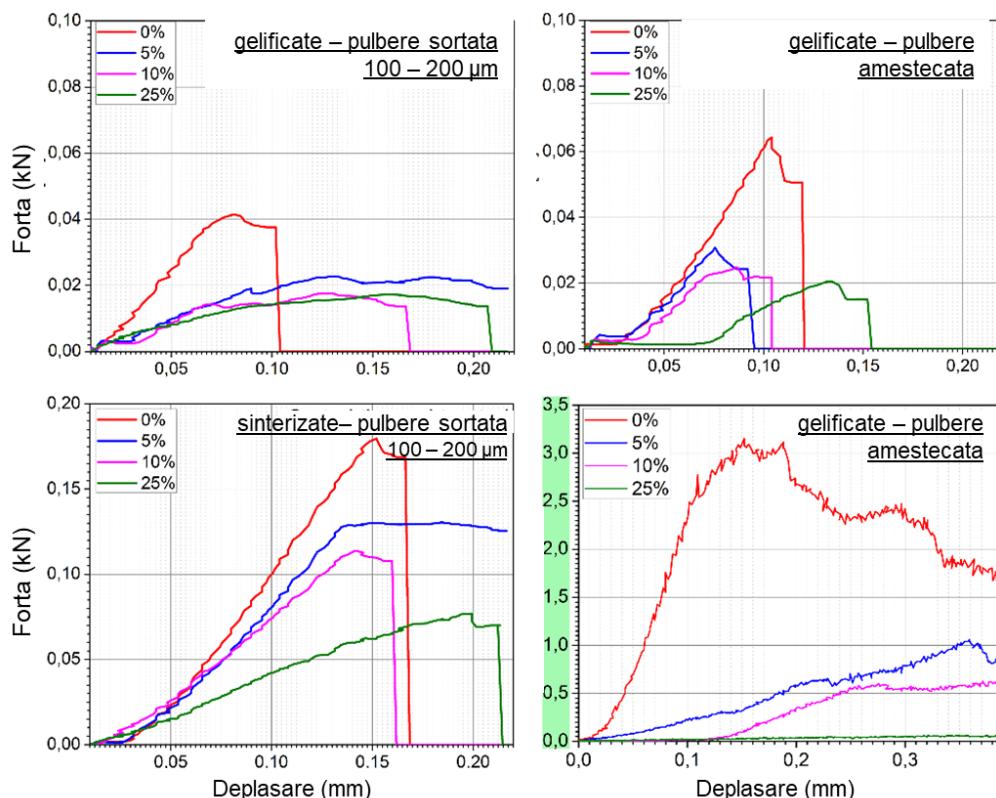
**Figura 4.43.** Comparație între spectrele FT-IR înregistrate (a), (a\*), (a\*\*) în regiunea de amprentă și (b) în regiunea grupărilor funcționale ale pulberilor de HA, CaO, și ale probelor HA-amidon după sinterizare [85]

În cazul amestecurilor HA-amidon sinterizate (fig. 4.43) a fost observată dispariția tuturor benzilor IR caracteristice amidonului. Totodată, poziția și aspectul benzilor caracteristice hidroxiapatitei (fig. 4.43a) este conservată față de amestecurilor gelificate și pulberea de HA a.p. (fig. 4.41a). Această observație denotă capacitatea excelentă a rutei termice alese de a elibera amidonul din corporile sinterizate și de a păstra nealterată structura materialului hidroxiapatitic. Carbonatarea hidroxiapatitei, ale cărei proprietăți biologice remarcabile sunt cunoscute [384, 432-434] a fost bine menținută după sinterizare (fig. 4.43a\* și 4.43a\*\*). Prezența vibrațiilor de întindere a legăturilor C-H, datorată contaminării naturale cu hidrocarburi a fost observată și în cazul probelor sinterizate (fig. 4.43b). Intensitatea acestora variază în funcție de gradul aleatoriu de contaminare [85].

Cu toate acestea, în spectrele tuturor amestecurilor sinterizare a fost înregistrată o nouă vibrație la  $\sim 3642 \text{ cm}^{-1}$ , caracteristică vibrațiilor de întindere ale grupărilor  $(\text{OH})^-$  de la suprafața compușilor  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  [428-430]. Aceasta este o consecință a naturii higroscopice a fazei  $\text{CaO}$  care este obținută ca produs rezidual în timpul sinterizării (fig. 4.43). În contact cu mediul, suprafața regiunilor de  $\text{CaO}$  adsoarbe molecule de apă și se hidrolizează parțial.

#### 4.5.7. Proprietățile mecanice ale componitelor gelificate și structurilor sinterizate

Curbele forță – deplasare ale epruvetelor gelificate și sinterizate (fig. 4.44) preparate din HA și HA-amidon au prezentat modificări ale pantei porțiunii liniare, ceea ce indică modificări în modul de preluare al solicitărilor și implicit în microstructura materialelor. Epruveta din HA a prezentat un comportament tipic fragil, fără deformații de natură plastică. Rigiditatea materialului și rezistența la compresiune au scăzut odată cu creșterea fracției masice de amidon. În cazul epruvetelor cu 5%wt. și 10%wt. amidon, pe curba forță – deplasare a fost observat un palier a cărui prezență este explicată de tasarea porilor din material. Epruveta cu 25%wt. amidon a prezentat un comportament maleabil, cu o scurtare semnificativă, de aproximativ 1.4 mm.

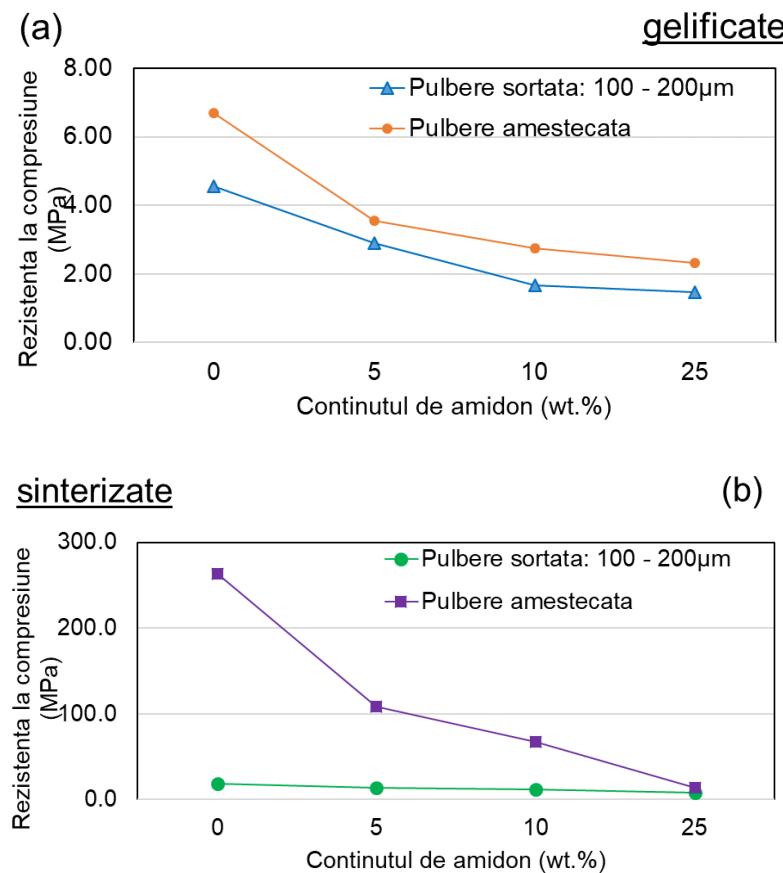


**Figura 4. 44.** Curbe forță-deplasare ale componitelor HA-amidon și ale probelor sinterizate. Conținutul de amidon din probe este exprimat ca procente de masă (%)[85].

Comportarea la compresiune a materialelor a fost condiționată de dimensiunea particulelor de hidroxiapatită. Datorită compactării diferite, epruvetele pregătite din pulbere nesortată au indicat o rezistență superioară datorită modului de aranjare al particulelor, crescând suprafața care poate prelua solicitarea. În cazul epruvetelor fără adăos de amidon a fost observată o diferență semnificativă între forțele la rupere, epruveta obținută fără sortarea pulberilor având o forță la rupere de 60N vs. 41N - epruveta cu amestecul sortat. Pentru epruvetele cu amidon, utilizarea pulberii nesortate de HA a dus la obținerea unor corpi mai rezistente dar mai fragile decât cele obținute cu pulbere sortată.

Sinterizarea a modificat drastic caracteristicile mecanice ale epruvetelor. Epruvetele realizate cu pulbere nesortată au prezentat caracteristici mecanice mult superioare față de cele cu pulbere sortată, forțele de rupere fiind, în cazul epruvetelor cu pulberi sortate, de aproximativ 5%, 13%, 18% și 27% din valoarea celor nesortate. De asemenea, a fost observată scăderea caracteristicilor mecanice ale epruvetelor sinterizate odată cu creșterea fracției masice de amidon.

Rezistența la compresiune a probelor gelificate (fig. 4.45a) a scăzut odată cu creșterea concentrației de amidon. Se observă de asemenea o influență minoră a repartiției granulometrice a pulberii de hidroxiapatită, probele preparate din pulberi cu dimensiuni 100 - 200 um având o rezistență la compresiune ușor scăzută față de probele pregătite cu pulberi amestecate, datorită densității de umplere mari a pulberilor amestecate și caracterului mai compact al probelor gelificate preparate cu acestea.



**Figura 4. 45.** Rezistența la compresiune a probelor (a) compozite și (b) sinterizate din HA și amestecuri HA-amidon. Conținutul de amidon este exprimat în procente de masă (%) [85]

Sinterizarea a indus o creștere majoră a rezistenței la compresiune (fig. 4.45b), comparativ cu probele gelificate. De asemenea, au fost observate diferențe semnificative datorate concentrației de amidon din probe și repartiției granulometrice a pulberilor de HA.

Influenta concentrației de amidon a fost semnificativă în cazul probelor preparate cu pulberi amestecate. Acestea au prezentat o rezistență mare la compresiune datorită compactității și numărului redus de pori. Rezistența la compresiune a scăzut brusc după adiția a 5%wt. amidon și a continuat să scadă odată cu creșterea concentrației acestuia. Fenomenul este explicat de porozitatea corpurilor sinterizate, care a fost accentuată de degradarea termică a amidonului din probe. În cazul probelor pregătite cu pulberi cu dimensiuni cuprinse între 100 - 200  $\mu\text{m}$ , rezistența la compresiune a prezentat valori mai mici comparativ cu probele preparate din pulberi amestecate, datorită porozității induse de repartizarea particulelor ceramice. În acest caz concentrația de amidon a avut o influență redusă asupra comportamentului mecanic al materialelor [85].

#### 4.5.8. Concluzii

Încorporarea amidonului ca agent de consolidare și agent porogen în hidroxiapatită permite fabricarea unor produse cu compoziție adecvată pentru aplicațiile medicale. Gelificarea materialelor pe bază de amestecuri HA-amidon a decurs fără modificări structurale semnificative ale celor două materiale componente. Cu toate acestea, utilizarea amidonului ca agent de consolidare este strict dependentă de temperatura pastei, deoarece gelificarea amidonului decurge într-un palier limitat de temperatură (60 - 80°C).

După sinterizare amidonul a fost degradat și eliminat complet, ceea ce a dus la obținerea unor corpuri consolidate din hidroxiapatită cu diferite nivele de porozitate, corespunzătoare cantităților de amidon incorporate în timpul consolidării și influențate de distribuția dimensiunii particulelor de HA (pulberi amestecate sau sortate granulometric). Concentrația maximă de amidon care a putut fi încorporată în amestecul ceramic a fost de 25 wt.% probele pregătite cu concentrații mai mari s-au prăbușit sub propria greutate după sinterizare.

Întrucât testarea mecanică a probelor sinterizate preparate cu HA sortată a relevat proprietăți mecanice modeste în comparație cu cerințele pentru scaffold-urile osoase, este recomandat ca în următoarele etape de fabricație să se utilizeze pulberi ceramice amestecate, cu o distribuție largă a dimensiunii particulelor [85].

## 4.6. Posibilități de obținere a unor prototipuri de produse tip scaffold pe bază de hidroxiapatită pentru reconstrucția defectelor osoase majore

În acest studiu s-a urmărit integrarea etapelor descrise în capituloare anterioare ale tezei de doctorat într-o tehnologie de fabricare a produselor tip scaffold. Obiectivele studiului au fost: a) verificarea (validarea) tehnologiei de fabricare prin obținerea unor prototipuri de produse tip scaffold și evaluarea preliminară a morfologiei și compozitiei acestora; b) proiectarea unor produse tip scaffold cu caracteristici adecvate pentru reconstrucția osoasă; c) fabricarea produselor tip scaffold cu caracteristicile proiectate.

### 4.6.1. Descrierea tehnologiei de fabricare a produselor tip scaffold

Pentru obținerea produselor tip scaffold, procedurile de lucru descrise în capitolul 3 al acestei lucrări au fost integrate într-o tehnologie de fabricare. Principalele etape ale acestei tehnologii sunt (fig. 4.46):

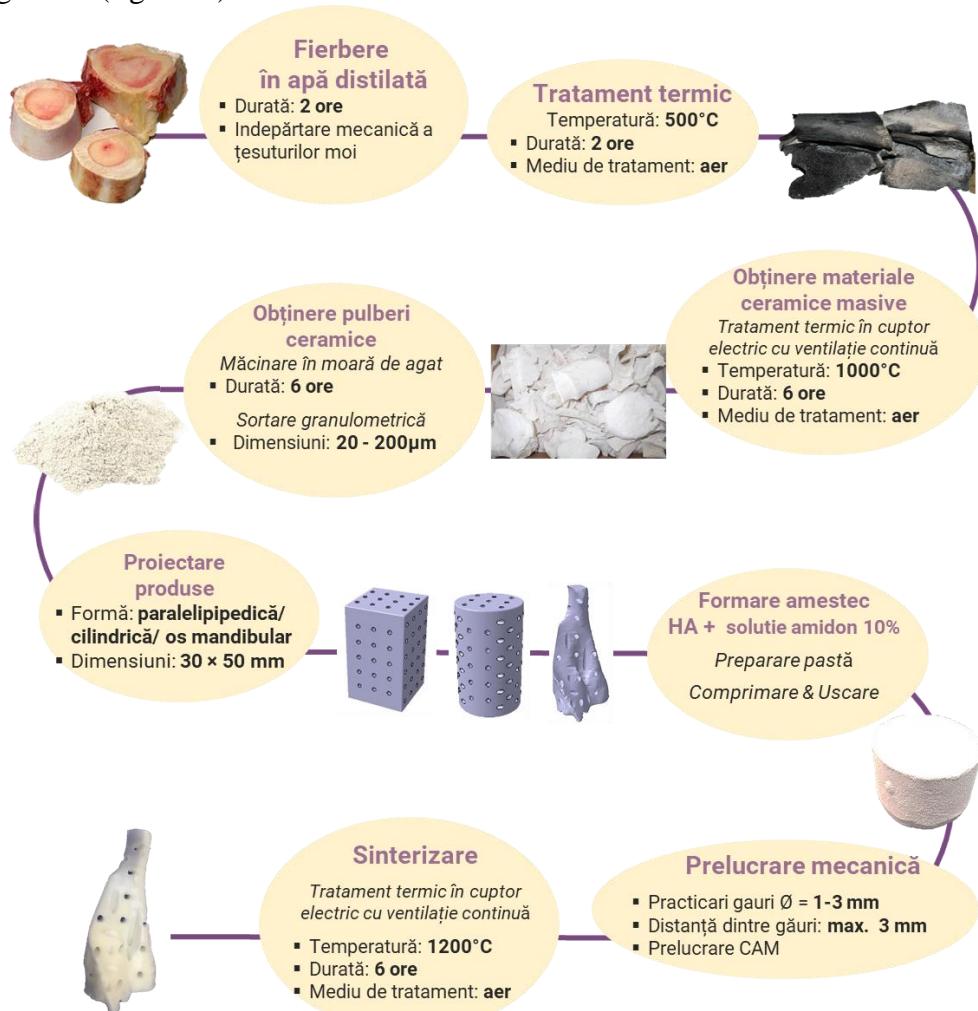


Figura 4. 46. Reprezentare schematică a proceșului de obținere a produselor ceramice

- obținerea de produse ceramice primare din țesut osos bovin deproteinizat;
- obținerea de pulberi ceramice prin măcinarea și sortarea granulometrică a produselor ceramice primare;
- obținerea de corpi sinterizate utilizând aditivi pentru consolidarea amestecurilor de sinterizare și formarea porilor;

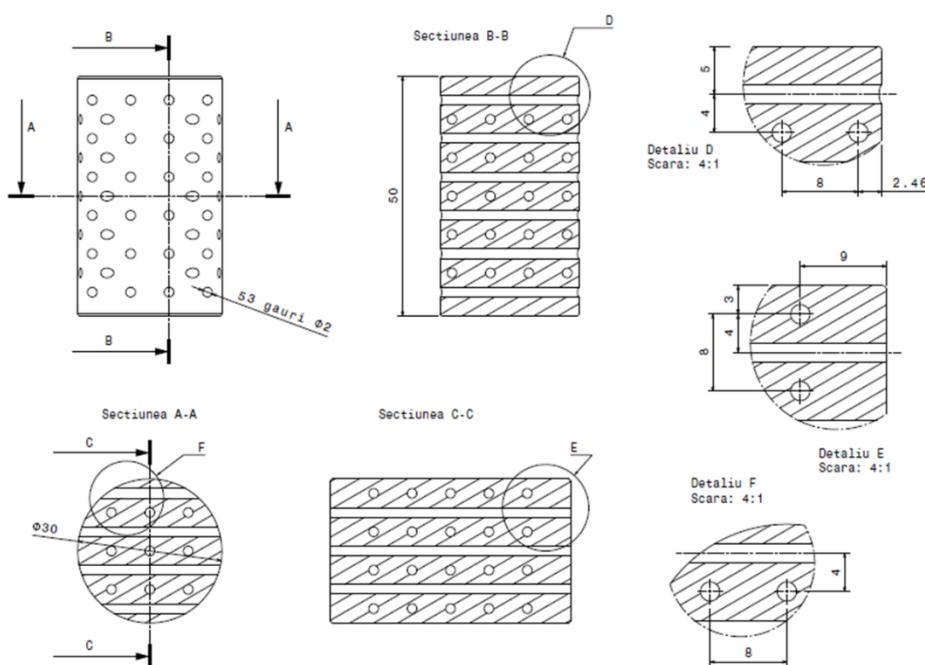
- prelucrarea mecanică prin debitare, găurire, prelucrare mecanică a suprafeței și/ sau procedee de fabricare asistată de calculator (CAM).

#### 4.6.2. Proiectarea produselor cu caracteristici adecvate pentru reconstrucția osoasă

După validarea tehnologiei de fabricare a produselor tip scaffold s-a urmărit proiectarea unor produse cu caracteristici adecvate pentru reconstrucția osoasă. Întrucât materialele ceramice derivate din țesut osos bovin prezintă o microporozitate intrinsecă rezultată din eliminarea prin tratament termic a componentelor organice din os, s-a urmărit controlul porozității prin utilizarea unor sorturi granulometrice care să asigure o porozitate adecvată după sinterizare și prin prelucrarea mecanică (găurirea) produselor care să asigure o distribuție adecvată a macroporilor. Scopul obținerii unor astfel de canale îl reprezintă irigarea structurilor poroase cu fluide corporale, ceea ce chirurgical, conferă un avantaj important, prin eliminarea cauzei principale de apariție a necrozelor.

