



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI

Școala Doctorală Știința și Ingineria Materialelor

Splaiul Independenței, Nr. 313, Sector 6, București, 060042

Tel/fax: 021 402 9624; <http://www.sdsim.upb.ro>



Rezumatul tezei de doctorat

Contribuții privind fabricarea unor structuri 3D din pulberi biomimetice cu aplicații biomedicale

Doctorand: Ing. Aura-Cătălina Mocanu

Conducător de doctorat: Prof. Florin Miculescu

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof.dr.habil.ing. Iulian Vasile Antoniac	de la	Universitatea Politehnica din București
Conducător de doctorat	Prof.dr.habil.ing. Florin Miculescu	de la	Universitatea Politehnica din București
Membru	Prof.dr.habil.ing. Ioana Csaki	de la	Universitatea Politehnica din București
Membru	Prof.dr.ing. Cătălin Ovidiu Popa	de la	Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca
Membru	Prof.dr.ing. Mircea Horia Țierean	de la	Universitatea Transilvania din Brașov

Rezumat

Progresele continue înregistrate în știința biomaterialelor au condus la o înțelegere aproape completă a proceselor implicate în osteointegrare.

În conformitate cu această direcție generală, scopul principal al tezei de doctorat a fost (i) rafinarea unei tehnologii de sinteză complexă și reproductibilă pentru fabricarea materialelor ceramice pe bază de fosfat de calciu biomimetic (CaP) (de exemplu, fazele de hidroxiapatită și fosfat tricalcic, în proporții diferite) și (ii) dezvoltarea, implementarea și evaluarea multi-parametrică a performanțelor produselor poroase inovatoare derivate din precursori de marmură și scoici ca potențiali înlocuitori ai grefei osoase (care trebuie aplicat în chirurgia ortopedică restaurativă și reconstructivă). Tehnologia rafinată și avansată în această teză de doctorat stă la baza dezvoltării a trei tipuri de produse, ale căror performanțe mecanice și preliminare *in vitro* au fost proiectate în continuare prin adăugarea unor componente de consolidare mecanică și, respectiv, a unor agenți porogeni.

O inovație importantă este nu numai aderarea la conceptul de soluții biomedicale inspirate de natură, ci și utilizarea resurselor durabile și rentabile pentru elaborarea produselor 3D. Evaluarea fizico-chimică multi-parametrică, mecanică și biologică *in vitro* (parțial), folosind metode avansate și complementare de investigație/testare, a facilitat cu succes selectarea „algoritmilor” tehnologici pentru fabricarea structurilor 3D cu compoziție bio-ceramică personalizată, gradul de porozitate (porozitate la cerere), rețele poroase interne și caracteristici mecanice pentru o gamă largă de aplicații medicale.

Cuvinte cheie: CaPs biogeni; produse 3D personalizate; porozitate indusă la cerere

Cuprins

Introducere	2
Capitolul 1 – Stadiul actual al temei doctorale	6
1.1. Resurse biogene de carbonat de calciu utilizate în aplicații biomedicale	6
1.2. Sinteza fosfaților de calciu prin metoda de precipitare umedă	7
1.2.1. Descompunerea termică a marmurei și a scoicilor marine	7
1.2.2. Rafinarea parametrilor cheie de sinteză	8
1.2.3. Fosfații de calciu derivați după precipitare	9
1.3. Tehnologia de fabricație a produselor consolidate pe baza de fosfați de calciu	12
1.3.1. Agenți porogeni pe bază de fibre naturale	13
1.3.2. Agenți de consolidare pe bază de grafenă	17
1.3.3. Influența parametrilor de sinterizare asupra caracteristicilor globale	20
1.3.4. Reconstrucție 3D suprafață-volum a produselor	22
1.4. Caracterizarea și testarea in vitro a produselor obținute pentru aplicații biomedicale	24
Capitolul 2 – Articole publicate <i>in extenso</i>	25
Capitolul 3 – Concluzii generale	29
Capitolul 4 – Contribuții originale aduse domeniului	32
Referințe	35

Introducere

Structura osoasă naturală poate fi vizualizată ca un nanocompozit format din fracțiuni minerale interpuse într-o rețea organică. Pentru cel puțin ultimul deceniu, dezvoltarea unei abordări regenerative eficiente pentru restabilirea părților bolii, traumatizate sau deteriorate ale osului natural la starea sa anatomică, fiziologică și funcțională inițială, a constituit atât o provocare uriașă, cât și un scop în domeniul biomedical [1, 2]. Potențialul de a avansa semnificativ cunoașterea domeniului vine ca urmare a capacității osoase limitate de a se repara (în afară de fracturile scheletice mici) și, prin urmare, defectele osoase care depășesc dimensiunea critică necesită tehnici de tratament de umplere [3]. Regenerarea, restaurarea și regresul oaselor implică etape de remineralizare și resorbție.