**Tabel 4. 9.** Sumar al caracteristicilor proiectate pentru două variante de produs tip scaffold din hidroxiapatită cu aplicații în reconstrucția osoasă

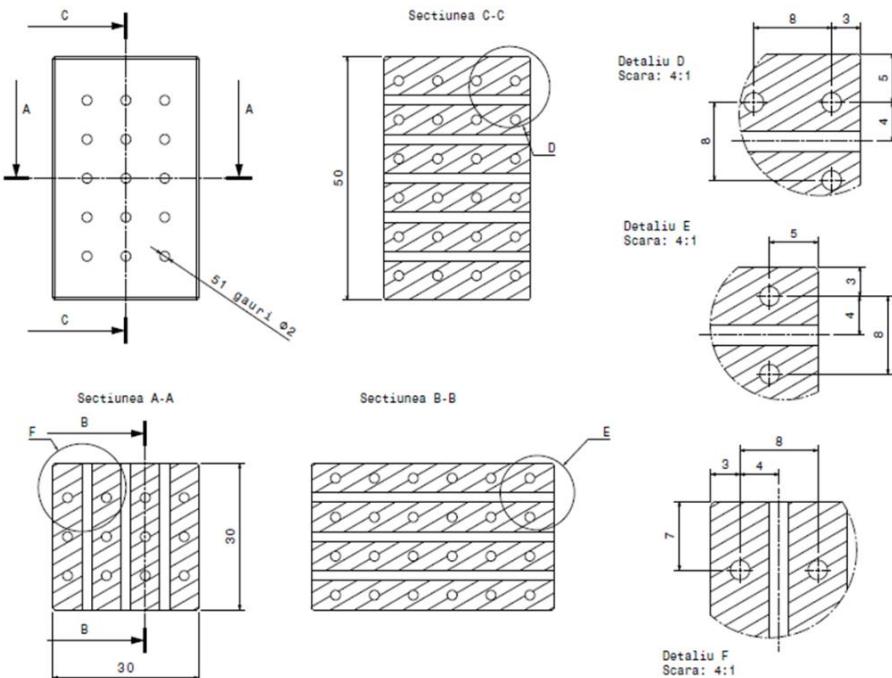
Varianta	1 – Scaffold cilindric	2 – Scaffold paralelipipedic
Forma	cilindrică	paralelipipedică
Dimensiuni – înălțime	50 mm	50 mm
Dimensiuni - bază	30 mm	30 mm
Metode de obținere a porozității	Microporozitate naturală Macroporozitate indusă de sinterizare cu amidon, controlul dimensiunii particulelor ceramice și prelucrare mecanică	
Dimensiuni găuri, mm	2 mm	2 mm
Distanța dintre două găuri	3 mm	3 mm
Compoziția materialului	Hidroxiapatită	



**Figura 4. 47.** Desen de execuție pentru un produs tip scaffold cu formă cilindrică

Produsele ceramice au fost proiectate în două variante; s-a urmărit proiectarea unui produs cilindric, cu diametrul cilindrului  $\varnothing = 30$  mm și înălțimea  $h = 50$  mm, și a unui produs paralelipipedic, cu baza pătrată cu latura  $1 = 30$  mm și înălțimea  $h = 50$  mm (Tabel 4.9).

Distribuția macroporilor (găurilor practicate) a fost proiectată astfel încât acestea să prezinte un diametru  $\phi = 2$  mm și distanța dintre oricare 2 găuri să fie  $d = 3$  mm. Pentru îndeplinirea acestor cerințe, a rezultat necesitatea practicării a 53 de găuri în produsul cilindric (conform desenului de execuție din fig. 4.47) și 51 de găuri în produsul paralelipipedic (conform desenului de execuție din fig. 4.48)



**Figura 4. 48.** Desen de execuție pentru un produs tip scaffold cu formă paralelipipedică

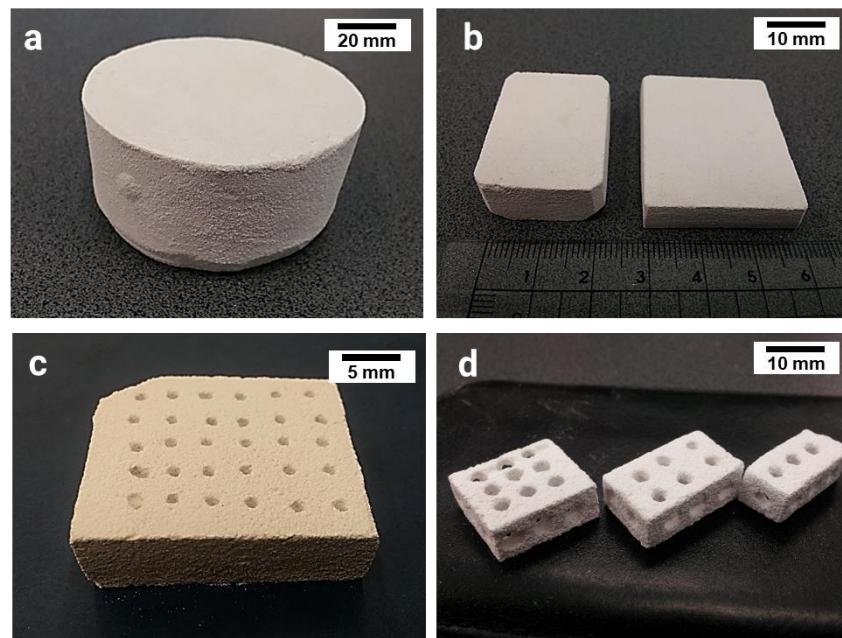
#### 4.6.3. Obținerea produselor-prototip

Schema tehnologică de obținere a unor astfel de produse înglobează rezultatele cercetărilor descrise în capitolele anterioare. Pentru prototipurile fabricate în acest studiu s-au debitat bucăți de țesut osos din partea centrală a femurului bovin care au fost deproteinizate prin fierbere în apă timp de 2 ore. După fierbere, resturile de țesut moale au fost îndepărtate mecanic. Deproteinizarea materiei prime s-a încheiat cu un tratament termic efectuat în cuptor electric, cu ventilație continuă; țesutul osos rezultat a fost tratat termic la 500°C, în aer, timp de 2 ore.

Componentele deproteinizate rezultate au fost supuse unui tratament termic în cuptor electric; materialul ceramic a fost tratat termic la 1000°C, în aer, timp de 6 ore. Materialele ceramice au fost măcinate într-o moară cu bile, timp de 6 ore. O parte a pulberii rezultate a fost sortată granulometric pentru a asigura dimensiuni ale particulelor cuprinse între 100 – 200 µm.

Pulberea ceramică (sortată și nesortată) a fost omogenizată și amestecată cu o soluție de apă și amidon (10 %wt. amidon raportat la cantitatea de pulbere ceramică). Pasta obținută a fost turnată în forme și presată la 25 MPa pentru a obține corpuri cilindrice cu diametrul de 50 mm și înălțimea de 50 mm (fig. 4.49a). Corpurile cilindrice au fost uscate în aer, la temperatură camerei, timp de 120 de ore.

După formare, corpurile cilindrice au fost debitate în forme paralelipipedice ( $30 \times 20 \times 10$  mm – fig. 4.49b) și prelucrate mecanic prin găurire cu un burghiu cu  $\varnothing = 1-2$  mm, păstrând o distanță  $d = 2-3$  mm între oricare 2 găuri practicate (fig. 4.49c și 4.49d). Semifabricatele astfel obținute au fost sinterizate în cuptor electric, cu ventilație continuă, la 1200°C, timp de 6 ore.



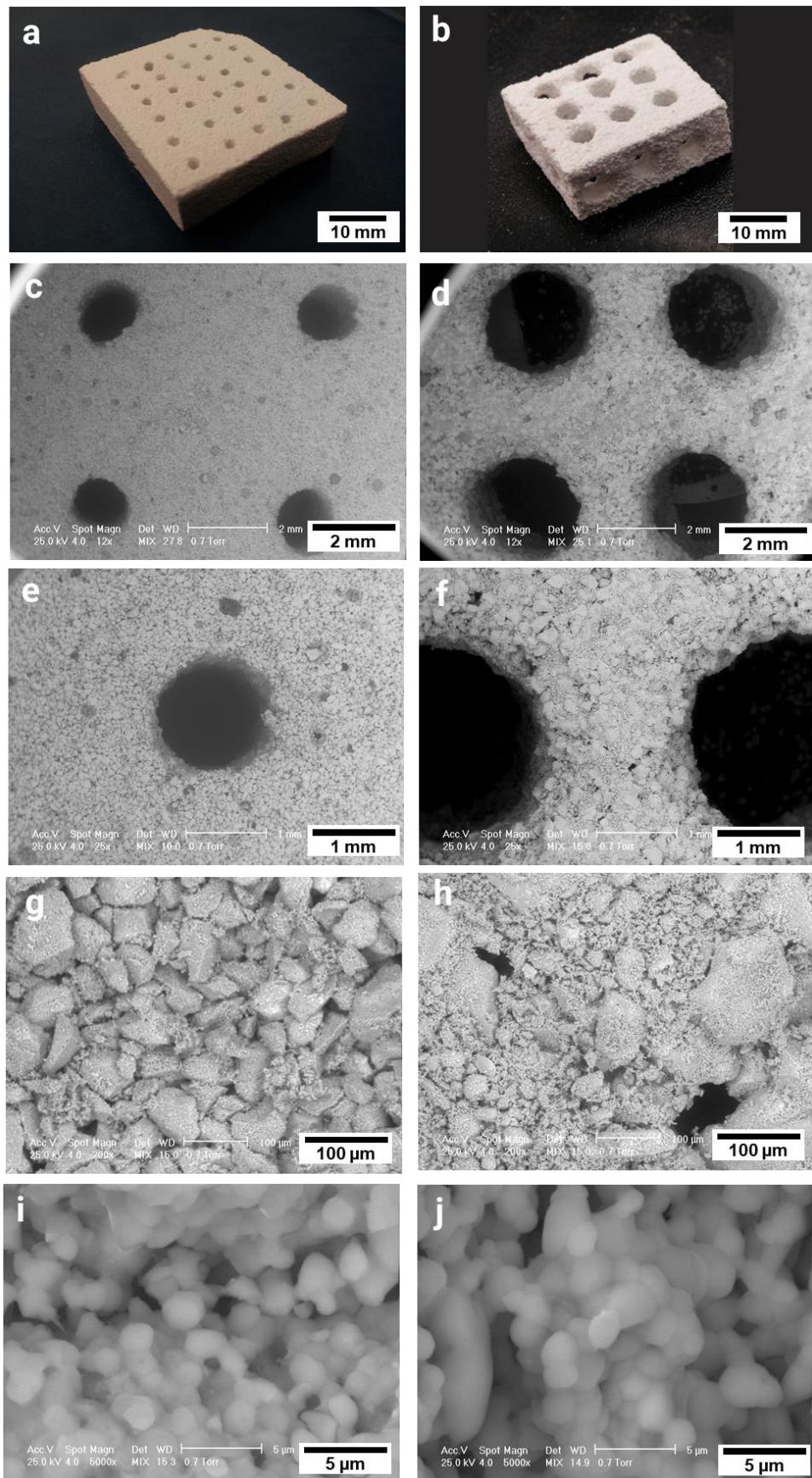
**Figura 4.49.** a) Corp ceramic obținut după sinterizare; b) semifabricate debitate din corpul ceramic sinterizat; c) produs tip scaffold, cu dimensiuni  $20 \times 25 \text{ mm}$ , după găurire ( $\phi = 1 \text{ mm}$ ; distanța dintre găuri  $d = 3 \text{ mm}$ ); d) produse tip scaffold, diferite dimensiuni, după găurire ( $\phi = 2 \text{ mm}$ ; distanța  $d = 2 \text{ mm}$ )

#### 4.6.4. Evaluarea morfologiei și a compoziției prototipurilor

Aspectele morfologice și raportul atomic Ca/P, calculat pe baza rezultatelor analizei compoziționale a două produse tip scaffold obținute după aplicarea tehnologiei descrise în cap.4.6.1. sunt prezentate comparativ în fig. 4.50.

Imaginiile din fig. 4.50a și 4.50b reprezintă fotografii ale produselor tip scaffold cu formă paralelipipedică. Corpul prezentat în fig. 4.50a are dimensiuni de  $30 \times 30 \times 10 \text{ mm}$ , iar prezentat în fig. 4.50b  $20 \times 20 \times 10 \text{ mm}$ . De asemenea, primul produs (fig. 4.50a) prezintă găuri cu dimensiuni mai mici ( $\phi = 1 \text{ mm}$ ) practicate la distanțe mai mari (distanța dintre găuri  $d = 3 \text{ mm}$ ) în comparație cu cel de-al doilea produs ( $\phi = 2 \text{ mm}$ ; distanța  $d = 2 \text{ mm}$ ).

Rezultatele analizei SEM prezentate în fig. 4.50c – 4.50f confirmă dimensiunile găurilor și a distanțelor dintre acestea. De asemenea, se observă că produsele prezintă o morfologie caracteristică pentru materialele ceramice obținute din sinterizare, în care corpul solid este alcătuit din numeroase particule micrometrice bine consolidate. Forma, dimensiunea și distribuția particulelor sunt prezentate în fig. 4.50g și 4.50h. Se observă că primul produs (fig. 4.50g) a fost obținut din sinterizarea pulberilor sortate, cu dimensiuni ale particulelor de  $100 - 200 \mu\text{m}$  și distribuție uniformă, iar cel de-al doilea reper (fig. 4.50h) a fost obținut din sinterizarea unor pulberi ceramice nesortate granulometric, cu o distribuție mai largă a dimensiunii particulelor. Este reliefată prezența unor pori de dimensiuni micrometrice, dispuși aleator, formați în spațiile dintre particulele ceramice. În figurile fig. 4.50i și 4.50j, la măriri mari, este evidențiată o microstructură similară pentru ambele produse, cu microparticule ceramice cu formă poliedrică tipică pentru materialele ceramice obținute prin sinterizare și cu distribuție dimensională uniformă.



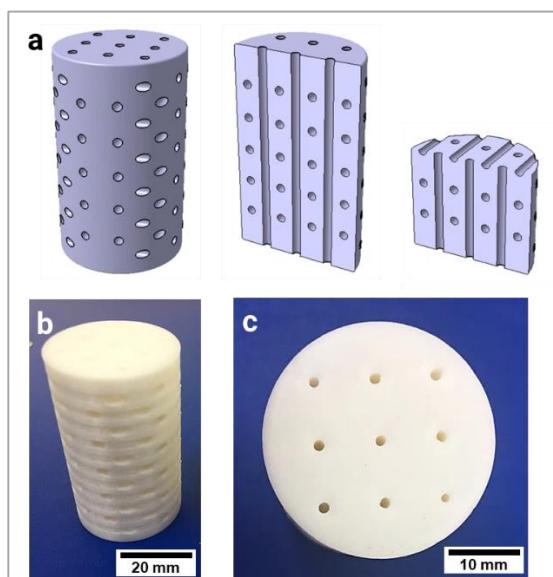
**Figura 4.50.** a, b) Aspectul produselor ceramice obținute prin aplicarea tehnologiei de fabricare propuse; c-j) aspecte morfologice ale produselor ceramice relevante de rezultate ale analizelor SEM

Similaritatea celor două microstructuri validează reproductibilitatea morfologiei produselor în condiții diferite de fabricare (produsele se deosebesc prin dimensiunea sorturilor granulometrice utilizate în sinterizare și prin distribuția marcoporilor obținuți prin găurile).

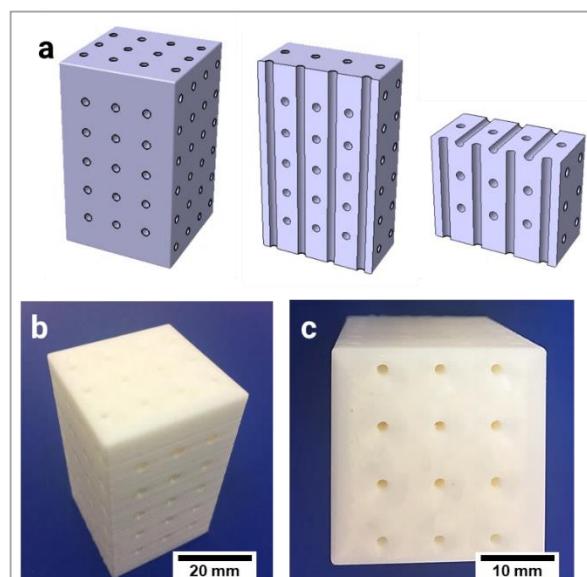
Raportul atomic Ca/P prezentat în fig. 4.50c și 4.50d a fost calculat pe baza rezultatelor analizelor EDS efectuate pe produse. Raportul Ca/P calculat pentru primul produs este 1.93, iar raportul calculat pentru cel de-al doilea produs este 1.68. Valorile sunt caracteristice pentru materialele ceramice pe bază de fosfați de calciu și variază în intervalul raportat în etapele anterioare de caracterizare.

#### 4.6.5. Prezentarea produselor obținute după prelucrare mecanică

Folosind tehnologia propusă și respectând cerințele impuse prin proiectare, pot fi obținute corpuri tridimensionale cu forme complexe. Inițial se obține prin presare în matriță un produs cilindric, din care poate fi debitat un corp cu formă paralelipipedică, pentru ușurarea operației de prelucrare prin găurile. Produsele sunt prezentate în comparație cu schemele de reprezentare tridimensională generate de programul utilizat pentru proiectare (Catia V5).



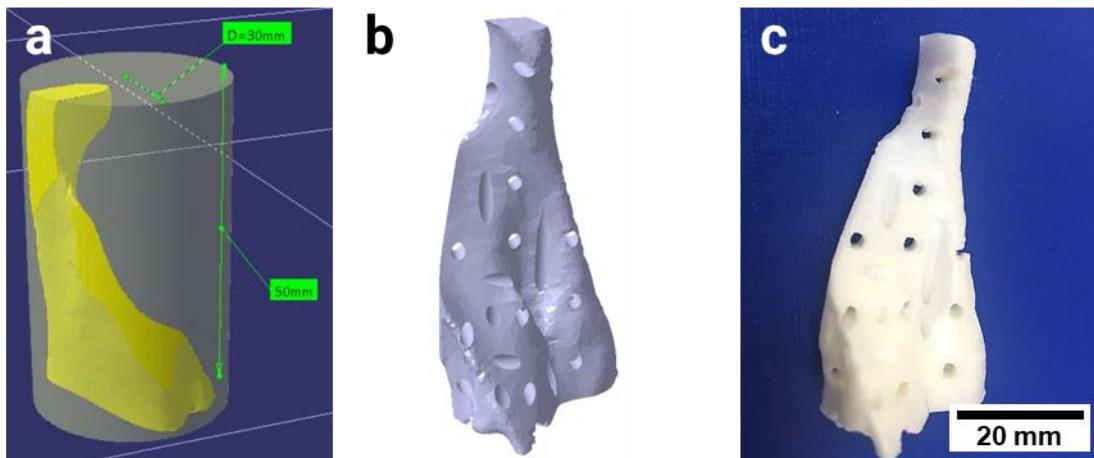
**Figura 4.51.** a) Reprezentări tridimensionale ale produsului ceramic cilindric și ale secțiunilor sale, generate de programul de proiectare (Catia V5); b) vedere longitudinală și c) vedere transversală a unui produs cilindric care poate fi obținut prin aplicarea tehnologiei propuse



**Figura 4.52.** a) reprezentări tridimensionale ale produsului ceramic paralelipipedic și ale secțiunilor sale, generate de programul de proiectare (Catia V5); b) vedere longitudinală și c) vedere transversală a unui produs cilindric care poate fi obținut prin aplicarea tehnologiei propuse

Conform tehnologiei descrise, forma cilindrică proiectată pentru obținerea unui produs tip scaffold poate fi utilizată și pentru obținerea unui implant ceramic tip scaffold cu formă complexă. Pentru a obține forma complexă s-au utilizat date provenite din scanări ale unei mandibule umane cu un echipament de tomografie computerizată (scan CT). Datele obținute din scanarea mandibulei au fost prelucrate cu ajutorul unui program dedicat procesării rezultatelor de imagistică medicală (Mimics) pentru generarea unei forme de implant care să redea fidel porțiunea superioară din partea dreaptă a osului mandibular. Forma astfel proiectată a fost încărcată în programul destinat proiectării (Catia V5) pentru definirea caracteristicilor geometrice ale implantului tip scaffold (fig. 4.53a). Schița și datele generate de programul pentru proiectare au fost utilizate pentru programarea unei mașini cu comandă numerică pentru a realiza frezarea și găurile cilindrului ceramic în vederea redării fidele a caracteristicilor

gemotrice proiectate (fig. 4.53b). Aspectul produsului care poate fi astfel fabricat este prezentat în fig. 4.53c.

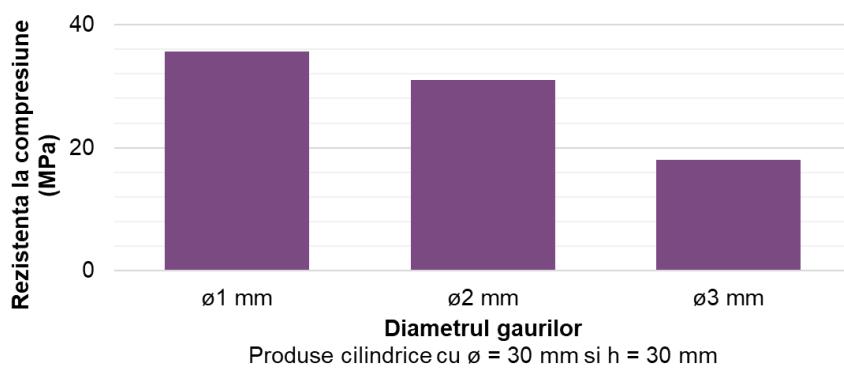


**Figura 4. 53.** a) Captură de ecran din timpul proiectării formei osului mandibular, înscrișă într-un cilindru cu diametrul de 30 mm și înălțimea de 50 mm. b) reprezentare tridimensională a formei implantului proiectat pentru a reda forma porțiunii de os mandibular; c) aspectul implantului care poate fi obținut după prelucrare mecanică

#### 4.6.6. Aprecierea rezistenței mecanice a produselor care pot fi obținute

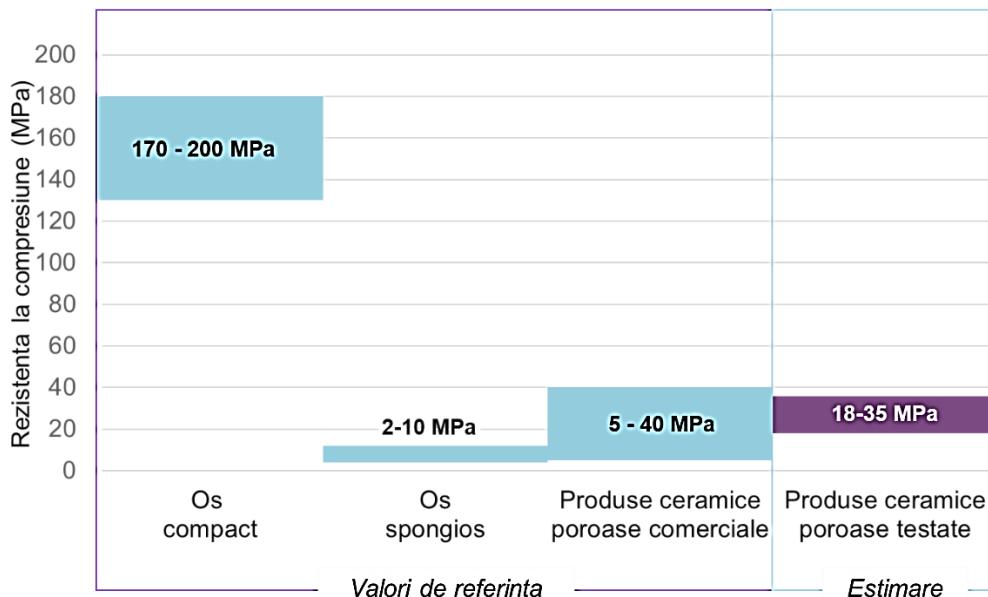
Evaluarea rezistenței mecanice (rezistenței la compresiune) a produselor ceramice care pot fi obținute aplicând tehnologia propusă a fost efectuată pe trei forme ceramice cilindrice, cu diametrul cilindrului  $\varnothing = 30$  mm și generatoarea  $h = 30$  mm. În primul caz au fost proiectate găuri cu diametrul  $\varnothing = 1$  mm la distanța  $d = 3$  mm între oricare 2 găuri. Celelalte două forme au fost proiectate în condiții similare, variind doar diametrul găurilor ( $\varnothing = 2$  mm pentru cel de-al doilea produs și  $\varnothing = 3$  mm pentru cel de-al treilea produs).

Valorile rezistenței mecanice estimate pentru fiecare produs sunt prezentate în fig. 4.54. S-a luat în calcul studiul privind rezistența mecanică prezentat în capitolul 4.5. Din aceste rezultate, reiese că produsele cilindrice au o rezistență mecanică minimă de 206 MPa, în cazul probelor formate fără amidon, descrescând la 89, 42 și 6,5 MPa dacă se folosește o adiție de 5, 10, respectiv 25% amidon. Coroborând aceste valori cu porozitatea teoretică rezultată din calcul, pentru produsele proiectate reies valorile estimate prezentate în figura 4.55. Se preconizează o scădere a rezistenței la compresiune odată cu creșterea diametrului găurilor practicate. Această corelație este explicată de creșterea porozității totale odată cu creșterea diametrului găurilor practicate.



**Figura 4. 54.** Rezistența la compresiune estimate a produselor care pot fi fabricate conform tehnologiei propuse.

Valorile maxime ale rezistenței la compresiune, cuprinse între 18-35 MPa sunt superioare valorilor de rezistență la compresiune caracteristice osului spongios (4-12 MPa) și inferioare celor caracteristice osului cortical (130-180 MPa) [171-174]. Valorile care pot fi obținute sunt ușor superioare valorilor minime prezentate în literatura de specialitate pentru produsele ceramice poroase din hidroxiapatită (fig. 4.55) [3].



**Figura 4. 55.** Rezistență la compresiune estimată a produselor fabricate conform tehnologiei propuse

#### 4.6.7. Concluzii

În acest capitol, a fost prezentată o procedură de prelucrare a țesutului osos bovin și a materialului ceramic rezultat din procesarea termică a acestuia, integrată într-o tehnologie de fabricație a implanturilor ceramice personalizate de tip scaffold, cu aplicații în reconstrucția osoasă. În etapa inițială, tehnologia de fabricație a fost aplicată pentru obținerea unor prototipuri de implanturi ceramice cu dimensiuni și porozități predefinite. Caracterizarea morfologică a prototipurilor a relevat că tehnologia de fabricație permite obținerea de produse ceramice cu dimensiuni fidele celor predefinite. În etapa finală, s-au proiectat trei variante de implant tridimensional cu caracteristici adecvate reconstrucției osoase. Primele două variante reprezintă forme geometrice simple (cilindru și paralelipiped dreptunghic) pentru care implanturile ceramice au fost obținute prin respectarea tehnologiei propuse. Ultima variantă, un implant cu formă personalizată (porțiune a unui os mandibular), a fost propusă pentru obținerea prin prelucrarea mecanică asistată de calculator. Analiza datelor indică faptul că tehnologia de fabricație poate fi aplicată pentru obținerea unor serii de implanturi ceramice cu forme standardizate sau adaptată pentru fabricarea de implanturi ceramice cu formă personalizată.

## Concluzii și contribuții personale

În această lucrare s-a urmărit dezvoltarea unei soluții tehnologice integrate pentru fabricarea unor implanturi biomimetice personalizate folosite în substituția osoasă și dedicate rezolvării chirurgicale rapide și complete a defectelor osoase de dimensiuni mari.

Studiul teoretic efectuat în cadrul tezei de doctorat a arătat că pentru aplicarea în practica medicală a rezultatelor cercetărilor din domeniul ingineriei materialelor destinate reconstrucției osoase sunt necesare investigații suplimentare pentru înțelegerea fenomenelor care contribuie foarte bine la regenerarea țesutului osos. În prezent nu există strategii care să menționeze în mod clar care este materialul optim pentru înlocuirea unui anumit țesut, care sunt proprietățile mecanice sau de suprafață pe care trebuie să le prezinte un produs pentru reconstrucție osoasă și care este mecanismul ideal de degradare a acestuia pentru a asista în mod eficient regenerarea osoasă. Noutatea domeniului și lipsa studiilor clinice implică riscuri și provocări majore după implantare care amână omologarea produselor până la obținerea celor competitive.

Potrivit datelor din literatura de specialitate, se preconizează o implicare intensă a tehnologiilor de fabricație aditivă în producția de implanturi de adiție pentru reconstrucția osoasă, datorită capacitatii acestora de a crea dispozitive medicale personalizate care să poată fi adaptate pentru cerințe clinice specifice defectului osos și pacientului. Integrarea tuturor factorilor-cheie în găsirea unor soluții care să satisfacă cerințele impuse de aplicațiile medicale este importantă în ghidarea progresului acestor tehnici către utilizarea clinică. Cu toate acestea, utilizarea tehnologiilor de fabricație aditivă în producția de dispozitive medicale este deocamdată costisitoare și riscantă datorită numeroaselor provocări asociate printării tridimensionale. Metodele convenționale de fabricație a produselor de reconstrucție osoasă sunt simple, eficiente și economice, și pot fi adaptate pentru a produce produse competitive. Clarificarea influenței metodelor de preparare și fabricare asupra performanțelor implanturilor reprezintă aşadar o etapă critică pentru reducerea compromisurilor asociate materialelor bioceramice destinate substituției și regenerării osoase, precum și în modularea ulterioară a unor proprietăți îmbunătățite și a funcționalității pe termen lung a acestora.

În cadrul acestei teze de doctorat, cercetarea experimentală a vizat obținerea unor materiale apatitice pentru implanturi prin procesarea termică a țesutului osos bovin. Prin procesare termică au fost obținute materiale ceramice din clasa fosfaților de calciu, iar analizele efectuate au identificat aceste materiale ca fiind hidroxiapatită nestoechiometrică sau fosfați de calciu bifazici (hidroxiapatită/β-fosfat tricalcic). Cercetarea a continuat cu caracterizarea complexă a materialelor rezultate și evaluarea proprietăților biologice ale acestora. Obiectivul final al cercetării experimentale a urmărit fabricarea unor probe-test biomimetice din pulberi și paste, obținerea unor componente masive și evaluarea proprietăților mecanice prin metode adecvate.

Principalele concluzii rezultate din cercetările experimentale efectuate în cadrul tezei de doctorat sunt enumerate în continuare.

- Prin selecția parametrilor de tratament termic s-a asigurat variația controlată a caracteristicilor morfologice, compoziționale și structurale ale materialelor ceramice primare obținute din țesut osos bovin, în vederea obținerii de bioceramice performante din clasa fosfaților de calciu (hidroxiapatită și fosfați de calciu bifazici) care respectă cerințele impuse de standardele și normele din domeniul fabricării dispozitivelor medicale din țesuturi de origine animală.
- Corelația rezultatelor compozitionale obținute pentru pulberile de hidroxiapatită a relevat organizarea preferențială a Na și Mg la suprafața materialului datorită afinității pentru oxigen a acestor elemente și tratamentelor termice efectuate la temperaturi superioare

punctelor de fierbere pentru aceste elemente chimice. Modificările de compoziție afectează în mod direct raportul Ca/P calculat pe baza rezultatelor, acesta crescând odată cu creșterea adâncimii de analiză a metodelor spectrale incluse în studiu. Compoziția diferită a suprafetei particulelor preconizează o influență pozitivă asupra comportamentului biologic al materialului datorită concentrației crescute de Mg.

- Evaluarea umectabilității a demonstrat caracterul hidrofil al hidroxiapatitei derivate din țesut osos bovin și a preconizat un comportament favorabil adsorbției unor molecule biologice, fenomen corelat în literatura de specialitate cu bioactivitatea hidroxiapatitei și cu favorizarea regenerării osoase.
- Ipoteza derivată din evaluarea umectabilității, referitoare la comportamentul în medii biologice al hidroxiapatitei derivate din țesut osos bovin, este susținută de rezultatele favorabile ale testărilor *in vitro* pentru evaluarea citotoxicității, a supraviețuirii și proliferării celulare, a morfologiei și adeziunii celulare și a mineralizării matricei extracelulare, efectuate pe culturi de celule preosteoblaste de tip MC3T3-E1.
- Încorporarea în hidroxiapatită a particulelor micrometrice de argint pentru obținerea de materiale microcompozite a indus efectul antibacterian prin favorizarea inhibiției unor specii bacteriene cunoscute și i-a îmbunătățit sinterabilitatea.
- Mecanismul acțiunii argintului în timpul sinterizării include formarea unei topituri metalice, umectarea locală și peliculizarea pe suprafața particulelor de hidroxiapatită, cu consecințe favorabile asupra detensionării aglomerărilor de particule ceramice, formate în etapele anterioare sinterizării. Adeziunea este favorizată de morfologia hidroxiapatitei derivate din țesut osos bovin, care facilitează pătrunderea și retenția topiturii de argint în spațiile dintre particule.
- Încorporarea amidonului ca agent de consolidare și agent porogen în hidroxiapatită a permis fabricarea unor produse cu compoziție adecvată pentru aplicațiile medicale. Gelificarea materialelor pe bază de amestecuri HA-amidon a decurs fără modificări structurale semnificative ale celor două materiale componente. Cu toate acestea, utilizarea amidonului ca agent de consolidare este strict dependentă de temperatura pastei, deoarece gelificarea amidonului decurge într-un palier limitat de temperatură (60 - 80°C).
- După sinterizare amidonul a fost degradat și eliminat complet, ceea ce a dus la obținerea unor corpuri consolidate din hidroxiapatită cu diferite nivele de porozitate, corespunzătoare cantităților de amidon încorporate în timpul consolidării și influențate de distribuția dimensiunii particulelor de HA (pulberi amestecate sau sortate granulometric). Concentrația maximă de amidon care a putut fi încorporată în amestecul ceramic a fost de 25 wt.%, deoarece probele pregătite cu concentrații mai mari își pierd integritatea după sinterizare. Întrucât testarea mecanică a probelor sinterizate preparate cu HA sortată a relevat proprietăți mecanice modeste în comparație cu cerințele impuse implanturilor, pentru fabricarea produselor de reconstrucție osoasă este preferată utilizarea unor pulberi ceramice cu o distribuție largă a dimensiunii particulelor.
- Tehnologia de fabricare a produselor ceramice destinate reconstrucției defectelor osoase majore a fost dezvoltată prin integrarea procedurilor de obținere a materialelor ceramice primare și a pulberilor derivate din țesut osos bovin, precum și a procedurilor de sinterizare cu aditivi biocompatibili prin care se asigură caracteristici ale materialelor adecvate pentru reconstrucția osoasă. Aspectul produselor finale arată că tehnologia de fabricație poate fi aplicată pentru obținerea de serii de implanturi ceramice cu forme standardizate sau adaptată pentru fabricarea de implanturi ceramice cu formă personalizată.

Această teză de doctorat include contribuții originale în domeniul ingineriei materialelor. Contribuțiile originale rezultate din cercetările experimentale sunt reprezentate de dezvoltarea:

- unei rute exclusiv termice de procesare a țesutului osos bovin, pentru obținerea de materiale ceramice destinate fabricării de implanturi pentru substituție osoasă, cu posibilitatea obținerii unor caracteristici de material controlabile prin variația parametrilor de tratament termic;
- unei proceduri de obținere a unor materiale microcompozite pe bază de hidroxiapatită și argint, cu efect antibacterian și sinterabilitate îmbunătățită;
- unei proceduri de sinterizare a hidroxiapatitei utilizând amidonul ca aditiv de sinterizare în vederea asigurării unei microporozități adecvate pentru reconstrucția osoasă;
- unei tehnologii de fabricare a unui produs tip scaffold pe bază de hidroxiapatită, pentru reconstrucția defectelor osoase majore.

Pe lângă aceste contribuții din domeniul obținerii unor produse pentru substituția osoasă, cercetările aferente acestei teze de doctorat au dus și la dezvoltarea unei metode originale de caracterizare a compoziției chimice a particulelor ceramice de la suprafață către volum, utilizând metode spectrale care preiau semnal analitic din adâncimi diferite de analiză.

Cercetările prezentate au aplicabilitate practică pentru fabricarea produselor ceramice destinate reconstrucției osoase. Strategiile prezentate pot fi implementate pentru atingerea mai multor obiective referitoare la fabricarea de produse în serie, utilizând tehnologii convenționale de sinterizare și prelucrare mecanică și fabricarea unor produse personalizate, utilizând tehnologii de proiectare și fabricare asistată de calculator, de tipul prelucrării mecanice cu mașini cu comandă numerică și fabricației aditive prin metode de sinterizare selectivă cu laser, printare inkjet tridimensională sau modelare prin extrudare termoplastica.

Importanța contribuților orginale din această teză de doctorat a fost susținută în 11 comunicări în cadrul unor conferințe internaționale și recunoscută prin publicarea a 7 articole științifice din domeniul ingineriei materialelor, în reviste de specialitate (dintre care 5 sunt cotate Clarivate Analytics cu factor de impact cuprins între 1.03 – 6.14). Tehnologia de fabricare a implanturilor biomimetice propusă în această teză de doctorat este în curs de brevetare la nivel național (A00001-4-01-2017), fiind premiată la saloane și expoziții internaționale de invenții și inovații.

Aplicarea cu succes a acestor cercetări pentru fabricarea produselor destinate reconstrucției osoase depinde în mare măsură de desfășurarea unor cercetări experimentale viitoare, care să cuprindă: utilizarea procedurilor de sinterizare pentru elaborarea unor strategii de printare tridimensională a produselor din hidroxiapatită derivată din țesut osos bovin; testarea unor aditivi de sinterizare care să îmbunătățească performanțele biologice și mecanice ale materialelor ceramice derivate din țesut osos bovin; testarea preclinică, pe model animal, a produselor tip scaffold și validarea metodelor de obținere și caracterizare a materialelor din țesut osos bovin prin studii de reproductibilitate în vederea fabricării unor materiale de referință certificate care să fie utilizate în controlul calității produselor destinate implantării.

## Referințe

1. Antoniac, I.V., *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. 2016: Springer Berlin Heidelberg, New York.
2. Dorozhkin, S.V., *Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates*. Biomatter, 2011. **1**(1): p. 3-56.
3. Dorozhkin, S.V., *Bioceramics of calcium orthophosphates*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1465-1485.
4. Best, S.M., et al., *Bioceramics: Past, present and for the future*. Journal of the European Ceramic Society, 2008. **28**(7): p. 1319-1327.
5. Miculescu, F., et al., *Tuning Hydroxyapatite Particles' Characteristics for Solid Freeform Fabrication of Bone Scaffolds*. Advanced Composite Materials, 2016: p. 321-397.
6. Rey, C., et al., *Bone mineral: update on chemical composition and structure*. Osteoporosis International, 2009. **20**(6): p. 1013-1021.
7. Champion, E., *Sintering of calcium phosphate bioceramics*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(4): p. 5855-5875.
8. Williams, D., J. Black, and P. Doherty, *Second consensus conference on definitions in biomaterials*. Chester, England. In PJ Doherty, RF Williams, DF Williams, A. Lee, eds. *Biomaterial-tissue interfaces. Advances in biomaterials*, 1992. **10**.
9. Williams, D.F., *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986*. Vol. 4. 1987: Elsevier Science Limited.
10. O'Brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials today, 2011. **14**(3): p. 88-95.
11. Williams, D.F., *The Williams Dictionary of Biomaterials*. 1999: Liverpool University Press.
12. Miron, R. and Y. Zhang, *Osteoinduction: a review of old concepts with new standards*. Journal of dental research, 2012. **91**(8): p. 736-744.
13. Albrektsson, T. and C. Johansson, *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. European spine journal, 2001. **10**(2): p. S96-S101.
14. Dorozhkin, S.V., *A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(6): p. 3085-3110.
15. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates and human beings: A historical perspective from the 1770s until 1940*. Biomatter, 2012. **2**(2): p. 53-70.
16. Ben-Nissan, B., *Advances in calcium phosphate biomaterials*. 2014.
17. van Leeuwenhoek, A., *Microscopical observations about blood, milk, bones, the brain, spittle, cuticula, sweat, fat and tears*. Philos Trans R Soc Lond, 1674. **9**: p. 125.
18. Leeuwenhoek, A.v., *Part of a letter of Mr. Anthony van Leeuwenhoeck, dated Delst, Sept. 10. 1697. Concerning the eggs of snails, roots of vegetables, teeth, and young Oysters*. Philos. Trans. **1695**(19): p. 790-799.
19. Orell, S., *Surgical Bone Grafting With "os Purum", "os Novum", And "boiled Bone"*. JBJS, 1937. **19**(4): p. 873-885.
20. Mucalo, M.R., *14 - Animal-bone derived hydroxyapatite in biomedical applications*, in *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications*, M. Mucalo, Editor. 2015, Woodhead Publishing. p. 307-342.
21. Maatz, R. and A. Bauermeister, *A Method of Bone Maceration. Results in animal experiments*. J Bone Joint Surg Am, 1957. **39**(1): p. 153-166.
22. Cosacescu, A., *Afectiuni osoase. Inflamatii. Fracturi*. 1948, Sibiu: Ed. H. Welther.
23. Tadic, D. and M. Epple, *A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone*. Biomaterials, 2004. **25**(6): p. 987-994.
24. McMurray, G., *The evaluation of Kiel bone in spinal fusions*. J Bone Joint Surg Br, 1982. **64**(1): p. 101-104.
25. Pieron, A., D. Bigelow, and M. Hamonic, *BONE GRAFTING WITH BOPLANT Results in Thirty-three Cases*. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume, 1968. **50**(2): p. 364-368.
26. Roy, D.M. and S.K. Linnehan, *Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange*. Nature, 1974. **247**(5438): p. 220.
27. Miculescu, F., et al., *Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite particles for high value nanocomposites and biomaterials*. Vacuum, 2017. **146**: p. 614-622.
28. Tampieri, A., et al., *From wood to bone: multi-step process to convert wood hierarchical structures into biomimetic hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(28): p. 4973-4980.
29. Wu, S.-C., et al., *Preparation and characterization of hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders*. Advanced Powder Technology, 2017. **28**(4): p. 1154-1158.