În lumina proprietăților complexe ale țesutului osos, obținerea unei schele ideale poate fi privită ca un proces pas cu pas: (i) fabricarea materialelor biocompatibile, netoxice, neimunogene și bioresorbabile cu o rată de degradare adecvată pentru creșterea celulelor / țesuturilor *in vitro* sau *in vivo*, (ii) construirea unei structuri-cadru 3D pentru migrarea, specializarea, proliferarea și diferențierea populației de celule regenerative, (iii) asigurarea unei structuri interne poroase cu o rețea de pori / canale interconectate pentru creșterea și transportul celulelor de nutrienți în interiorul schelei și în mediul local nativ și (iv) îmbunătățirea proprietăților mecanice optime pentru fiecare aplicație [4, 5].

În ciuda eforturilor sporite depuse la fabricarea materialelor compozite polimer-ceramice ca o abordare potențială apropiată de structura și rezistența osoasă, materialele sintetice se bazează pe un mecanism de întărire intrinsec limitat care duce la o capacitate redusă de a suferi deformări mecanice ridicate [6]. Prin urmare, ruta de fabricație propusă în această teză de doctorat privește materialele personalizate și structurile 3D inspirate de natura care poartă o nouă provocare obligatorie pentru o asemănare îmbunătățită cu toate arhitectura și funcțiile complexe ale osului, pentru o rezoluție rapidă și completă a întregului os dimensiunile defectelor. Aici tema propusă rezonază mai ales cu lipsa unui astfel de produs pe piață, care este esențială pentru chirurgia reparativă și reconstructivă [7, 8].

În prezent, restaurarea defectelor osoase poate fi realizată prin mai multe metode, folosind o gamă largă de materiale naturale (alogrefă, autogrefă) sau aloplastice (biomateriale metalice, ceramice și polimerice) [9]. Autogrefele și alogrefele sunt dezavantajate de cantitatea limitată de donator de țesut, de morbiditatea acestora și de riscurile de incompatibilitate biologică și imunologică [8]. În plus față de aceste aspecte, factorul socio-economic înclină drastic echilibrul în favoarea unor noi produse biomimetice derivate din resurse naturale (biogene) [10, 11], care sunt capabile să reproducă cu precizie situl osos al implantării. Din punct de vedere tehnic și economic, necesitatea acestor produse este legată de cantitatea extinsă de material necesară pentru repararea defectelor osoase mari.

În vederea dezvoltării, implementării și promovării unui biomodel 3D cu porozitate spațială continuă și gradient de porozitate și caracteristici mecanice crescute, primul pas a vizat rafinarea tehnologiei de fabricație pentru sinteza materialelor biomimetice cu fosfat de calciu (CaP) pe baza resurselor biogene cu interes biologic regenerativ [12]. În acest sens,

rezultatele experimentale publicate în **primul articol doctoral** au expus bio-funcționalizarea resurselor de marmură și scoici ca o abordare ecologică, eficientă din punct de vedere al costurilor și durabilă pentru sinteza CaPs (hidroxiapatită, hidroxiapatită/brushite sau hidroxiapatită/monetite) prin disociere termică și tratament ulterior cu acid cu compoziție optimizată (acid fosforic în intervalul 0-90% suplimentar față de cantitatea stoichiometrică) [13]. Evaluarea in vitro atestă proprietățile lor de biocompatibilitate și posibila contribuție la refacerea/conservarea funcțiilor fiziologice ale zonelor vătămate [13].

În corelație directă, al doilea obiectiv a vizat evaluarea a trei fibre (Luffa, cânepă și lână) ca posibile șabloane naturale pentru fabricarea biotemplatelor 3D cu porozitate reglabilă. Proprietăți precum disponibilitatea largă, regenerarea, costul redus și biodegradabilitatea le recomandă ca o alternativă ecologică și durabilă. Rezultatele preliminare au fost prezentate în cel de-al doilea articol de doctorat cu privire la încorporarea cu succes a fibrelor cilindrice Luffa uscate în matricea ceramică, la diferite forțe de presare izostatică [14], fără materiale de legare sau tratamente chimice, așa cum s-a raportat de obicei [15, 16]. Materialele bioceramice au fost alese în gama stoichiometrică a acidului fosforic, ducând la sinteza hidroxiapatitei/brusitului și hidroxiapatitei din marmură și, respectiv, scoici. Consolidarea produselor verzi și generarea unui nivel ridicat de arhitecturi poroase cu interconectivitatea porilor și canalelor au fost obținute prin sinterizarea temperaturilor ridicate prin metoda modelului sacrificial (porogen) și sunt dorite pentru o creștere adecvată a celulelor și eliminarea reziduurilor rezultate din activitatea celulară [14]. Această ipoteză favorabilă a fost investigată în continuare în timpul celui de-**al treilea articol doctoral**, în ceea ce privește comportamentul termic al fibrelor în doi medii (aer și azot) [17]. Cel mai important, pe baza evaluării citotoxicității in vitro a produselor de ardere rezultate, efectuată pentru prima dată în conformitate cu literatura de specialitate, ruta propusă a expus cea mai adecvată fibră pentru fabricarea implanturilor fără risc pentru pacient [17].

Un compromis avantajos al microporozității interdependente, macroporozității și caracteristicilor mecanice este, de asemenea, necesar pentru a asigura o bună funcționare in vivo a produselor. Prin urmare, încorporarea fibrelor naturale poate induce o structură poroasă internă adecvată, dar în detrimentul rezistenței mecanice a produselor. Pentru a asigura caracteristici mecanice îmbunătățite, atât pentru produsele compacte, cât și pentru cele poroase, al treilea obiectiv evidențiază posibilitatea de a încorpora materiale pe bază de grafen, ca agent de întărire, direct în matricea ceramică, fără a fi nevoie de materiale de legare sau metode direcționate chimic, așa cum sa raportat în alte studii [18, 19]. Acest lucru a permis, de asemenea, delimitarea clară a parametrilor tehnologici optimi pentru materialele compozite propuse (amestecuri cu rapoarte de masă diferite între: pulberea ceramică/fibrele Luffa/nanoplachetele de grafenă), iar proprietățile mecanice necesare au fost reflectate pe structurile 3D după izostatic la rece presare, după cum sa raportat în ref. [20]. Un **al patrulea articol doctoral** a propus un program de sinterizare controlat, realizat în diferite medii, aplicat ambelor tipuri de produse dezvoltate (structură compactă și poroasă) [21]. Această strategie a urmărit să dezvăluie influența parametrilor de sinterizare asupra: (i) conversiei materialelor ceramice în diferite CaP pe baza raportului optim de fază a hidroxiapatitei,

fosfatului α sau β -tricalcic, (ii) capacității fibrelor Luffa de a genera arhitecturi adecvate după reducerea completă a prezenței/absenței nanoplachetelor de grafen în matricea ceramică și (iii) funcția caracteristicilor mecanice generale a tipului de produs și cantitatea de grafenă.

În fiecare etapă de cercetare, de la sinteza materiilor prime până la modelele 3D biomimetice finale, a fost realizat un protocol complex de caracterizare pentru a asigura alegerea corectă a materialelor ceramice bifazice, a fibrelor naturale (agent porogen) și a raportului de masă precis al agentului de armare încorporat pentru controlul precis al formei și proprietăților acestora. Investigațiile morfo-compoziționale (SEM / EDS) și structurale (XRD, FT-IR) au fost efectuate pe materiale pulverulente, atât pe suprafață, cât și pe secțiunea transversală a tuturor produselor. Aspectele morfologice precum textura, rugozitatea și modelele topografice stau ca factori esențiali pentru succesul biologic al materialelor ceramice [22]. Testarea formării apatitei *in vitro* este, de asemenea, imperativă pentru evaluarea aderenței celulare, a supraviețuirii și a răspunsurilor inflamatorii [23]. Împreună cu compoziția chimică, caracteristicile volumului suprafeței dictează comportamentul celular în ceea ce privește aderența, diferențierea, migrarea și proliferarea (atât *in vitro*, cât și *in vivo*) și gradul de formare a oaselor noi [24, 25]. Prin urmare, caracteristicile exhaustive ale volumului suprafeței au fost evidențiate prin cartografierea SEM și evaluarea parametrilor de rugozitate (software MountainsMap), unghiul de contact și energia liberă a suprafeței, reconstrucții 3D prin metoda nano-CT (grad de porozitate, interconectivitate pori / canale, tortuozitate, rețea poroasă internă) [14]. Datorită consolidării nanoplachetelor de grafenă, proprietățile mecanice au fost ulterior o evaluare ținută în ceea ce privește micro-duritatea, rezistența la compresiune și rezistența la îndoire pentru aplicabilitatea prognoată a produselor dezvoltate, pe baza naturii lor fragile, reproducerea fidelă a sarcinilor mecanice prezente de-a lungul os natural.