30. Alshemary, A.Z., et al., *Physico-chemical and biological properties of hydroxyapatite extracted from chicken beaks*. Materials Letters, 2018. **215**: p. 169-172.
31. Paul, S., et al., *Effect of trace elements on the sintering effect of fish scale derived hydroxyapatite and its bioactivity*. Ceramics International, 2017. **43**(17): p. 15678-15684.
32. Ramesh, S., et al., *Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications*. Ceramics International, 2018.
33. Ofudje, E.A., et al., *Synthesis of organic derived hydroxyapatite scaffold from pig bone waste for tissue engineering applications*. Advanced Powder Technology, 2018. **29**(1): p. 1-8.
34. Ramirez-Gutierrez, C.F., et al., *Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone*. Ceramics International, 2017. **43**(10): p. 7552-7559.
35. Szczęś, A., et al., *Properties of natural and synthetic hydroxyapatite and their surface free energy determined by the thin-layer wicking method*. Applied Surface Science, 2018. **434**: p. 1232-1238.
36. Kim, H.-J., T.-Y. Kwon, and J.S. Son, *Fabrication and in vitro evaluation of natural duck beak bone/synthetic hydroxyapatite bi-layered scaffold for bone regeneration*. Materials Letters, 2018. **220**: p. 186-189.
37. Etok, S., et al., *Structural and chemical changes of thermally treated bone apatite*. Journal of Materials Science, 2007. **42**(23): p. 9807-9816.
38. Bahrololoom, M., et al., *Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash*. J. Ceram. Process. Res., 2009. **10**: p. 129-138.
39. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art*. Journal of Functional Biomaterials, 2010. **1**(1): p. 22-107.
40. Mihailescu, N., et al., *Structural, compositional, mechanical characterization and biological assessment of bovine-derived hydroxyapatite coatings reinforced with MgF<sub>2</sub> or MgO for implants functionalization*. Materials Science and Engineering: C, 2016. **59**: p. 863-874.
41. Visan, A., et al., *Combinatorial MAPLE deposition of antimicrobial orthopedic maps fabricated from chitosan and biomimetic apatite powders*. International journal of pharmaceutics, 2016. **511**(1): p. 505-515.
42. Duta, L., et al., *Comparative physical, chemical and biological assessment of simple and titanium-doped ovine dentine-derived hydroxyapatite coatings fabricated by pulsed laser deposition*. Applied Surface Science, 2017. **413**: p. 129-139.
43. Cotrut, C.M., et al., *Influence of deposition temperature on the properties of hydroxyapatite obtained by electrochemical assisted deposition*. Ceramics International, 2018. **44**(1): p. 669-677.
44. Dudin, S., et al., *Comparative study of the hydroxyapatite coatings prepared with/without substrate bias*. Ceramics International, 2017. **43**(17): p. 14968-14975.
45. Rusu, L.C., et al., *Tetracycline loaded collagen/hydroxyapatite composite materials for biomedical applications*. Journal of Nanomaterials, 2015. **2015**: p. 3.
46. Popa, C., et al., *Titanium—hydroxyapatite porous structures for endosseous applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2005. **16**(12): p. 1165-1171.
47. Pascu, A., et al., *Optical and microstructure characterisation of ceramic— hydroxyapatite coating fabricated by laser cladding*. Journal of optoelectronics and advanced materials, 2017. **19**(1-2): p. 66-72.
48. Anghelina, F., et al., *Fine structure analysis of biocompatible ceramic materials based hydroxyapatite and metallic biomaterials 316L*. Applied Surface Science, 2013. **285**: p. 65-71.
49. Antoniac, I., *Biologically Responsive Biomaterials for Tissue Engineering*. 2012: Springer New York.
50. Antoniac, I.V. *Biodegradability of some collagen sponges reinforced with different bioceramics*. in *Key engineering materials*. 2014. Trans Tech Publ.
51. Botez, P., et al., *Application of a biphasic macroporous synthetic bone substitutes CERAFORM®: clinical and histological results*. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, 2009. **19**(6): p. 387-395.
52. Liu, Q., et al., *Insight into biological apatite: physiochemical properties and preparation approaches*. BioMed research international, 2013. **2013**.
53. Suwanprateeb, J., et al., *Development of porous powder printed high density polyethylene for personalized bone implants*. Journal of Porous Materials, 2012. **19**(5): p. 623-632.
54. Janus, A.M., et al., *Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones*. Microchimica Acta, 2008. **161**(3-4): p. 349-353.
55. Haberko, K., et al., *Natural hydroxyapatite—its behaviour during heat treatment*. Journal of the European Ceramic Society, 2006. **26**(4–5): p. 537-542.
56. Murugan, R., K.P. Rao, and T.S.S. Kumar, *Heat-deproteinated xenogeneic bone from slaughterhouse waste: Physico-chemical properties*. Bulletin of Materials Science, 2003. **26**(5): p. 523-528.

57. Rogers, K. and P. Daniels, *An X-ray diffraction study of the effects of heat treatment on bone mineral microstructure*. Biomaterials, 2002. **23**(12): p. 2577-2585.
58. Kokubo, T., *Bioactive glass ceramics: properties and applications*. Biomaterials, 1991. **12**(2): p. 155-163.
59. Thompson, T.J., *Heat-induced dimensional changes in bone and their consequences for forensic anthropology*. J Forensic Sci, 2005. **50**(5): p. 1008-15.
60. Liao, C.-J., et al., *Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere*. Biomaterials, 1999. **20**(19): p. 1807-1813.
61. Pramanik, S., et al., *Morphological Change of Heat Treated Bovine Bone: A Comparative Study*. Materials, 2012. **6**(1): p. 65-75.
62. Lau, M.-l., et al., *Analysis of heat-treated bovine cortical bone by thermal gravimetric and nanoindentation*. Composites Part B: Engineering, 2013. **55**(0): p. 447-452.
63. Ooi, C.Y., M. Hamdi, and S. Ramesh, *Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone*. Ceramics International, 2007. **33**(7): p. 1171-1177.
64. Wang, X.Y., et al., *Comparative study on inorganic composition and crystallographic properties of cortical and cancellous bone*. Biomed Environ Sci, 2010. **23**(6): p. 473-80.
65. Mkukuma, L.D., et al., *Effect of the proportion of organic material in bone on thermal decomposition of bone mineral: an investigation of a variety of bones from different species using thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry, high-temperature X-ray diffraction, and Fourier transform infrared spectroscopy*. Calcif Tissue Int, 2004. **75**(4): p. 321-8.
66. Elkayar, A., Y. Elshazly, and M. Assaad, *Properties of Hydroxyapatite from Bovine Teeth*. Bone and Tissue Regeneration Insights, 2010. **2**(1801-BTRI-Properties-of-Hydroxyapatite-from-Bovine-Teeth.pdf): p. 31-36.
67. Figueiredo, M., et al., *Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone*. Ceramics International, 2010. **36**(8): p. 2383-2393.
68. Mkukuma, L.D., et al., *Thermal stability and structure of cancellous bone mineral from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(2): p. 222-5.
69. Gaby, E.T.-O., R. García-García, and J. Reyes-Gasga, *Structural and thermal behaviour of carious and sound powders of human tooth enamel and dentine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2009. **42**(23): p. 235408.
70. Lozano, L.F., et al., *Thermal analysis study of human bone*. Journal of Materials Science, 2003. **38**(23): p. 4777-4782.
71. Deydier, E., et al., *Physical and chemical characterisation of crude meat and bone meal combustion residue: "waste or raw material?"*. J Hazard Mater, 2005. **121**(1-3): p. 141-8.
72. Fernandez Castillo, R., et al., *Effect of temperature on bone tissue: histological changes*. J Forensic Sci, 2013. **58**(3): p. 578-82.
73. Samouillan, V., et al., *The use of thermal techniques for the characterization and selection of natural biomaterials*. J Funct Biomater, 2011. **2**(3): p. 230-48.
74. Pramanik, S., et al., *Design and development of potential tissue engineering scaffolds from structurally different longitudinal parts of a bovine-femur*. Scientific reports, 2014. **4**.
75. Trebacz, H. and K. Wojtowicz, *Thermal stabilization of collagen molecules in bone tissue*. Int J Biol Macromol, 2005. **37**(5): p. 257-62.
76. Fantner, G.E., et al., *Influence of the degradation of the organic matrix on the microscopic fracture behavior of trabecular bone*. Bone, 2004. **35**(5): p. 1013-1022.
77. Johnson, G., M. Mucalo, and M. Lorier, *The processing and characterization of animal-derived bone to yield materials with biomedical applications Part 1: Modifiable porous implants from bovine condyle cancellous bone and characterization of bone materials as a function of processing*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000. **11**(7): p. 427-441.
78. Abdel-Fattah, W.I. and F.A. Nour, *Thermal expansion application to assess calcination of bovine hydroxyapatite*. Thermochimica Acta, 1993. **218**(0): p. 465-475.
79. Beckett, S., K.D. Rogers, and J.G. Clement, *Inter-species variation in bone mineral behavior upon heating*. J Forensic Sci, 2011. **56**(3): p. 571-9.
80. Joschek, S., et al., *Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone*. Biomaterials, 2000. **21**(16): p. 1645-58.
81. Lombardi, M., et al., *Processing of a natural hydroxyapatite powder: From powder optimization to porous bodies development*. Journal of the European Ceramic Society, 2011. **31**(14): p. 2513-2518.
82. Miculescu, F., et al., *Cortical bone as resource for producing biomimetic materials for clinical use*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2012. **7**(4): p. 1667-1677.
83. Nilen, R.W.N. and P.W. Richter, *The thermal stability of hydroxyapatite in biphasic calcium phosphate ceramics*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. **19**(4): p. 1693-1702.

84. Lorprayoon, C., *Phases of cattle bones at elevated temperatures*. J. Sci. Soc. Thailand, 1986(12): p. 159-170.
85. Miculescu, F., et al., *Synthesis and characterization of jellified composites form bovine bone-derived hydroxyapatite and starch as precursors for robocasting*. 2018.
86. Muralithran, G. and S. Ramesh, *The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite*. Ceramics International, 2000. **26**(2): p. 221-230.
87. Zhou, J., et al., *High temperature characteristics of synthetic hydroxyapatite*. Journal of materials science: materials in medicine, 1993. **4**(1): p. 83-85.
88. Wu, J.-M. and T.-S. Yeh, *Sintering of hydroxylapatite-zirconia composite materials*. Journal of materials science, 1988. **23**(10): p. 3771-3777.
89. Ou, S.-F., S.-Y. Chiou, and K.-L. Ou, *Phase transformation on hydroxyapatite decomposition*. Ceramics International, 2013. **39**(4): p. 3809-3816.
90. Kim, H., et al., *Control of phase composition in hydroxyapatite/tetracalcium phosphate biphasic thin coatings for biomedical applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2005. **16**(10): p. 961-966.
91. Welch, J. and W. Gutt, *HIGH-TEMPERATURE STUDIES OF SYSTEM CALCIUM OXIDE-PHOSPHORUS PENTOXIDE*. Journal of the Chemical Society, 1961(OCT): p. 4442-&.
92. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biominerization, pathological calcification and biomimetic applications*. Biomatter, 2011. **1**(2): p. 121-164.
93. Sung, Y.-M., J.-C. Lee, and J.-W. Yang, *Crystallization and sintering characteristics of chemically precipitated hydroxyapatite nanopowder*. Journal of Crystal Growth, 2004. **262**(1): p. 467-472.
94. Marcelo, T.M., et al., *Microstructural characterization and interactions in Ti-and TiH<sub>2</sub>-hydroxyapatite vacuum sintered composites*. Materials Research, 2006. **9**(1): p. 65-71.
95. Albee, F.H., *Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis*. Annals of surgery, 1920. **71**(1): p. 32.
96. Driskell, T., et al. *Calcium phosphate resorbable ceramics-potential alternative to bone grafting* in *Journal of Dental Research*. 1973. SAGE PUBLICATIONS INC 2455 TELLER RD, THOUSAND OAKS, CA 91320 USA.
97. Klein, C.P., et al., *Interaction of biodegradable β-whitlockite ceramics with bone tissue: An in vivo study*. Biomaterials, 1985. **6**(3): p. 189-192.
98. Habraken, W., et al., *Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?* Materials Today, 2016. **19**(2): p. 69-87.
99. Havelin, L.I., et al., *The Norwegian arthroplasty register: 11 years and 73,000 arthroplasties*. Acta Orthopaedica Scandinavica, 2000. **71**(4): p. 337-353.
100. Moroni, A., et al., *State of the art review: techniques to avoid pin loosening and infection in external fixation*. Journal of orthopaedic trauma, 2002. **16**(3): p. 189-195.
101. Dorozhkin, S.V. and M. Epple, *Biological and medical significance of calcium phosphates*. Angewandte Chemie International Edition, 2002. **41**(17): p. 3130-3146.
102. Vallet-Regí, M. and J.M. González-Calbet, *Calcium phosphates as substitution of bone tissues*. Progress in solid state chemistry, 2004. **32**(1-2): p. 1-31.
103. LeGeros, R., et al., *Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications*. Journal of materials science: Materials in Medicine, 2003. **14**(3): p. 201-209.
104. Dorozhkin, S.V., *Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates*. Acta Biomater, 2012. **8**(3): p. 963-77.
105. Bohner, M. and G. Baroud, *Injectability of calcium phosphate pastes*. Biomaterials, 2005. **26**(13): p. 1553-1563.
106. Bohner, M., *Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution*. Eur Cell Mater, 2010. **20**(1): p. 3-10.
107. Bohner, M., U. Gbureck, and J. Barralet, *Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6423-6429.
108. Ginebra, M.-P., et al., *New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine*. Acta biomaterialia, 2010. **6**(8): p. 2863-2873.
109. Chow, L.C., *Next generation calcium phosphate-based biomaterials*. Dental materials journal, 2009. **28**(1): p. 1-10.
110. Le Guéhenne, L., et al., *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*. Dental materials, 2007. **23**(7): p. 844-854.
111. Paital, S.R. and N.B. Dahotre, *Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: materials, performance factors, and methodologies*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2009. **66**(1-3): p. 1-70.

112. Yang, Y., K.-H. Kim, and J.L. Ong, *A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—an alternative to plasma spraying*. Biomaterials, 2005. **26**(3): p. 327-337.
113. Shadanbaz, S. and G.J. Dias, *Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review*. Acta biomaterialia, 2012. **8**(1): p. 20-30.
114. Surmenev, R.A., *A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication*. Surface and Coatings Technology, 2012. **206**(8-9): p. 2035-2056.
115. Uskoković, V. and D.P. Uskoković, *Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents*. Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials, 2011. **96**(1): p. 152-191.
116. Sadat-Shojaei, M., et al., *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. Acta biomaterialia, 2013. **9**(8): p. 7591-7621.
117. Bleek, K. and A. Taubert, *New developments in polymer-controlled, bioinspired calcium phosphate mineralization from aqueous solution*. Acta biomaterialia, 2013. **9**(5): p. 6283-6321.
118. Alves Cardoso, D., J. Jansen, and S. G Leeuwenburgh, *Synthesis and application of nanostructured calcium phosphate ceramics for bone regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2012. **100**(8): p. 2316-2326.
119. Zakaria, S.M., et al., *Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2013. **19**(5): p. 431-441.
120. Rey, C., et al., *Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2007. **38**(12): p. 996-1002.
121. Ishikawa, K., *Bone substitute fabrication based on dissolution-precipitation reactions*. Materials, 2010. **3**(2): p. 1138-1155.
122. LeGeros, R.Z., *Calcium phosphate-based osteoinductive materials*. Chemical reviews, 2008. **108**(11): p. 4742-4753.
123. Chai, Y.C., et al., *Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies*. Acta biomaterialia, 2012. **8**(11): p. 3876-3887.
124. Bose, S. and S. Tarafder, *Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review*. Acta biomaterialia, 2012. **8**(4): p. 1401-1421.
125. Ginebra, M.-P., et al., *Calcium phosphate cements as drug delivery materials*. Advanced drug delivery reviews, 2012. **64**(12): p. 1090-1110.
126. Parent, M., et al., *Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance*. Journal of Controlled Release, 2017. **252**: p. 1-17.
127. Verron, E., et al., *Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review*. Drug discovery today, 2010. **15**(13-14): p. 547-552.
128. Boanini, E., M. Gazzano, and A. Bigi, *Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature*. Acta biomaterialia, 2010. **6**(6): p. 1882-1894.
129. Habibovic, P. and J. Barralet, *Bioinorganics and biomaterials: bone repair*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(8): p. 3013-3026.
130. Pietak, A.M., et al., *Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics*. Biomaterials, 2007. **28**(28): p. 4023-4032.
131. Lin, K., C. Wu, and J. Chang, *Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape*. Acta biomaterialia, 2014. **10**(10): p. 4071-4102.
132. Bohner, M., et al., *Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications*. Biomatter, 2013. **3**(2): p. e25103.
133. Legros, R., N. Balmain, and G. Bonel, *Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone*. Journal of chemical research. Synopses, 1986(1): p. 8-9.
134. White, T.D. and P.A. Folkens, *The human bone manual*. 2005: Academic Press.
135. Dorozhkin, S., *Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials*. Journal of Materials Science, 2009. **44**(9): p. 2343-2387.
136. Maidaniuc, A., *Studii privind efectele de matrice în analiza prin fluorescență de radiații X a hidroxiapatitei*, in *Lucrare de disertatie in cadrul Facultatii de Stiinta si Ingineria Materialelor*. 2015, Universitatea Politehnica Bucuresti.
137. Dorozhkin, S., *Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine*. Materials, 2009. **2**(2): p. 399-498.
138. Omelon, S.J. and M.D. Grynpas, *Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization*. Chemical reviews, 2008. **108**(11): p. 4694-4715.
139. Wang, M., et al., *Raman, FT-IR and XRD study of bovine bone mineral and carbonated apatites with different carbonate levels*. Materials Letters, 2018. **210**: p. 203-206.

140. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates (CaPO<sub>4</sub>): Occurrence and properties*. Morphologie, 2017 - available online.
141. Dorozhkin, S.V., et al., *Biphasic, Triphasic, and Multiphasic Calcium Orthophosphates*. Advanced Ceramic Materials, 2016: p. 33-95.
142. Sheikh, Z., et al., *Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications*. Materials, 2015. **8**(9): p. 5744-5794.
143. Ohyama, T., et al., *Beta-tricalcium phosphate as a substitute for autograft in interbody fusion cages in the canine lumbar spine*. J Neurosurg, 2002. **97**(3 Suppl): p. 350-4.
144. Nurse, R.W., J.H. Welch, and W. Gutt, *A New Form of Tricalcium Phosphate*. Nature, 1958. **182**(4644): p. 1230-1230.
145. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphate-based bioceramics*. Materials, 2013. **6**(9): p. 3840-3942.
146. Carrodeguas, R.G. and S. De Aza, *α-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications*. Acta biomaterialia, 2011. **7**(10): p. 3536-3546.
147. Murayama, J.K., et al., *A dense polymorph of Ca 3 (PO 4) 2: a high pressure phase of apatite decomposition and its geochemical significance*. Physics of the earth and planetary interiors, 1986. **44**(4): p. 293-303.
148. Zhai, S., et al., *Equation of state of γ-tricalcium phosphate, γ-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, to lower mantle pressures*. American Mineralogist, 2009. **94**(10): p. 1388-1391.
149. Hench, L.L. *Bioactive glasses and glass-ceramics*. in *Materials science forum*. 1998. Trans Tech Publ.
150. Liu, D.-M., *Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules*. Biomaterials, 1996. **17**(20): p. 1955-1957.
151. Fabbri, M., G. Celotti, and A. Ravaglioli, *Hydroxyapatite-based porous aggregates: physico-chemical nature, structure, texture and architecture*. Biomaterials, 1995. **16**(3): p. 225-228.
152. Vats, A., et al., *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications*. Clinical Otolaryngology & Allied Sciences, 2003. **28**(3): p. 165-172.
153. Hollister, S.J., *Porous scaffold design for tissue engineering*. Nature materials, 2005. **4**(7): p. 518-524.
154. Schieker, M., et al., *Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering*. European journal of trauma, 2006. **32**(2): p. 114-124.
155. Kinoshita, Y. and H. Maeda, *Recent developments of functional scaffolds for craniomaxillofacial bone tissue engineering applications*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 863157.
156. Hammel, E.C., O.L.R. Ighodaro, and O.I. Okoli, *Processing and properties of advanced porous ceramics: An application based review*. Ceramics International, 2014. **40**(10, Part A): p. 15351-15370.
157. Silva, L., et al., *Characterization of hydroxyapatite scaffold using corn starch as porous agent*. 2011.
158. Bose, S., S. Vahabzadeh, and A. Bandyopadhyay, *Bone tissue engineering using 3D printing*. Materials Today, 2013. **16**(12): p. 496-504.
159. Gao, C., et al., *Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(3): p. 4714-4732.
160. Park, J.B., *Lakes, Biomaterials: An Introduction*. Plenum Press, New York, 1992.
161. Lanza, R., R. Langer, and J.P. Vacanti, *Principles of tissue engineering*. 2011: Academic press.
162. Cosijns, A., et al., *Porous hydroxyapatite tablets as carriers for low-dosed drugs*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. **67**(2): p. 498-506.
163. Murugan, R. and S. Ramakrishna, *Porous bovine hydroxyapatite for drug delivery*. Journal of applied biomaterials & biomechanics: JABB, 2004. **3**(2): p. 93-97.
164. Kundu, B., et al., *Development of porous HAp and β-TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold based drug delivery system*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010. **21**(11): p. 2955-2969.
165. Fernandez-Yague, M.A., et al., *Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomechanical strategies*. Advanced Drug Delivery Reviews, (0).
166. Hulbert, S., C. Talbert, and J. Klawitter, *Investigation Into the Potential of Ceramic Materials as Permanently Implantable Skeletal Prostheses*, in *Biomaterials. Bioengineering Applied to Materials for Hard and Soft Tissue Replacement*. 1971, University of Washington Press. p. 3-77.
167. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-5491.
168. Chevalier, E., et al., *Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field*. Journal of pharmaceutical sciences, 2008. **97**(3): p. 1135-1154.
169. Blokhuis, T.J., et al., *Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior*. Journal of Trauma-Injury, Infection, and Critical Care, 2000. **48**(1): p. 179.
170. Lu, J., et al., *Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1999. **10**(2): p. 111-120.

171. Lin, L., et al. *The mechanical properties of bone tissue engineering scaffold fabricating via selective laser sintering*. in *International Conference on Life System Modeling and Simulation*. 2007. Springer.
172. Rho, J.-Y., L. Kuhn-Spearing, and P. Ziopoulos, *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone*. Medical engineering and physics, 1998. **20**(2): p. 92-102.
173. Rho, J.-Y., T.Y. Tsui, and G.M. Pharr, *Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation*. Biomaterials, 1997. **18**(20): p. 1325-1330.
174. Prakasam, M., et al., *Fabrication, properties and applications of dense hydroxyapatite: a review*. Journal of functional biomaterials, 2015. **6**(4): p. 1099-1140.
175. Roseti, L., et al., *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **78**: p. 1246-1262.
176. Kampe, B.N., T; Sheppard, B, *Designing a healthy future for biomedical devices*, in *McKinsey & Company website: [www.mckinsey.com](http://www.mckinsey.com)*. 2018.
177. Sun, W., et al., *Bio-CAD modeling and its applications in computer-aided tissue engineering*. Computer-aided design, 2005. **37**(11): p. 1097-1114.
178. Xiaoyong, T., L. Dichen, and G.H. Jürgen, *Net-Shaping of Ceramic Components by Using Rapid Prototyping Technologies*. 2011.
179. Tian, X., D. Li, and J.G. Heinrich, *Net-shaping of ceramic components by using rapid prototyping technologies*. 2011: INTECH Open Access Publisher.
180. Rahaman, M.N., *Sintering of ceramics*. 2007: CRC press.
181. Motskin, M., et al., *Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability*. Biomaterials, 2009. **30**(19): p. 3307-3317.
182. Ding, T., et al., *Effect of particle size of hydroxyapatite nanoparticles on its biocompatibility*. IEEE Trans Nanobioscience, 2012. **11**(4): p. 336-40.
183. Wang, M., R. Joseph, and W. Bonfield, *Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology*. Biomaterials, 1998. **19**(24): p. 2357-2366.
184. Thangamani, N., K. Chinnakali, and F. Gnanam, *The effect of powder processing on densification, microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite*. Ceramics international, 2002. **28**(4): p. 355-362.
185. Butscher, A., et al., *Printability of calcium phosphate powders for three-dimensional printing of tissue engineering scaffolds*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(1): p. 373-385.
186. Butscher, A., et al., *Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(3): p. 907-920.
187. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphate coatings, films and layers*. Progress in Biomaterials, 2012. **1**(1): p. 1.
188. Vorndran, E., C. Moseke, and U. Gbureck, *3D printing of ceramic implants*. MRS Bulletin, 2015. **40**(02): p. 127-136.
189. Wu, J., et al., *Vital role of hydroxyapatite particle shape in regulating the porosity and mechanical properties of the sintered scaffolds*. Journal of Materials Science & Technology, 2017.
190. Dey, S., M. Das, and V.K. Balla, *Effect of hydroxyapatite particle size, morphology and crystallinity on proliferation of colon cancer HCT116 cells*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **39**: p. 336-339.
191. Mohandes, F. and M. Salavati-Niasari, *Particle size and shape modification of hydroxyapatite nanostructures synthesized via a complexing agent-assisted route*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **40**: p. 288-298.
192. Dardouri, M., J.P. Borges, and A.D. Omrani, *Tailoring the morphology of hydroxyapatite particles using a simple solvothermal route*. Ceramics International, 2017. **43**(4): p. 3784-3791.
193. Pang, Y. and X. Bao, *Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles*. Journal of the European Ceramic Society, 2003. **23**(10): p. 1697-1704.
194. Ratner, B.D., *Chapter I.1.5 - Surface Properties and Surface Characterization of Biomaterials*, in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B.D.R.S.H.J.S.E. Lemons, Editor. 2013, Academic Press. p. 34-55.
195. Ruys, A., et al., *Powder Processing of Bulk Components in Manufacturing*, in *Handbook of Manufacturing Engineering and Technology*, A. Nee, Editor. 2014, Springer London. p. 1-69.
196. Studart, A.R., et al., *Processing routes to macroporous ceramics: a review*. Journal of the American Ceramic Society, 2006. **89**(6): p. 1771-1789.
197. Tempelman, E., H. Shercliff, and B.N. van Eyben, *Chapter 11 - Additive Manufacturing*, in *Manufacturing and Design*, E. Tempelman, H. Shercliff, and B.N.v. Eyben, Editors. 2014, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 187-200.
198. Chua, C., et al., *1-Introduction to rapid prototyping of biomaterials*. 2014: Woodhead Publishing.

199. Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques*. Tissue engineering, 2002. **8**(1): p. 1-11.
200. Shirazi, S.F.S., et al., *A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: selective laser sintering and inkjet 3D printing*. Science and Technology of Advanced Materials, 2015. **16**(3): p. 033502.
201. Bandyopadhyay, A., S. Bose, and S. Das, *3D printing of biomaterials*. MRS Bulletin, 2015. **40**(02): p. 108-115.
202. Kietzmann, J., L. Pitt, and P. Berthon, *Disruptions, decisions, and destinations: Enter the age of 3-D printing and additive manufacturing*. Business Horizons, 2015. **58**(2): p. 209-215.
203. Chia, H.N. and B.M. Wu, *Recent advances in 3D printing of biomaterials*. Journal of biological engineering, 2015. **9**(1): p. 4.
204. Wong, K.V. and A. Hernandez, *A review of additive manufacturing*. ISRN Mechanical Engineering, 2012. **2012**.
205. Yang, C., Y.-k. Guo, and M.-l. Zhang, *Thermal decomposition and mechanical properties of hydroxyapatite ceramic*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2010. **20**(2): p. 254-258.
206. Cesarano III, J., B.H. King, and H. Denham, *Recent developments in robocasting of ceramics and multimaterial deposition*. 1998, Sandia National Labs., Albuquerque, NM (United States).
207. Franchin, G., et al., *Direct ink writing of geopolymeric inks*. Journal of the European Ceramic Society, 2017. **37**(6): p. 2481-2489.
208. Marques, C.F., et al., *Biphasic calcium phosphate scaffolds fabricated by direct write assembly: Mechanical, anti-microbial and osteoblastic properties*. Journal of the European Ceramic Society, 2017. **37**(1): p. 359-368.
209. Lewis, J.A., *Direct-write assembly of ceramics from colloidal inks*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2002. **6**(3): p. 245-250.
210. de Hazan, Y., et al., *Robotic deposition of 3d nanocomposite and ceramic fiber architectures via UV curable colloidal inks*. Journal of the European Ceramic Society, 2012. **32**(6): p. 1187-1198.
211. Hoelzle, D.J., A.G. Alleyne, and A.J. Wagoner Johnson, *Micro-robotic deposition guidelines by a design of experiments approach to maximize fabrication reliability for the bone scaffold application*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(4): p. 897-912.
212. Feilden, E., et al., *Robocasting of structural ceramic parts with hydrogel inks*. Journal of the European Ceramic Society, 2016. **36**(10): p. 2525-2533.
213. Bose, S., et al., *Additive manufacturing of biomaterials*. Progress in Materials Science, 2018. **93**: p. 45-111.
214. Puppi, D., et al., *Additive manufacturing of wet-spun polymeric scaffolds for bone tissue engineering*. Biomedical microdevices, 2012. **14**(6): p. 1115-1127.
215. Eosoly, S., et al., *Selective laser sintering of hydroxyapatite/poly-ε-caprolactone scaffolds*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(7): p. 2511-2517.
216. Wiria, F., et al., *Porosity and cell culture investigation of hydroxyapatite component for biomedical application*. 2010.
217. Ronca, A., L. Ambrosio, and D.W. Grijpma, *Preparation of designed poly (D, L-lactide)/nanosized hydroxyapatite composite structures by stereolithography*. Acta biomaterialia, 2013. **9**(4): p. 5989-5996.
218. Kim, J.Y., et al., *Evaluation of solid free-form fabrication-based scaffolds seeded with osteoblasts and human umbilical vein endothelial cells for use in vivo osteogenesis*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(7): p. 2229-2236.
219. Bose, S., et al., *Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics*. Trends in biotechnology, 2013. **31**(10): p. 594-605.
220. Lam, C.X., et al., *Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo*. Journal of biomedical materials research Part A, 2009. **90**(3): p. 906-919.
221. Lindner, M., et al., *Manufacturing of individual biodegradable bone substitute implants using selective laser melting technique*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2011. **97**(4): p. 466-471.
222. Xiong, Z., et al., *Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition*. Scripta Materialia, 2002. **46**(11): p. 771-776.
223. Sánchez-Salcedo, S., A. Nieto, and M. Vallet-Regí, *Hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering*. Chemical engineering journal, 2008. **137**(1): p. 62-71.
224. Simon, J.L., et al., *In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **83**(3): p. 747-758.
225. Eqtesadi, S., et al., *Improving mechanical properties of 13–93 bioactive glass robocast scaffold by poly (lactic acid) and poly (ε-caprolactone) melt infiltration*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2016. **432**: p. 111-119.

226. Faes, M., et al., *Extrusion-based 3D printing of ceramic components*. Procedia CIRP, 2015. **28**: p. 76-81.
227. Miranda, P., et al., *Sintering and robocasting of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications*. Acta Biomaterialia, 2006. **2**(4): p. 457-466.
228. Franco, J., et al., *Direct write assembly of calcium phosphate scaffolds using a water-based hydrogel*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(1): p. 218-228.
229. Maazouz, Y., et al., *Robocasting of biomimetic hydroxyapatite scaffolds using self-setting inks*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(33): p. 5378-5386.
230. Martínez-Vázquez, F., et al., *Effect of Polymer Infiltration on the Flexural Behavior of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Robocast Scaffolds*. Materials, 2014. **7**(5): p. 4001-4018.
231. Fu, Q., E. Saiz, and A.P. Tomsia, *Bioinspired strong and highly porous glass scaffolds*. Advanced functional materials, 2011. **21**(6): p. 1058-1063.
232. Montufar, E.B., et al., *Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010. **21**(3): p. 863-869.
233. Perez, R.A., et al., *Porous hydroxyapatite and gelatin/hydroxyapatite microspheres obtained by calcium phosphate cement emulsion*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2011. **97**(1): p. 156-166.
234. Bigi, A., B. Bracci, and S. Panzavolta, *Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2004. **25**(14): p. 2893-2899.
235. Bigi, A., et al., *Alpha-tricalcium phosphate-gelatin composite cements*. Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics, 2004. **2**(2): p. 81-87.
236. Ding, S.J. and M.Y. Shie, *The significance of gelatin in calcium phosphate hybrid bone cement for attachment and differentiation of MG63 cells*. Advanced Engineering Materials, 2011. **13**(6): p. B246-B255.
237. Davis, G.E., *Affinity of integrins for damaged extracellular matrix:  $\alpha v \beta 3$  binds to denatured collagen type I through RGD sites*. Biochemical and biophysical research communications, 1992. **182**(3): p. 1025-1031.
238. Zaman, M.H., *Understanding the molecular basis for differential binding of integrins to collagen and gelatin*. Biophysical journal, 2007. **92**(2): p. L17-L19.
239. Samant, A.N. and N.B. Dahotre, *Laser machining of structural ceramics—a review*. Journal of the European Ceramic Society, 2009. **29**(6): p. 969-993.
240. Turkoz, M., A.O. Atilla, and Z. Evis, *Silver and fluoride doped hydroxyapatites: Investigation by microstructure, mechanical and antibacterial properties*. Ceramics International, 2013. **39**(8): p. 8925-8931.
241. Rajendran, A., et al., *Synthesis, phase stability of hydroxyapatite–silver composite with antimicrobial activity and cytocompatibility*. Ceramics International, 2014. **40**(7, Part B): p. 10831-10838.
242. Ciobanu, C.S., et al., *Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria*. Nanoscale research letters, 2012. **7**(1): p. 1-9.
243. Chen, W., et al., *In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating*. Biomaterials, 2006. **27**(32): p. 5512-5517.
244. Ewald, A., et al., *Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity*. Acta biomaterialia, 2011. **7**(11): p. 4064-4070.
245. Zhou, K., et al., *Preparation and characterization of nanosilver-doped porous hydroxyapatite scaffolds*. Ceramics International, 2015. **41**(1, Part B): p. 1671-1676.
246. Carmona, V.O., et al., *Effect of Silver Nanoparticles in a Hydroxyapatite Coating applied by Atmospheric Plasma Spray*. Int. J. Electrochem. Sci, 2014. **9**: p. 7471-7494.
247. Martinez-Castanon, G., et al., *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes*. Journal of Nanoparticle Research, 2008. **10**(8): p. 1343-1348.
248. Marambio-Jones, C. and E.V. Hoek, *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(5): p. 1531-1551.
249. Suchanek, W., et al., *Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives*. Biomaterials, 1997. **18**(13): p. 923-933.
250. Safranova, T., et al., *Densification additives for hydroxyapatite ceramics*. Journal of the European Ceramic Society, 2009. **29**(10): p. 1925-1932.
251. Dubnika, A., et al., *Evaluation of the physical and antimicrobial properties of silver doped hydroxyapatite depending on the preparation method*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2014. **25**(2): p. 435-444.
252. Dubnika, A., et al., *Impact of sintering temperature on the phase composition and antibacterial properties of silver-doped hydroxyapatite*. Pure and Applied Chemistry, 2013. **85**(2): p. 453-462.

253. Chaki, T. and P. Wang, *Densification and strengthening of silver-reinforced hydroxyapatite-matrix composite prepared by sintering*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1994. **5**(8): p. 533-542.
254. Zhang, X., et al., *Toughening of calcium hydroxyapatite with silver particles*. Journal of materials science, 1997. **32**(1): p. 235-243.
255. Shi, C., et al., *Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity*. Materials Science and Engineering: C, 2015. **55**: p. 497-505.
256. Xie, F., et al., *Advanced Nano-biocomposites Based on Starch*. Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology, 2015: p. 1467-1553.
257. Lindeboom, N., P.R. Chang, and R.T. Tyler, *Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review*. Starch- Stärke, 2004. **56**(3- 4): p. 89-99.
258. Gregorová, E., W. Pabst, and I. Bohačenko, *Characterization of different starch types for their application in ceramic processing*. Journal of the European Ceramic Society, 2006. **26**(8): p. 1301-1309.
259. Molenda, M., et al., *Microstructure and mechanical parameters of five types of starch*. Polish journal of food and nutrition sciences, 2006. **15**(2): p. 161.
260. Gregorová, E., Z. Živcová, and W. Pabst, *Starch as a Pore- forming and Body- forming Agent in Ceramic Technology*. Starch- Stärke, 2009. **61**(9): p. 495-502.
261. Roslana, M.R., et al., *The Characterization of nanoHA-Balik Wangi Rice Starch Tissue Engineering Scaffold*.
262. Lawton, J., *Effect of starch type on the properties of starch containing films*. Carbohydrate Polymers, 1996. **29**(3): p. 203-208.
263. Lyckfeldt, O. and J. Ferreira, *Processing of porous ceramics by 'starch consolidation'*. Journal of the European Ceramic Society, 1998. **18**(2): p. 131-140.
264. Lemos, A. and J. Ferreira, *Porous bioactive calcium carbonate implants processed by starch consolidation*. Materials Science and Engineering: C, 2000. **11**(1): p. 35-40.
265. Rodríguez- Lorenzo, L., M. Vallet- Regí, and J. Ferreira, *Fabrication of porous hydroxyapatite bodies by a new direct consolidation method: starch consolidation*. Journal of biomedical materials research, 2002. **60**(2): p. 232-240.
266. Salgado, A.J., O.P. Coutinho, and R.L. Reis, *Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression*. Tissue Eng, 2004. **10**(3-4): p. 465-74.
267. Lemos, A. and J.M.F. Ferreira, *Combining foaming and starch consolidation methods to develop macroporous hydroxyapatite implants*. in *Key Engineering Materials*. 2004. Trans Tech Publ.
268. Gregorová, E. and W. Pabst, *Process control and optimized preparation of porous alumina ceramics by starch consolidation casting*. Journal of the European Ceramic Society, 2011. **31**(12): p. 2073-2081.
269. Rodríguez- Lorenzo, L., et al., *Hydroxyapatite ceramic bodies with tailored mechanical properties for different applications*. Journal of biomedical materials research, 2002. **60**(1): p. 159-166.
270. Kaseem, M., K. Hamad, and F. Deri, *Thermoplastic starch blends: A review of recent works*. Polymer Science Series A, 2012. **54**(2): p. 165-176.
271. Miculescu, F., et al., *Progress in Hydroxyapatite–Starch Based Sustainable Biomaterials for Biomedical Bone Substitution Applications*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017. **5**(10): p. 8491-8512.
272. Chen, L., et al. *Development of a new Injectable Calcium Phosphate Cement that contains modified starch*. in *Key Engineering Materials*. 2007. Trans Tech Publ.
273. Puntuwat, W., et al. *Processing and characterization of tissue adhesive from rice starch nanocomposites*. in *Advanced Materials Research*. 2010. Trans Tech Publ.
274. Jaya, S., T. Durance, and R. Wang, *Preparation and Physical Characterization of Gelatin–Starch/Hydroxyapatite Porous Composite Scaffold Fabricated Using Novel Microwave Energy under Vacuum Technique*. Journal of composite materials, 2009. **43**(13): p. 1451-1460.
275. Sundaram, J., T.D. Durance, and R. Wang, *Porous scaffold of gelatin–starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying*. Acta biomaterialia, 2008. **4**(4): p. 932-942.
276. Sundaram, J. and T. Durance, *Influence of processing methods on mechanical and structural characteristics of vacuum microwave dried biopolymer foams*. Food and Bioproducts Processing, 2007. **85**(3): p. 264-272.
277. Ahmed, Y.M., E.M. Ewais, and S.M. El-Sheikh, *Effect of dispersion parameters on the consolidation of starch-loaded hydroxyapatite slurry*. Processing and Application of Ceramics, 2014. **8**(3): p. 127-135.
278. Furnas, C.C., *The relations between specific volume, voids, and size composition in systems of broken solids of mixed sizes*. 1928: US Department of Commerce, Bureau of Mines.
279. Alves, H., et al., *Processing of porous cordierite bodies by starch consolidation*. Materials Research Bulletin, 1998. **33**(10): p. 1439-1448.