Scopul final al tezei de doctorat se referă la fluxul tehnologic optim necesar pentru fabricarea implanturilor biomimetice cu caracteristici reglabile atât pentru arhitectura poroasă internă, cât și pentru perspectivele mecanice și compoziția chimică implicită, obligatorie pentru scopul lor mai mare de biofuncționalizare (Figura 1). Structurile obținute vor răspunde, de asemenea, posibilității implanturilor la comandă de pacient. A fost depusă o cerere de brevet pentru tehnologia optimă de fabricație propusă.

Rezultatele tehnologiei dezvoltate servesc și pentru viitoarele progrese științifice originale din domeniul științific: **1)** posibilitatea combinării biomaterialelor ceramice cu elemente naturale antimicrobiene (Ag) și antibiotice, **2)** fabricarea produselor în vrac care pot fi personalizate intraoperator prin chirurgul, în funcție de necesitatea pacientului, **3)** o perspectivă sigură și eficientă pentru proprietăți mecanice îmbunătățite oferite prin prelucrarea precisă a pulberilor ceramice, **4)** evaluarea produselor biomimetice prin metode *in vitro* standardizate și dedicate, **5)** utilizarea implanturi osoase ca candidați viabili pentru medicament controlat, citostatic și mediu de livrare celulară, **6)** controlul favorabil al biomaterialelor ceramice, al rapoartelor nanoplachetelor din fibră naturală și grafen, poate duce la îndeplinirea celor mai variate cerințe implantologice pentru chirurgia ortopedică.