280. Wang, Y. and Y. Huang, *Modified-starch consolidation of alumina ceramics*. Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed., 2008. **23**(4): p. 558-561.
281. Lam, C.X.F., et al., *Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer*. Materials Science and Engineering: C, 2002. **20**(1): p. 49-56.
282. Salmoria, G.V., et al., *Structure and mechanical properties of cellulose based scaffolds fabricated by selective laser sintering*. Polymer Testing, 2009. **28**(6): p. 648-652.
283. Suwanprateeb, J., et al., *Preparation and characterizations of antibiotic impregnated microporous nano-hydroxyapatite for osteomyelitis treatment*. Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications, 2014. **26**(03): p. 1450041.
284. Yaylaoğlu, M., et al., *Development of a calcium phosphate–gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release*. Biomaterials, 1999. **20**(8): p. 711-719.
285. Chang, M.C., C.-C. Ko, and W.H. Douglas, *Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite*. Biomaterials, 2003. **24**(17): p. 2853-2862.
286. Murugan, R. and S. Ramakrishna, *Crystallographic study of hydroxyapatite bioceramics derived from various sources*. Crystal growth & design, 2005. **5**(1): p. 111-112.
287. Ivanova, E., K. Bazaka, and R.J. Crawford, *Natural polymer biomaterials: advanced applications*. New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare, 2014: p. 32-70.
288. Alves, N. and J. Mano, *Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications*. International journal of biological macromolecules, 2008. **43**(5): p. 401-414.
289. Liu, F., et al., *Novel starch/chitosan blending membrane: Antibacterial, permeable and mechanical properties*. Carbohydrate Polymers, 2009. **78**(1): p. 146-150.
290. Swetha, M., et al., *Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **47**(1): p. 1-4.
291. Yu, C.-C., et al., *Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering*. Materials Letters, 2013. **93**: p. 133-136.
292. Shakir, M., et al., *Nano-hydroxyapatite/chitosan–starch nanocomposite as a novel bone construct: Synthesis and in vitro studies*. International journal of biological macromolecules, 2015. **80**: p. 282-292.
293. Altman, G.H., et al., *Silk-based biomaterials*. Biomaterials, 2003. **24**(3): p. 401-416.
294. Sriudom, S., et al., *Role of silk fibroin and rice starch on some physical properties of hydroxyapatite-based composites*. Journal of Applied Polymer Science, 2015. **132**(45).
295. Avérous, L. and P.J. Halley, *Biocomposites based on plasticized starch*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2009. **3**(3): p. 329-343.
296. Kalambur, S. and S.S. Rizvi, *An overview of starch-based plastic blends from reactive extrusion*. Journal of plastic film and sheeting, 2006. **22**(1): p. 39-58.
297. Wang, X.-L., K.-K. Yang, and Y.-Z. Wang, *Properties of starch blends with biodegradable polymers*. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, 2003. **43**(3): p. 385-409.
298. Tang, X. and S. Alavi, *Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability*. Carbohydrate Polymers, 2011. **85**(1): p. 7-16.
299. Yu, L., K. Dean, and L. Li, *Polymer blends and composites from renewable resources*. Progress in polymer science, 2006. **31**(6): p. 576-602.
300. Gomes, M.E., et al., *Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties*. Materials Science and Engineering: C, 2002. **20**(1): p. 19-26.
301. Zhang, N.Z., et al. *Phase composition of starch-gelatin blends studied by FTIR*. in *Advanced Materials Research*. 2014. Trans Tech Publ.
302. Miyazaki, T., et al., *Effects of cross-linking agent on apatite-forming ability and mechanical property of organic-inorganic hybrids based on starch*. Materials transactions, 2007. **48**(3): p. 317-321.
303. Ohtsuki, C., T. Miyazaki, and M. Tanihara, *Development of bioactive organic–inorganic hybrid for bone substitutes*. Materials Science and Engineering: C, 2002. **22**(1): p. 27-34.
304. Vaz, C.M., R. Reis, and A. Cunha, *Use of coupling agents to enhance the interfacial interactions in starch-EVOH/hydroxyapatite composites*. Biomaterials, 2002. **23**(2): p. 629-635.
305. Cojocaru, M., *Pulberi metalice: producere si procesare*. 2009, Bucuresti: Editura Fair Partners.
306. Hutmacher, D.W., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2001. **12**(1): p. 107-124.
307. Živcová, Z., et al., *Thermal conductivity of porous alumina ceramics prepared using starch as a pore-forming agent*. Journal of the European Ceramic Society, 2009. **29**(3): p. 347-353.
308. Sopyan, I., A. Fadli, and M. Mel, *Porous alumina–hydroxyapatite composites through protein foaming–consolidation method*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2012. **8**: p. 86-98.
309. Akao, M., et al., *Dense polycrystalline  $\beta$ -tricalcium phosphate for prosthetic applications*. Journal of Materials Science, 1982. **17**(2): p. 343-346.

310. Uchino, T., et al., *Hydroxyapatite formation on porous ceramics of alpha-tricalcium phosphate in a simulated body fluid*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010. **21**(6): p. 1921-1926.
311. Uchino, T., et al., *Hydroxyapatite-forming capability and mechanical properties of organic-inorganic hybrids and. ALPHA.-tricalcium phosphate porous bodies*. Journal of the Ceramic Society of Japan, 2010. **118**(1373): p. 57-61.
312. Da Silva, M.P., et al., *Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives*. Journal of non-crystalline solids, 2002. **304**(1): p. 286-292.
313. Zhou, H. and J. Lee, *Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(7): p. 2769-2781.
314. Barabás, R., et al., *Comparative study of particle size analysis of hydroxyapatite-based nanomaterials*. Chemical Papers, 2013. **67**(11): p. 1414-1423.
315. Stasiak, M., et al., *Mechanical properties of native maize, wheat and potato starches*. Czech Journal of Food Sciences, 2013. **31**(4): p. 347-354.
316. Yang, L., et al., *Preparation of porous hydroxyapatite ceramics with starch additives*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2005. **15**(2): p. 257-260.
317. Mondal, S., et al., *Studies on processing and characterization of hydroxyapatite biomaterials from different bio wastes*. Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering, 2012. **11**(1): p. 56-67.
318. Mondal, S., et al., *Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity assessment of hydroxyapatite from different bioresources for tissue engineering application*. Bulletin of Materials Science, 2012. **35**(4): p. 683-691.
319. Williams, D.F., *Dictionar de Biomateriale*. 2006, Cluj-Napoca: Casa Cartii de Stiinta.
320. EN ISO 10993-1 – *Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*.
321. World Health Organization - *Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development*. 2010: World Health Organization.
322. Cavigliaro, J.A., *Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals*. Nature Reviews Drug Discovery, 2002. **1**(6): p. 469.
323. Zurlo, J., D. Rudacille, and A.M. Goldberg, *Animals and alternatives in testing: History, science, and ethics*. 1994: Mary Ann Liebert New York.
324. EN ISO 10993-2 – *Biological evaluation of medical devices - Part 2: Animal welfare requirements*.
325. EN ISO 10993-3 – *Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity*.
326. Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) and International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)  
- *International guiding principles for biomedical research involving animals*. 2012.
327. Tanimoto, Y., et al., *Effect of varying HAP/TCP ratios in tape-cast biphasic calcium phosphate ceramics on response in vitro*. Journal of Hard Tissue Biology, 2009. **18**(2): p. 71-76.
328. Yamada, S., et al., *Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate ratios*. Biomaterials, 1997. **18**(15): p. 1037-1041.
329. Arinze, T.L., et al., *A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3631-3638.
330. Cho, J.S., C.-P. Chung, and S.-H. Rhee, *Bioactivity and osteoconductivity of biphasic calcium phosphates*. Bioceram Dev Appl, 2010. **1**: p. 1-3.
331. Nery, E.B., et al., *Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects*. J Periodontol, 1992. **63**(9): p. 729-35.
332. Jensen, S.S., et al., *Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long- term histomorphometric study in minipigs*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2009. **90**(1): p. 171-181.
333. Hahn, B.D., et al., *Effect of the HA/β- TCP Ratio on the Biological Performance of Calcium Phosphate Ceramic Coatings Fabricated by a Room- Temperature Powder Spray in Vacuum*. Journal of the American Ceramic Society, 2009. **92**(4): p. 793-799.
334. Kong, Y.M., H.E. Kim, and H.W. Kim, *Phase conversion of tricalcium phosphate into Ca- deficient apatite during sintering of hydroxyapatite-tricalcium phosphate biphasic ceramics*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2008. **84**(2): p. 334-339.
335. Schopper, C., et al., *Bone regeneration using a naturally grown HA/TCP carrier loaded with rh BMP- 2 is independent of barrier- membrane effects*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **85**(4): p. 954-963.
336. Ye, F., et al., *A long-term evaluation of osteoinductive HA/β-TCP ceramics in vivo: 4.5 years study in pigs*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2007. **18**(11): p. 2173-2178.

337. Daculsi, G., et al., *Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study*. Journal of biomedical materials research, 1990. **24**(3): p. 379-396.
338. Malard, O., et al., *Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study*. Journal of biomedical materials research, 1999. **46**(1): p. 103-111.
339. Curran, J.M., J.A. Gallagher, and J.A. Hunt, *The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture*. Biomaterials, 2005. **26**(26): p. 5313-5320.
340. Fellah, B.H., et al., *Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2007. **18**(2): p. 287-294.
341. World Health Organization - *Handbook for good clinical research practice (GCP): guidance for implementation*. 2005.
342. Chow, S.-C. and J.-P. Liu, *Design and analysis of clinical trials: concepts and methodologies*. Vol. 507. 2008: John Wiley & Sons.
343. World Medical Association - *Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects*. Bulletin of the World Health Organization, 2001. **79**(4): p. 373.
344. World Medical Association - *Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects*. The Journal of the American College of Dentists, 2014. **81**(3): p. 14.
345. Emanuel, E.J., D. Wendler, and C. Grady, *What makes clinical research ethical?* Jama, 2000. **283**(20): p. 2701-2711.
346. Johansson, L.Å., et al., *Bone Regeneration Using a Hollow Hydroxyapatite Space - Maintaining Device for Maxillary Sinus Floor Augmentation-A Clinical Pilot Study*. Clinical implant dentistry and related research, 2012. **14**(4): p. 575-584.
347. Maidaniuc, A., et al., *Induced wettability and surface-volume correlation of composition for bovine bone derived hydroxyapatite particles*. Applied Surface Science, 2017.
348. Maidaniuc, A., et al., *Sinterability study of bovine-derived hydroxyapatite and silver microcomposites*. U.P.B. Sci. Bull., Series B, 2016. **79**(1): p. 145-154.
349. Maidaniuc, A., et al., *Effect of micron sized silver particles concentration on the adhesion induced by sintering and antibacterial properties of hydroxyapatite microcomposites*. Journal of Adhesion Science and Technology, 2016. **30**(17): p. 1829-1841.
350. Miculescu, F., *Note de curs "Incercari de microscopie electronica"*. 2014: Universitatea Politehnica Bucuresti, Facultatea de Stiinta si Ingineria Materialelor.
351. Miculescu, F., *Note de curs "Tehnici de analiza si control a biomaterialelor"*. 2010: Universitatea Politehnica Bucuresti - Facultatea de Stiinta si Ingineria Materialelor.
352. Leng, Y., *Thermal Analysis, in Materials Characterization*. 2008, John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd. p. 301-331.
353. Gabbott, P., *Principles and Applications of Thermal Analysis*. 2008: Wiley.
354. Miculescu, F., *Note de curs "Tehnici de analiza si control a biomaterialelor"*. 2010, Universitatea Politehnica Bucuresti, Facultatea de Stiinta si Ingineria Materialelor.
355. van Ekeren, P.J., *Chapter 2 Thermodynamic Background to Thermal Analysis and Calorimetry*, in *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, E.B. Michael, Editor. 1998, Elsevier Science B.V. p. 75-145.
356. Bagus, P.S., E.S. Ilton, and C.J. Nelin, *The interpretation of XPS spectra: Insights into materials properties*. Surface Science Reports, 2013. **68**(2): p. 273-304.
357. Kourkoumelis, N., I. Balatsoukas, and M. Tzaphlidou, *Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy*. Journal of biological physics, 2012. **38**(2): p. 279-291.
358. Miculescu, F., et al., *Correlation of spectrometric methods in hard tissue heavy elements concentration study*. University Politehnica of Bucharest, Scientific Bulletin, Seria A, 2013. **75**(1): p. 233-242.
359. Miculescu, F., et al. *Micro-Analytical Comparison on Elemental Composition of Nonstoichiometric Bovine Bone Derived Hydroxyapatite*. in *Key Engineering Materials*. 2015. Trans Tech Publ.
360. Coates, J., *Interpretation of infrared spectra, a practical approach*. Encyclopedia of analytical chemistry, 2000.
361. Figueiredo, M., J. Gamelas, and A. Martins, *Characterization of bone and bone-based graft materials using FTIR spectroscopy*. Infrared Spectroscopy-Life and Biomedical Sciences. In: Theophanides T, editor. Infrared Spectroscopy-Life and Biomedical Sciences, 2012.
362. van Niekerk, F., *Method development and validation for the analysis of silicon, phosphorus, chromium and metal oxides in chare chrome ferro-alloy by X-ray fluorescence spectroscopy*. 2010: Master of Science Thesis - School of Chemistry, University of the Witwatersrand.
363. Mocanu, D.R., *Incercarea materialelor. Vol. 1 Incercari distructive ale metalelor*. 1982, Bucuresti: Editura Tehnică.

364. Amza, G., *Tehnologia materialelor. Încercările materialelor*. 2008, Bucuresti: Editura Printech.
365. Yuan, Y. and T.R. Lee, *Contact angle and wetting properties*, in *Surface science techniques*. 2013, Springer. p. 3-34.
366. Coenye, T. and H.J. Nelis, *In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation*. Journal of microbiological methods, 2010. **83**(2): p. 89-105.
367. Miculescu, F., et al., *Complex analysis on heat treated human compact bones*. University Politehnica of Bucharest, Scientific Bulletin, Seria B, Chemistry and Materials Science, 2011. **73**(4): p. 203-212.
368. Miculescu, F., et al., *Effect of heating process on micro structure level of cortical bone prepared for compositional analysis*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2011. **6**: p. 225-233.
369. COMMISSION REGULATION (EU) No 722/2012 of 8 August 2012 concerning particular requirements as regards the requirements laid down in Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC with respect to active implantable medical devices and medical devices manufactured utilising tissues of animal origin.
370. Nenitescu, C.D., *Chimie generala*. 1949: Impremeria OPED-CFR, Bucuresti.
371. Gallagher, P.K., *Chapter 4 Thermogravimetry and Thermomagnetometry*, in *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, E.B. Michael, Editor. 1998, Elsevier Science B.V. p. 225-278.
372. Krauss, G., *Steels: heat treatment and processing principles*. ASM International, 1990, 1990: p. 497.
373. Absi, J. and J.C. Glandus, *Improved method for severe thermal shocks testing of ceramics by water quenching*. Journal of the European Ceramic Society, 2004. **24**(9): p. 2835-2838.
374. Aksel, C., et al., *Thermal shock behaviour of magnesia-spinel composites*. Journal of the European Ceramic Society, 2004. **24**(9): p. 2839-2845.
375. Awaji, H. and S.M. Choi, *Thermal shock tests and thermal shock parameters for ceramics*. Journal of the Korean Ceramic Society, 2012. **49**(4): p. 385-396.
376. Hasselman, D., *Strength behavior of polycrystalline alumina subjected to thermal shock*. Journal of the American Ceramic Society, 1970. **53**(9): p. 490-495.
377. Giraldo-Betancur, A., et al., *Comparison of physicochemical properties of bio and commercial hydroxyapatite*. Current Applied Physics, 2013. **13**(7): p. 1383-1390.
378. Goller, G., et al., *Effect of sintering temperature on mechanical and microstructural properties of bovine hydroxyapatite (BHA)*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2006. **37**(2): p. 111-115.
379. Alvarez-Lloret, P., et al., *Quantitative analysis of bone mineral using FTIR*. Macla, 2006. **6**: p. 45-47.
380. Panda, R., et al., *FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2003. **64**(2): p. 193-199.
381. Markovic, M., B.O. Fowler, and M.S. Tung, *Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material*. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, 2004. **109**(6): p. 553-568.
382. M. Miculescu, F.M., A. Maidaniuc, S.I. Voicu, G.E. Stan, *Correlation of the Morphology, Composition and Structure of Bovine Bone-Derived Calcium Phosphates with the Sintering Parameters*. Poster session of ESB 2017 - 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 2017.
383. Heimann, R.B. and H.D. Lehmann, *Bioceramic coatings for medical implants: trends and techniques*. 2015: John Wiley & Sons.
384. Sima, L.E., et al., *Differentiation of mesenchymal stem cells onto highly adherent radio frequency-sputtered carbonated hydroxylapatite thin films*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **95A**(4): p. 1203-1214.
385. Zeng, H. and W.R. Lacefield, *XPS, EDX and FTIR analysis of pulsed laser deposited calcium phosphate bioceramic coatings: the effects of various process parameters*. Biomaterials, 2000. **21**(1): p. 23-30.
386. Kleine-Boymann, M., et al., *Discrimination between biologically relevant calcium phosphate phases by surface-analytical techniques*. Applied Surface Science, 2014. **309**: p. 27-32.
387. Lu, H.B., et al., *Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS*. Analytical chemistry, 2000. **72**(13): p. 2886-2894.
388. Chusuei, C.C., et al., *Calcium phosphate phase identification using XPS and time-of-flight cluster SIMS*. Analytical chemistry, 1999. **71**(1): p. 149-153.
389. Hayashi, M., et al., *Optimization of physiological properties of hydroxyapatite as a vaccine adjuvant*. Vaccine, 2016. **34**(3): p. 306-312.
390. Sasikumar, S., *Effect of particle size of calcium phosphate based bioceramic drug delivery carrier on the release kinetics of ciprofloxacin hydrochloride: an in vitro study*. Frontiers of Materials Science, 2013. **7**(3): p. 261-268.
391. Gamelas, J. and A. Martins, *Surface properties of carbonated and non-carbonated hydroxyapatites obtained after bone calcination at different temperatures*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2015. **478**: p. 62-70.