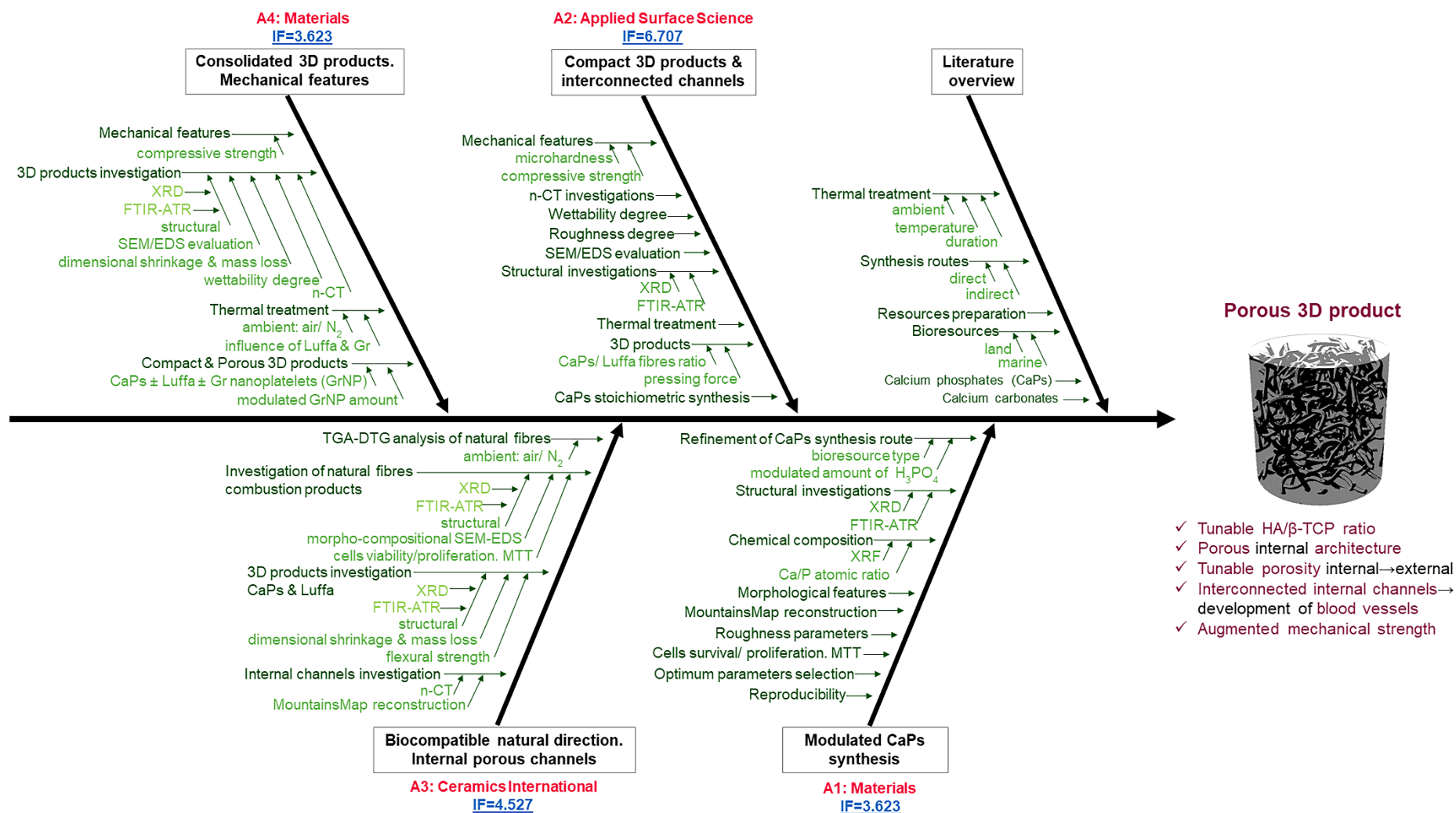


Figura 1. Reprezentare schematică a etapelor urmărite în cadrul tezei de doctorat

Capitolul 1 – Stadiul actual al temei doctorale

1.1. Resurse biogene de carbonat de calciu utilizate în aplicații biomedicale

Marea majoritate a resurselor naturale devin inutile după îndeplinirea scopului principal, transformându-se în cantități semnificative de wastes zilnic, provenite de la diferite arii industriale și companii [26, 27]. Astfel, s-a creat provocarea la nivel global de a recicla, transforma și reintegra astfel de resurse, cu impact puternic nociv asupra mediului, în materiale și produse cu valoare adăugată, una din nișele țintă abordate fiind cea de regenerare osoasă [27, 28]. Acest lucru a condus la creșterea gradului de awareness în rândul cercetătorilor, iar o parte din variatele rute de sinteză utilizate în mod current pentru obținerea materialelor pe bază de fosfați de calciu (e.g., hidrotermală, precipitare umedă, sol-gel, reacție în stare solidă) au fost adaptate pentru fiecare tip de resursă naturală sau au fost dezvoltate unele noi [27-30]. O expunere detaliată a acestora este oferită în ref. [7, 31].

Sinteza alternativă a unei noi generații de fosfați de calciu a fost raportată de la mulți precursori naturali (coji de ouă, scoici, os de pește și os de bovine) [8, 10, 11, 28, 30, 32, 33]. În a doua jumătate a secolului XX s-a dezvoltat procesul *replamineform* care constă în *replication of life forms*, aplicat în primele studii pentru preservarea arhitecturii poroase a coralilor, și ulterior și a altor resurse marine, în vederea obținerii de produse și materiale pe bază de hidroxiapatită [34, 35]. Câteva aspecte pot fi urmărite în acest sens în contrast cu materialele sintetice din punct de vedere al sustenabilității: i) economice, se reduc costurile asociate cu eliminarea bio-wastes și achiziția de substanțe chimice pe bază de calciu și fosfor, ii) procesării, metodele implică un număr redus de etape și prin urmare un timp scurt de obținere, iii) mediului înconjurător, se reduce gradul de poluare cu emisii de substanțe și/sau gaze toxice și energia consumată, și iv) resursei umane, se reduce expunerea la substanțe chimice toxice și se crește siguranța și sănătatea în muncă [26-28, 36].

Carbonatul de calciu răspândit geografic se găsește atât pe uscat (cariere de marmură), cât și în mediu marin (sisteme biologice/schelete de-a lungul coastelor - scoici, melci, corali) [12, 37]. În acest sens, disponibilitatea resurselor nu a fost un impediment, ci un element cheie pentru studiile de cercetare dezvoltate de-a lungul tezei de doctorat.