392. Seah, M.P., D. Briggs, and M. Seah, *Practical Surface Analysis: By Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*. 1983: Wiley New York.
393. Bloebaum, R.D., J.L. Holmes, and J.G. Skedros, *Mineral content changes in bone associated with damage induced by the electron beam*. Scanning, 2005. **27**(5): p. 240-248.
394. Maruyama, Y., et al., *Laboratory experiments of particle size effect in X-ray fluorescence and implications to remote X-ray spectrometry of lunar regolith surface*. Earth, planets and space, 2008. **60**(4): p. 293-297.
395. Shaltout, A.A., B. Welz, and M.A. Ibrahim, *Influence of the grain size on the quality of standardless WDXRF analysis of river Nile sediments*. Microchemical Journal, 2011. **99**(2): p. 356-363.
396. Vallet-Regí, M. and D. Arcos, *Biomimetic nanoceramics in clinical use: from materials to applications*. 2008: Royal Society of Chemistry.
397. Farzadi, A., et al., *Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization*. Ceramics International, 2014. **40**(4): p. 6021-6029.
398. Wang, K., et al., *A review of protein adsorption on bioceramics*. Interface focus, 2012: p. rsfs20120012.
399. Aronov, D., et al., *Tunable hydroxyapatite wettability: effect on adhesion of biological molecules*. Process Biochemistry, 2006. **41**(12): p. 2367-2372.
400. Lim, J.Y., et al., *Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2004. **68**(3): p. 504-512.
401. Rosenman, G. and D. Aronov. *Wettability engineering and bioactivation of hydroxyapatite nanoceramics*. in *Proc Intern Tech Proc Nanotech Conf, Boston, MA*. 2006.
402. Wilson, C.J., et al., *Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review*. Tissue engineering, 2005. **11**(1-2): p. 1-18.
403. Humphries, J.D., et al., *Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin*. The Journal of cell biology, 2007. **179**(5): p. 1043-1057.
404. Hoemann, C., H. El-Gabalawy, and M. McKee, *In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization*. Pathologie Biologie, 2009. **57**(4): p. 318-323.
405. Fielding, G.A., et al., *Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(8): p. 3144-3152.
406. Herliansyah, M.K., et al., *The influence of sintering temperature on the properties of compacted bovine hydroxyapatite*. Materials Science and Engineering: C, 2009. **29**(5): p. 1674-1680.
407. Miculescu, F., et al., *Thermal degradation and morphological characteristics of bone products, acceptat pentru publicare in Reactions and Mechanisms in Thermal Analysis of Advanced Materials*, A. Tiwari and B. Raj, Editors. 2015, Wiley - Scrivener Publishing LLC.
408. Arciola, C.R., et al., *Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates*. The International journal of artificial organs, 2005. **28**(11): p. 1091-1100.
409. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces*. Biomaterials, 2013. **34**(33): p. 8018-8029.
410. Fierascu, I., et al., *Tuned apatitic materials: Synthesis, characterization and potential antimicrobial applications*. Applied Surface Science, 2018. **438**: p. 127-135.
411. Berbari, E.F., et al., *Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study*. Clinical infectious diseases, 1998. **27**(5): p. 1247-1254.
412. Ploux, L., A. Ponche, and K. Anselme, *Bacteria/material interfaces: role of the material and cell wall properties*. Journal of adhesion science and Technology, 2010. **24**(13-14): p. 2165-2201.
413. Wang, J., et al., *Synthesis of silver-hydroxyapatite composite with improved antibacterial properties*. Vacuum, 2018. **152**: p. 132-137.
414. Riaz, M., et al., *Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity*. Materials Science and Engineering: C, 2018. **90**: p. 308-313.
415. Bai, X., et al., *Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(6): p. 2264-2273.
416. Jamuna-Thevi, K., et al., *Quantification of silver ion release, in vitro cytotoxicity and antibacterial properties of nanostuctured Ag doped TiO<sub>2</sub> coatings on stainless steel deposited by RF magnetron sputtering*. Vacuum, 2011. **86**(3): p. 235-241.
417. Baruwati, B., et al., "Green" synthesized and coated nanosilver alters the membrane permeability of barrier (intestinal, brain endothelial) cells and stimulates oxidative stress pathways in neurons. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2013. **1**(7): p. 753-759.
418. Song, H., et al., *Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms*. Eur Cells Mater, 2006. **11**(Suppl 1): p. 58.
419. Choi, Y., et al., *Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver ions to Escherichia coli*. Journal of Environmental Sciences, 2018. **66**: p. 50-60.

420. Hardes, J., et al., *Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprostheses in humans.* Biomaterials, 2007. **28**(18): p. 2869-2875.
421. Vukomanović, M., et al., *Is Nano-Silver Safe within Bioactive Hydroxyapatite Composites?* ACS Biomaterials Science & Engineering, 2015. **1**(10): p. 935-946.
422. Yu, L. and G. Christie, *Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry.* Carbohydrate polymers, 2001. **46**(2): p. 179-184.
423. Hoffmann, B., et al., *A new biodegradable bone wax substitute with the potential to be used as a bone filling material.* Journal of Materials Chemistry, 2007. **17**(38): p. 4028-4033.
424. Miculescu, F., et al., *Cortical bone as resource for producing biomimetic materials for clinical use.* Digest J Nanomater Biostruct, 2012. **7**: p. 1667-77.
425. Galat, A., *Study of the Raman scattering and infrared absorption spectra of branched polysaccharides.* Acta Biochim Pol, 1980. **27**(2): p. 135-42.
426. Uribe, A.R., *Fundamentals and Characterization of Fungally Modified Polysaccharides for the Production of Bio-plastics.* 2010, University of Toronto.
427. Zeng, J., et al., *Comparison of A and B starch granules from three wheat varieties.* Molecules, 2011. **16**(12): p. 10570-10591.
428. Ishikawa, T., M. Wakamura, and S. Kondo, *Surface characterization of calcium hydroxylapatite by Fourier transform infrared spectroscopy.* Langmuir, 1989. **5**(1): p. 140-144.
429. Loy, C.W., et al., *Effects of Calcination on the Crystallography and Nonbiogenic Aragonite Formation of Ark Clam Shell under Ambient Condition.* Advances in Materials Science and Engineering, 2016. **2016**.
430. Hayashizaki, J., et al., *Preparation of Hydroxyapatite Fiber by using Alginate and its Application to Bioceramics,* in *Bioceramics.* 1994, Pergamon: Oxford. p. 41-46.
431. Duta, L., et al., *Novel doped hydroxyapatite thin films obtained by pulsed laser deposition.* Applied Surface Science, 2013. **265**: p. 41-49.
432. Landi, E., et al., *Carbonated hydroxyapatite as bone substitute.* Journal of the European Ceramic Society, 2003. **23**(15): p. 2931-2937.
433. Rey, C., et al., *The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study.* Calcified tissue international, 1989. **45**(3): p. 157-164.
434. Gibson, I.R. and W. Bonfield, *Novel synthesis and characterization of an AB- type carbonate-substituted hydroxyapatite.* Journal of biomedical materials research, 2002. **59**(4): p. 697-708.

## Lista tabelelor

<b>Tabel 2. 1.</b> Recenzii recente din principalele subdomenii ale cercetării fosfaților de calciu [99] .....	14
<b>Tabel 2. 2.</b> Influența etapelor de preparare a scaffold-urilor asupra caracteristicilor substituentului osos final .....	19
<b>Tabel 2. 3.</b> Proprietățile mecanice ale osului uman [172-175] .....	19
<b>Tabel 2. 4:</b> Metode uzuale de sinteză a pulberilor (traducere din ref. [181]) .....	23
<b>Tabel 2. 5.</b> Standarde tehnice specifice fabricației aditive [5] .....	28
<b>Tabel 2. 6.</b> Metode de fabricație aditivă utilizate pentru procesarea de amestecuri ceramică-polimer [207] .....	30
<b>Tabel 2. 7.</b> Amestecuri utilizate cu tehnica Robocasting pentru fabricarea scaffold-urilor ceramice ..	30
<b>Tabel 4. 1.</b> Compoziția chimică a probelor de țesut osos bovin tratat termic la 700 - 1200°C. Rezultate EDS exprimate în procente atomice și raportul Ca/P calculat pe baza acestora .....	59
<b>Tabel 4. 2.</b> Atribuirea benzilor FT-IR în probele de țesut osos bovin tratat termic pentru 2 – 6 ore ...	68
<b>Tabel 4. 3.</b> Compoziția chimică a suprafeței particulelor de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni. Rezultate XPS exprimate în procente atomice și raportul Ca/P calculat pe baza acestora [348] .....	72
<b>Tabel 4. 4.</b> Atribuirea benzilor FT-IR în probele de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni ale particulelor .....	73
<b>Tabel 4. 5.</b> Compoziția chimică a particulelor de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni .....	74
<b>Tabel 4. 6.</b> Compoziția chimică a particulelor de hidroxiapatită cu diferite dimensiuni .....	75
<b>Tabel 4. 7.</b> Domeniile transformărilor DSC, temperaturile de inițiere/finalizare a reacțiilor și pierderea de masă la temperatura de încheiere a reacțiilor pentru HA a.p., amidon a.p. și pulberi HA-amidon [86] .....	98
<b>Tabel 4. 8.</b> Atribuirea benzilor FT-IR în probele de hidroxiapatită-amidon [86] .....	104
<b>Tabel 4. 9.</b> Sumar al caracteristicilor proiectate pentru două variante de produs tip scaffold din hidroxiapatită cu aplicații în reconstrucția osoasă .....	111

## Lista figurilor

<b>Figura 1. 1.</b> Reprezentare schematică a contextului tezei de doctorat și a selecției materialului utilizat .....	2
<b>Figura 1. 2.</b> Reprezentare schematică a strategiei experimentale aplicate în cadrul tezei de doctorat...	3
<b>Figura 1. 3.</b> Structura lucrării de doctorat .....	4
<b>Figura 2. 1.</b> Fragment din articolul „Microscopical observations about Blood, Milk, Bones, the Brain, Spittle Cuticula, Fatt, Tears”, publicat în 1674 de A.Phillips van Leeuwenhoek [17] .....	7
<b>Figura 2. 2.</b> Fragment din articolul“Surgical bone grafting with „Os purum”, „Os novum” and „Boiled bone””publicat în 1937 de S. Orell [19] .....	7
<b>Figura 2. 3.</b> Reprezentare schematică a modificărilor induse de tratamentul termic în țesutul osos. ....	9
<b>Figura 2. 4.</b> Aspectul morfologic al zonei mediane a femurului bovin tratat termic la temperaturi de 120 - 1000°C. Selecție din ref. [74] .....	10
<b>Figura 2. 5.</b> Stabilitatea termică a țesutului osos compact (uman, bovin si porcin) la încălzirea în aer între temperatura camerei și 1400°C. Traducere din ref. [67] .....	11
<b>Figura 2. 6.</b> Analiza structurală a țesutului osos tratat termic .....	12
<b>Figura 2. 7.</b> Organizarea țesutului osos.....	15
<b>Figura 2. 8.</b> Descriere generală a hidroxiapatitei .....	16
<b>Figura 2. 9.</b> Descriere generală a $\beta$ -TCP.....	17
<b>Figura 2. 10.</b> Factori implicați în proiectarea unui produs destinat reconstrucției osoase .....	20
<b>Figura 2. 11.</b> Bibliotecă de unități structurale care pot fi utilizate pentru proiectarea de produse de tip scaffold pentru reconstructie osoasă [178].....	21
<b>Figura 2. 12.</b> Metode convenționale de fabricare a produselor ceramice poroase [197] .....	25
<b>Figura 2. 13.</b> Clasificare a tehniciilor de prelucrare a produselor ceramice [240] .....	32
<b>Figura 2. 14.</b> Descriere generală a argintului .....	33
<b>Figura 2. 15.</b> Descriere generală a amidonului .....	35
<b>Figura 2. 16.</b> Posibilități de preparare a materialelor destinate reconstrucției osoase .....	36
<b>Figura 2. 17.</b> Reprezentare schematică a etapelor sinterizării. (a) Modelul sferelor adiacente: consolidare prin difuzie superficială (1) și formarea punților de legătură între particule. (b) Modelul sferelor secante: consolidarea și densificarea prin difuzie în volum (2) sau la limita de grăunte (3). (c) Coalescența și creșterea mărimii grăunților prin alunecarea limitelor de grăunte [7].....	39
<b>Figura 2. 18.</b> Porozitatea și dimensiunea tipică a porilor obținuți prin metode convenționale de fabricare a produselor ceramice poroase [197] .....	41
<b>Figura 3. 1.</b> Principalele etape și caracteristici evaluate în cercetarea experimentală aferentă tezei de doctorat .....	48
<b>Figura 3. 2.</b> Strategii de procesare termică a țesuturilor dure animale cu parametri de tratament diferiți, a căror variație permite obținerea de produse cu caracteristici personalizate [5] .....	50
<b>Figura 3. 3.</b> Ilustrare a unghiului de contact format de o picătură de lichid pe o suprafață omogenă [366]	56
<b>Figura 4. 1.</b> Influența temperaturii de tratament asupra microstructurii țesutului osos bovin tratat termic .....	58
<b>Figura 4. 2.</b> Variația coordonatelor CIE ( $L^*C^*h$ ) și ( $L^*a^*b$ ) pentru probele de țesut osos bovin tratate termic .....	61

<b>Figura 4. 3.</b> Evaluarea stabilității termice a țesutului osos bovin pentru evidențierea influenței mediului de tratament termic asupra transformărilor asociate procesării termice a ceramicelor derivate din surse naturale. Variația fluxului de căldură cu temperatura pentru os cortical, în aer și argon (10°C/min) [5].	62
<b>Figura 4. 4.</b> Evaluarea stabilității termice a țesutului osos bovin pentru evidențierea influenței mediului de tratament termic asupra transformărilor asociate procesării termice a ceramicelor derivate din surse naturale. Variația pierderii de masă cu temperatura pentru os cortical, în aer și argon (10°C/min) [5].	63
<b>Figura 4. 5.</b> Comparație între structura țesutului osos termic tratat termic în argon sau aer, la temperaturi cuprinse în intervalul 1000 - 1200°C, față de țesutul osos bovin neprocesat. Analiza comparativă a relevanței diferențelor sesizabile între probele tratate în medii diferite, sugerând posibilitatea formării de compuși bifazici HA/β-TCP la temperaturi mai joase dacă probele sunt tratate termic în mediu de argon [5].	64
<b>Figura 4. 6.</b> Morfologia țesutului termic procesat la temperaturi înalte și răcit în condiții diferite: răcirea rapidă în apă cu gheată (B) a dus la o densificare mai accentuată a microstructurii, pentru toate temperaturile de tratament [5].	65
<b>Figura 4. 7.</b> Arhitectura grupărilor funcționale din țesutul osos tratat termic în intervalul 1000 - 1200°C. Evaluarea comparativă a spectrelor FT-IR a relevat modificări ale intensității vârfurilor caracteristice, cauzate de modificarea condițiilor de răcire (răcire lentă în aer – A vs. răcire rapidă în apă cu gheată – B) [5].	66
<b>Figura 4. 8.</b> Influența duratei de menținere asupra microstructurii țesutului osos bovin tratat termic [382].	67
<b>Figura 4. 9.</b> Modificări ale arhitecturii grupărilor funcționale din țesutul osos bovin tratat termic la 1000°C, pentru diferite dure de menținere [382].	68
<b>Figura 4. 10.</b> Difractograme reprezentative pentru țesutul osos bovin tratat termic la 1000°C, pentru diferite dure de menținere [382].	69
<b>Figura 4. 11.</b> Reprezentare grafică a adâncimii la care au loc interacțiunile dintre radiația incidentă și probă în metodele de analiză XRF, EDS, FT-IR și XPS [347].	70
<b>Figura 4. 12.</b> Morfologia pulberilor de țesut osos bovin tratat termic după măcinare și sortare granulometrică [347].	71
<b>Figura 4. 13.</b> Prezența grupărilor funcționale în pulberile de hidroxiapatită bovină cu diferite dimensiuni de particulă [347].	73
<b>Figura 4. 14.</b> Variația concentrației (at.%) elementelor chimice din pulbere de hidroxiapatită nesortată, determinată de prin metode spectrale cu diferite adâncimi de analiză [347].	76
<b>Figura 4. 15.</b> Variația concentrației (at.%) elementelor chimice din pulbere de hidroxiapatită sortată, determinată de prin metode spectrale cu diferite adâncimi de analiză [347].	77
<b>Figura 4. 16.</b> Reprezentare a variației concentratiei elementelor minor (at.%) într-o particulă ceramică de hidroxiapatită obținută din țesut osos bovin.	77
<b>Figura 4. 17.</b> Influența dimensiunii particulelor și a forței de presare asupra unghiului de contact format la depunerea unei picături de apă pe suprafața hidroxiapatitei derivate din os bovin [347].	80
<b>Figura 4. 18.</b> Evaluarea citotoxicității prin măsurarea secreției de lactat dehidrogenază (LDH) din celule MC3T3-E1 cultivate în contact direct cu probe ceramice preparate din țesut osos bovin tratat termic și cu probe de referință (plăci de polistiren – TCPS). Măsurări efectuate la 1, 3, respectiv 5 zile de la cultivare.	81
<b>Figura 4. 19.</b> Viabilitatea / proliferarea celulelor MC3T3-E1 cultivate timp de 1 – 5 zile în contact direct cu probe ceramice preparate din țesut osos bovin și probe de referință (plăci de polistiren).	

evaluată prin teste de viabilitate de tip LIVE/DEAD Cell Viability și imagini obținute din reconstrucția 3D și colorizarea imaginilor de microscopie cu ajutorul programului dedicat MountainsMap [6].....	82
<b>Figura 4. 20.</b> Viabilitatea/proliferarea celulelor preosteoblaste MC3T3-E1 cultivate în contact direct cu probe ceramice și probe de referință (plăci de polistiren – TCPS) la 1-5 zile de la cultivare; evaluare MTT .....	81
<b>Figura 4. 21.</b> Caracteristici morfologice ale celulelor preosteoblaste MC3T3-E1 la 24 ore după cultivarea pe probe ceramice și probe de referință (plăci de polistiren – TCPS) – rezultate SEM [6].	83
<b>Figura 4. 22.</b> Caracteristici morfologice ale celulelor preosteoblaste MC3T3-E1 la 24 ore după cultivarea pe probe ceramice preparate din țesut osos bovin tratat termic și probe de referință (plăci de polistiren – TCPS) – rezultate de microscopie de fluorescentă și imagini obținute din reconstrucția 3D și colorizarea imaginilor de microscopie cu ajutorul programului dedicat MountainsMap [6].	84
<b>Figura 4. 23.</b> Evaluarea mineralizării matricei extracelulară a preosteoblastelor MC3T3-E1 la 3 și 6 săptămâni după cultivarea pe probe ceramice preparate prin tratamentul termic al țesutului osos bovin și pe probe de referință (plăci de polistiren – TCPS). Stânga: rezultatele măsurării absorbanței după colorare cu Alizarin Red; dreapta: imagini digitale ale probelor analizate . ***p<0.001 vs. TCPS; **p < 0.01 vs. proba analizată la 3 săptămâni de la cultivare [6].	85
<b>Figura 4. 24.</b> Difractograme caracteristice pentru țesutul osos bovin tratat termic la 700°C și 1000°C. Rezultatele sunt prezentate comparative cu difractograma caracteristică țesutului osos nefratat termic [349].....	86
<b>Figura 4. 25.</b> Caracteristici morfo-compoziționale ale particulelor de argint utilizate ca precursori [348].....	87
<b>Figura 4. 26.</b> Caracteristici morfo-compoziționale ale hidroxiapatitei inițiale și ale amestecurilor pulvulerulente [348].....	87
<b>Figura 4. 27.</b> Comparație între morfologia corpurișelor presate obținute din hidroxiapatită cu diferite concentrații (wt.%) de argint[348] .....	88
<b>Figura 4. 28.</b> Comparație între morfologia corpurișelor sinterizate după presarea hidroxiapatitei cu diferite concentrații (wt.%) de argint [348].	89
<b>Figura 4. 29.</b> Prezența grupărilor funcționale în probele obținute după presarea cu 25MPa și sinterizarea hidroxiapatitei cu diferite concentrații (wt.%) de argint [348].....	91
<b>Figura 4. 30.</b> Curbe caracteristice obținute după încercarea la compresiune a microcompozitelor sinterizate din hidroxiapatită cu diferite concentrații de argint (exprimate ca procente de masă) [349]	92
<b>Figura 4. 31.</b> Activitatea antibacteriană a hidroxiapatitei bovine cu diferite concentrații de argint [349]	93
<b>Figura 4. 32.</b> Reprezentare grafică a metodei de preparare a compozitelor gelificate cu amidon: .....	96
<b>Figura 4. 33.</b> Curbe TGA ale HA a.p., amidonului a.p., și amestecurilor HA-amidon.....	97
<b>Figura 4. 34.</b> Curbe DSC ale HA a.p., amidonului a.p., și amestecurilor HA-amidon. ....	98
<b>Figura 4. 35.</b> Morfologia pulberilor precursori: a) amidon a.p. și HA a.p. cu diferite dimensiuni ale particulelor; b) amestec de HA (părți egale din sorturile din Fig. 4c-4f); c) <20µm; d) <50µm; e) <100µm; f) <200µm. [85].....	99
<b>Figura 4. 36.</b> Aspectul compozitelor gelificate cu diferite concentrații de amidon înaintea efectuării tratamentului termic de sinterizare (de la stânga la dreapta: 0, 5, 10, 25, 50wt. % ) .....	99
<b>Figura 4. 37.</b> Aspectul compozitelor gelificate cu diferite concentrații de amidon după efectuarea tratamentului termic de sinterizare (de la stânga la dreapta: 0, 5, 10, 25, 50wt. % ) .....	100
<b>Figura 4. 38.</b> Morfologia compozitelor gelificate HA-amidon (exprimat în wt.%) și a corpurișelor sinterizate .....	101
<b>Figura 4. 39.</b> Comparație între difractogramele reprezentative .....	102

<b>Figura 4. 40.</b> Difractograma amestecului 50% HA-50% amidon înainte de tratamentul .....	103
<b>Figura 4. 41.</b> Comparație între spectrele FT-IR înregistrate în regiunea de amprentă (a) și în regiunea grupărilor funcționale (b) ale pulberilor de HA, CaO și amidon, și ale compozitelor HA-amidon....	105
<b>Figura 4. 42.</b> Comparație între spectrele FT-IR ale amidonului în formă crudă, gelificată, respectiv gelificată și uscată. Detaliu: regiunea benzilor de întindere C-H (2800 – 3100 cm <sup>-1</sup> ) [85] .....	106
<b>Figura 4. 43.</b> Comparație între spectrele FT-IR înregistrate (a), (a*), (a**) în regiunea de amprentă și (b) în regiunea grupărilor funcționale ale pulberilor de HA, CaO, și ale probelor HA-amidon după sinterizare [85] .....	106
<b>Figura 4. 44.</b> Curbe forță-deplasare ale compozitelor HA-amidon și ale probelor sinterizate. Conținutul de amidon din probe este exprimat ca procente de masă (%)[85]. .....	107
<b>Figura 4. 45.</b> Rezistență la compresiune a probelor (a) compozite și (b) sinterizate din HA și amestecuri HA-amidon. Conținutul de amidon este exprimat în procente de masă (%)[85] .....	108
<b>Figura 4. 46.</b> Reprezentare schematică a procedeului de obținere a produselor ceramice .....	110
<b>Figura 4. 47.</b> Desen de execuție pentru un produs tip scaffold cu formă cilindrică.....	111
<b>Figura 4. 48.</b> Desen de execuție pentru un produs tip scaffold cu formă paralelipipedică .....	112
<b>Figura 4. 49.</b> a) Corp ceramic obținut după sinterizare; b) semifabricate debitate din corpul ceramic sinterizat; c) produs tip scaffold, cu dimensiuni 20 × 25 mm, după găurire ( $\phi = 1$ mm; distanța dintre găuri $d = 3$ mm); d) produse tip scaffold, diferite dimensiuni, după găurire ( $\phi = 2$ mm; distanța $d = 2$ mm) .....	113
<b>Figura 4.50.</b> a, b) Aspectul produselor ceramice obținute prin aplicarea tehnologiei de fabricare propuse; c-j) aspecte morfologice ale produselor ceramice relevante de rezultate ale analizelor SEM .....	114
<b>Figura 4. 51.</b> a) Reprezentări tridimensionale ale produsului ceramic cilindric și ale secțiunilor sale, generate de programul de proiectare (Catia V5); b) vedere longitudinală și c) vedere transversală a unui produs cilindric care poate fi obținut prin aplicarea tehnologiei propuse .....	115
<b>Figura 4. 52.</b> a) reprezentări tridimensionale ale produsului ceramic paralelipipedic și ale secțiunilor sale, generate de programul de proiectare (Catia V5); b) vedere longitudinală și c) vedere transversală a unui produs cilindric care poate fi obținut prin aplicarea tehnologiei propuse .....	115
<b>Figura 4. 53.</b> a) Captură de ecran din timpul proiecțării formei osului mandibular, înscrisă într-un cilindru cu diametrul de 30 mm și înălțimea de 50 mm. b) reprezentare tridimensională a formei implantului proiectat pentru a reda forma porțiunii de os mandibular; c) aspectul implantului care poate fi obținut după prelucrare mecanică.....	116
<b>Figura 4. 54.</b> Rezistență la compresiune estimate a produselor care pot fi fabricate conform tehnologiei propuse.....	116
<b>Figura 4. 55.</b> Rezistență la compresiune estimată a produselor fabricate conform tehnologiei propuse .....	117

## Lista abrevierilor

- $\alpha$ -TCP = alfa-fosfat tricalcic  
 $\beta$ -TCP = beta-fosfat tricalcic  
BCP = fosfat de calciu bifazic  
CAD = Proiectare asistată de calculator (eng. Computer Assisted Design)  
CaO = oxid de calciu  
CaCO<sub>3</sub> = carbonat de calciu  
CMC = carboximetilceluloză  
Darvan C = polimetacrilat de amoniu  
DSC = Calorimetrie cu scanare diferențiată (eng. Differential Scanning Calorimetry)  
EDS, EDX = Spectroscopie de raze X cu dispersie după energii (eng.. Energy Dispersive Spectroscopy)  
FDM = Fused deposition modeling (modelare prin extrudare termoplastica)  
FT-IR = Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (eng. Fourier Transform Infrared Spectroscopy)  
HA = hidroxiapatită  
Si-HA = HA dopată cu siliciu  
HCPM = 2-hidroxi-3-cardanilpropil methacrilat  
NaOH = hidroxid de sodiu  
PAA = acid poliacrilic  
PCL = policaprolactonă  
PEI = polietilenimină  
PDLLA = poli(DL-acid lactic)  
PLGA = acid polilactic-co-glicolic  
Pluronic F-127 = surfactant de tip poliol  
PVA = alcool polivinilic  
rGO = oxid de grafenă redus  
SEM = Microscopie electronică de baleaj (eng. Scanning Electron Microscopy)  
SLA = Stereolitografie  
SLS = Selective Laser Sintering (sinterizare selectivă cu laser)  
STL = Standard Tessellation Language/Standard Triangle Language  
TGA = Analiză termogravimetrică (eng. Thermogravimetric analysis; thermogravimetry)  
UV = ultraviolet  
XPS = Spectroscopie fotoelectronilor de raze X (eng. X-Ray Photoelectron Spectroscopy)  
XRD = Difracție de raze X (eng. X-Ray Diffraction)  
XRF = Spectrometrie de fluorescentă a razelor X (eng. X-Ray Fluorescence Spectroscopy)

## Lista lucrărilor publicate

Student-doctorand: **Andreea Maidaniuc**

Contractul de studii universitare de doctorat nr: **SD10/124/01.10.2015**

### **1. Brevete**

1. Cerere de brevet de inventie RO131943/30.06.2017 (A0) - F. Miculescu, **A. Maidaniuc**, M.C. Costoiu, A. Semenescu, M. Miculescu, F. Ionita - Radu, M. Arghirescu, Procedeu de obținere a unui produs tip scaffold pe baza de hidroxiapatită, pentru reconstrucția defectelor osoase majore, cu proprietăți fizico-chimice predeterminate – cerere nr A/00001 înregistrată în 04.01.2017 <http://pub.osim.ro/publication-server/pdf-document?PN=RO131943%20RO%20131943&iDocId=9633&iepatch=.pdf>

### **2. Reviste de specialitate de circulație internațională recunoscute (cotate Clarivate Analytics).**

1. **A. Maidaniuc**, M. Miculescu, S.I. Voicu, L.T. Ciocan, M. Niculescu, M.C. Corobeia, M.E. Rada, F. Miculescu, Effect of micron sized silver particles concentration on the adhesion induced by sintering and antibacterial properties of hydroxyapatite microcomposites, Journal of Adhesion Science and Technology, Volume 30, Issue 17, 2016, pp. 1829-1841, DOI: 10.1080/01694243.2016.1163808; WOS:000374585600001; ISSN: 0169-4243. Web of Science Categories: Materials Science, Multidisciplinary, IF = 1.039
2. F. Miculescu, A.C. Mocanu, C.A. Dascalu, **A. Maidaniuc**, D. Batalu, A. Berbecaru, S.I. Voicu, M. Miculescu, V. Kumar Thakur, L.T. Ciocan, Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite particles for high value nanocomposites and biomaterials, Vacuum, Volume 146, 2017, pp.614-622, DOI: 10.1016/j.vacuum.2017.06.008, WOS: 000416184600080, ISSN: 0042-207X. Web of Science Categories: Materials Science, Multidisciplinary, IF = 2.067
3. F. Miculescu, A.C. Mocanu, G.E. Stan, M. Miculescu, **A. Maidaniuc**, A. Cîmpean, V. Mitranc, S.I. Voicu, T. Machedon-Pisu, L.T. Ciocan, Influence of the modulated two-step synthesis of biogenic hydroxyapatite on biomimetic products' surface, Applied Surface Science, Volume 438, 2018, pp. 147-157. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.07.144, WOS: 000425731200016, ISSN: 0169-4332. Web of Science Categories: Materials Science, Coatings & Films, IF = 4.439
4. **A. Maidaniuc**, F. Miculescu, S.I. Voicu, C. Andronescu, M. Miculescu, E. Matei, A.C. Mocanu, I. Pencea, I. Csaki, T. Machedon-Pisu, L.T. Ciocan, Induced wettability and surface-volume correlation of composition for bovine bone derived hydroxyapatite particles, Applied Surface Science, Volume 438, 2018, pp. 158-166, WOS:000425731200017, DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.07.074; ISSN: 0169-4332. Web of Science Categories: Materials Science, Coatings & Films, IF = 4.439
5. F. Miculescu, **A. Maidaniuc**, S.I. Voicu, V. K. Thakur, G.E. Stan, L.T. Ciocan, Progress in Hydroxyapatite–Starch Based Sustainable Biomaterials for Biomedical Bone Substitution Applications. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, Volume 5, Issue 10, 2017, Pages 8491-8512, DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b02314, WOS:000412382700002, ISSN 2168-0485, Web of Science Categories: Chemistry, Multidisciplinary; IF = 6.14

### **3. Reviste de specialitate de circulație internațională recunoscute (indexate Clarivate Analytics).**

1. **A. Maidaniuc**, F. Miculescu, A.C. Mocanu, S.I. Voicu, M. Miculescu, A. Purcaru, A. Muhuleț, C. Pop, M.E. Rada, Sinterability study of bovine-derived hydroxyapatite and silver microcomposites, UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science, Volume 79, Issue 1, 2017, Pages 145-154, Web of Science Categories: Materials Science, WOS:000405772200015, ISSN:1454-2331.

2. F. Miculescu, **A. Maidaniuc**, M. Miculescu, D. N. Batalu, C. R. Ciocoiu, S. I. Voicu , G.E. Stan, V.K. Thakur, Synthesis and characterization of jellified composites from bovine bone derived hydroxyapatite and starch as precursors for robocasting, ACS Omega, Volume 3, Issue 1, 2018, Pages 1338-1349, DOI: 10.1021/acsomega.7b01855, ISSN 2470-1343, WOS:000427933200143 disponibil online la: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.7b01855>,

#### **4. Volumele unor manifestări științifice internaționale recunoscute, organizate în țară și străinătate indexate în alte Baze de Date Internationale - BDI specifice domeniului, care fac un proces de selectie a publicatiilor pe baza unor criterii de performanta**

1. F. Miculescu, **A. Maidaniuc**, S.I. Voicu, M. Miculescu, D. Batalu, Strategies for production of naturally-derived calcium phosphates particles, Advanced Materials - TechConnect Briefs 2016, Volume 3, 2016, Pages 31-34, 10th Annual TechConnect World Innovation Conference and Expo, Held Jointly with the 19th Annual Nanotech Conference and Expo, and the 2016 National SBIR/STTR Conference; Washington; United States; Code 122946, ISBN: 978-099751172-7, Document Type: Conference Paper, Indexat SCOPUS, 2016.

#### **5. Capitole în cărți publicate de edituri recunoscute**

1. F. Miculescu, **A. Maidaniuc**, G.E. Stan, M. Miculescu, S.I. Voicu, A. Cîmpean, V. Mitran, D. Batalu, "Tuning hydroxyapatite particles characteristics for solid free fabrication of bone scaffolds", in „Advanced Composite Materials (Advanced Materials Book Series)”, Eds. Ashutosh Tiwari, Mohammad Rabia Alenezi and Seong Chan Jun, WILEY-Scrivener Publishing, USA, pag. 321-397, DOI: 10.1002/9781119242666, ISBN 987-1-119-24253-6, 2016
2. F. Miculescu, A.C. Mocanu, **A. Maidaniuc**, C.A. Dascălu, M. Miculescu, S.I. Voicu, "Biomimetic Calcium Phosphates Derived from Marine and Land Bioresources", in " Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets" , Ed. Jagannathan Thirumalai (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/intechopen.71489, ISBN 978-953-51-5731-1, 2018, disponibil la <https://www.intechopen.com/books/hydroxyapatite-advances-in-composite-nanomaterials-biomedical-applications-and-its-technological-facets/biomimetic-calcium-phosphates-derived-from-marine-and-land-bioresources>

#### **6. Lucrări prezentate la conferințe internaționale**

##### **6.1. Prezentări orale**

1. **A. Maidaniuc**, S.I. Voicu, M. Miculescu, C. Andronescu, E. Matei, A.C. Mocanu, I. Pencea, I. Csaki, T. Machedon-Pisu, F. Miculescu, Induced wettability and surface-volume correlation of composition for bovine bone derived hydroxyapatite particles, Bramat 2017 - 10th International Conference on Materials Science & Engineering, 8 - 11 martie 2017, Brașov, România.
2. **A. Maidaniuc**, I.V. Antoniac, S.I. Voicu, M. Miculescu, A.C. Mocanu, F. Miculescu, Correlation between the surface and bulk composition of bovine bone derived particles for medical applications, BIOMEDETI 2017 – The International Seminar on Biomaterials & Biomechanics Approach in the Design of Hard Tissue Implants, 13-14 decembrie 2017, București, România
3. **A. Maidaniuc**, A.C. Mocanu, C.A. Dascălu, T. Butte, M. Miculescu, F. Miculescu, Research and studies regarding tridimensional structures based on powdered hydroxyapatite-based materials for bone reconstruction, Sixth edition of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of “Dunărea de Jos” University, 7-8 iunie 2018, Galați, România

##### **6.2. Postere**

1. F. Miculescu, **A. Maidaniuc**, S.I. Voicu, M. Miculescu, D. Batalu, Strategies for production of naturally-derived calcium phosphates particles, Advanced Materials - TechConnect World Innovation Conference, 22-25 mai 2016, Washington, USA
2. **A. Maidaniuc**, G.E. Stan, M. Miculescu, S.I. Voicu, A. Cîmpean, V. Mitran, D. Batalu, F. Miculescu, In vitro evaluation of calcium phosphate powders intended for solid freeform fabrication

- of bone scaffolds, BIOMMED'2016 - 7th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices”, 15-18 septembrie 2016, Constanța, Romania.
3. **A. Maidaniuc**, G.E. Stan, M. Miculescu, S.I. Voicu, A. Cîmpean, V. Mitran, D. Batalu, F. Miculescu, Evaluation of heat treatment parameters effects upon the material characteristics of bovine bone-derived calcium phosphates, RoMat 2016 - 6th International Conference on Materials Science and Technologies, 09-12 noiembrie 2016, București, Romania.
  4. F. Miculescu, A.C. Mocanu, G. Stan, S.I. Voicu, M. Miculescu, **A. Maidaniuc**, A. Cîmpean, V. Mitran, T. Machedon-Pisu, Influence of the modulated two-step synthesis of biogenic hydroxyapatite on biomimetic products` surface, Bramat 2017 - 10th International Conference on Materials Science & Engineering, 8 - 11 martie 2017, Brașov, România.
  5. **A. Maidaniuc**, M. Miculescu, S.I. Voicu, R.C. Ciocoiu, A.C. Mocanu, F. Miculescu, Hydroxyapatite and silver microcomposites with improved mechanical characteristics, RoPM-AM 2017 - 5th International Conference on Powder Metallurgy & Advanced Materials, 17-20 septembrie 2017, Cluj-Napoca, România.
  6. M. Miculescu, F. Miculescu, **A. Maidaniuc**, S.I. Voicu, G.E. Stan, Correlation of the Morphology, Composition and Structure of Bovine Bone-Derived Calcium Phosphates with the Sintering Parameters, ESB 2017 - 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 4-8 septembrie 2017, Atena, Grecia.
  7. A.C. Mocanu, **A. Maidaniuc**, C.A. Dascălu, M. Miculescu, F. Miculescu, Study on experimental and image analysis complementarity as additional tool for characterizing biogenic calcium phosphates morphology, BIOREMED 2017 - The International Seminar on Biomaterials and Regenerative Medicine BIOREMED 2017, 5-8 octombrie 2017, Timisoara, România.
  8. **A. Maidaniuc**, A.C. Mocanu, C.A. Dascălu, M. Miculescu, S.I. Voicu, F. Miculescu, Effect of sintering time on the particle interconnection of bovine bone-derived hydroxyapatite powders, BIOREMED 2017 - The International Seminar on Biomaterials and Regenerative Medicine BIOREMED 2017, 5-8 octombrie 2017, Timisoara, România.

## 7. Premii

1. Premiul Creativității 2015, acordat de Centrul Cultural al Municipiului București – ARCUB și Universitatea Națională de Artă Teatrală și Cinematografică "I.L. Caragiale" – UNATC (propunerea Universității Politehnica din București);
2. Premiul pentru cel mai bun poster științific – lucrarea "*Effect of sintering time on the particle interconnection of bovine bone-derived hydroxyapatite powders*", The International Seminar on Biomaterials and Regenerative Medicine BIOREMED 2017, 5-8 octombrie 2017, Timisoara, România
3. Premiul II pentru prezentarea lucrării "*Research and studies regarding tridimensional structures based on powdered hydroxyapatite-based materials for bone reconstruction*", Sixth editions of the Scientific Conference of the Doctoral Schools of "Dunărea de Jos" University, 7-8 iunie 2018, Galați, România

*Premii obținute pentru propunerea de brevet "Procedeu de obținere a unui produs tip scaffold pe bază de hidroxiapatită, pentru reconstrucția defectelor osoase majore, cu proprietăți fizico-chimice predeterminate" / "Method for obtaining hydroxyapatite scaffolds with predetermined physico-chemical characteristics for major bone reconstruction" Autori: Florin MICULESCU, Andreea MAIDANIUC, Mihnea Cosmin COSTOIU, Augustin SEMENESCU, Marian MICULESCU, Florentina IONITĂ-RADU, Marius ARGHIRESCU, cerere de brevet RO131943/2017*

4. Premiul Forumului Inventatorilor Români la European Exhibition of Creativity and Innovation "EUROINVENT 2017", 25-27 May 2017, Iași, Romania.
5. Medalia de aur la European Exhibition of Creativity and Innovation "EUROINVENT 2017", 25-27 May 2017, Iași, Romania.

6. Medalia de aur la Salonul Internațional de Invenții și Inovații “Traian Vuia” Ediția a III-a, 7-9 Iunie 2017, Timișoara, Romania.
7. Diploma de Excelență și Premiul Special pentru invenții valoroase (RO001/2017,) la Salonul Internațional de Invenții și Inovații “Traian Vuia”, Ediția a III-a, 7-9 Iunie 2017, Timișoara, Romania.
8. Medalia de Aur “INVENTICA 2017”, XXI<sup>th</sup> International Salon of Research, Innovation and Technological Transfer “Inventica 2017”, 28-30 Iunie, Iași, Romania.
9. Marele Premiu și Cupa pentru recunoașterea contribuției științifice și loialității la XXI<sup>th</sup> International Salon of Research, Innovation and Technological Transfer “Inventica 2017”, 28-30 Iunie, Iași, Romania.
10. Medalia de Aur , The 11th Edition of the International Warsaw Invention Show IWIS 2017, 9-11 Octombrie 2017, Varșovia, Polonia
11. Diplomă de Excelență și Medalia de Aur la Târgul Internațional de Invenții și Idei de Afaceri, “Invent Invest 2017”, Ediția a VIII-a, 12-15 Noiembrie 2017, Ungheni, Moldova
12. Diplomă de Excelență și Medalia de Aur pentru invenția la Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventiciei PRO INVENT, ediția a XVI-a, 21-23 martie 2018, Cluj-Napoca, România