Din gama resurselor naturale pe bază de carbonat de calciu, studiile au raportat posibilitatea implicării aceleași rute de conversie pentru doi precursori autohtoni – dolomit și marble and seashells – configurându-se astfel fundația unei metode adaptate și complet reproductibile de sinteză a pulberilor de fosfat de calciu [12, 38]. Din punct de vedere structural, investigațiile efectuate la nivel de precursor indică prezența a trei forme polimorfe diferite de carbonat de calciu – calcit și dolomit pentru marmură, calcit și aragonit pentru seashells [31, 38]. Se confirmă astfel că aranjamentul morfologic stratificat este dat de dispunerea perpendiculară succesivă a lamelor de calcit/dolomit și calcit/aragonite [38].

Contrar metodelor de replicare, unul din avantajele metodei adaptate de sinteză prin precipitare umedă constă în posibilitatea dezvoltării mai departe a materialelor pulverulente în produse implantabile custom-made, conform cu necesitatea fiecărui pacient [12, 17, 21].

1.2. Sinteza fosfaților de calciu prin metoda de precipitare umedă

Necesitatea dezvoltării unei rute de sinteză și a unei tehnologii de obținere a materialelor bioceramice cu potențial de aplicabilitate în domeniul implantologiei ortopedice a fost larg diseminată în ultimele decenii [34, 39]. În ceea ce privește conversia resurselor naturale în fosfați de calciu biogeni, la începutul acestui studiu, provocările se aflau în absența datelor complete, exacte și reproductibile privind parametrii de sinteză. Un studiu recent [7] a arătat că procedurile experimentale actuale limitează caracteristicile mecanice și biologice ale materialelor derivate în mod natural, ducând la produse de calitate slabă.

O serie de răspunsuri au fost conturate însă prin prisma metodei de sinteză prin precipitare în stare umedă, însă prin implicarea de resurse biogene variate și constituite în principal din CaCO_3 drept material de bază [12, 13, 38]. Au fost dezvoltate și alte metode de sinteză bazate pe reacția dintre hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) și acid fosforic (H_3PO_4) pentru prepararea pulberii de hidroxiapatită. Cele mai multe dintre ele depind puternic de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [40]/ oxid de calciu (CaO) [16, 41] și de concentrația diferiților acizi. Calea de sinteză care stă la baza acestui studiu constă în precipitarea fosfaților de calciu prin îmbunătățirea metodei dezvoltată în 1939 de Rathje [42].

Prin urmare, acest studiu vine ca o rezoluție atât pentru studiile dedicate incomplete cât și inconsistente deja publicate, precum și pentru chirurgia otopedică reconstructivă. Începe astfel prin abordări conceptuale adoptate din unele studii [43, 44] și aplicate precursorilor selectați. Având în vedere importanța gradului de accesibilitate sporit la resursele biogene implicate în timpul sintezei, studiile derulează pe subiectul acestui teze de doctorat la două tipuri de CaCO_3 , unul regăsit în mediul terestru (marmura dolomitică, Rușchița, România) și celălalt în mediul marin (*Mytilus galloprovincialis* seashells, Marea Neagră, România).

1.2.1. Descompunerea termică a marmurei și a scoicilor marine

Necesitatea clarificării parametrilor experimentali începe din etapa preliminară a sintezei, calcinarea/ descompunerea termică a materialelor brute CaCO_3 . Studiile de cercetare plasează temperatura optimă de disociere între 600 și 1200°C, în funcție de forma polimorfă a CaCO_3 implicat [45]. A fost raportată de asemenea și influența conținutului de elemente adiționale, aduse din habitat natural la resurselor (e.g., Mg, Na, Si). Acest aspect devine important având în vedere forma dolomitică a carbonatului de calciu ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) provenit din marmura autohtonă [38]. Astfel, determinarea disocierii optime a temperaturii ambelor resurse naturale sa bazat în continuare pe reacția chimică endotermică: se eliberează dioxid de carbon (CO_2) și se formează CaO , conform reacției 1 [7, 38, 46].



Datorită influenței formei fizice a precursorilor asupra gradului de disociere [47], marmura și scoicile utilizate în procesul de sinteză au fost tăiate în bucăți reduse. Pentru a investiga și determina concret parametrii de disociere termică pentru ambele resurse selectate au fost efectuate analize TGA/DSC cu plajă de temperatură până la 1500°C și rată

de încălzire de 10°C/min [38]. În urma rezultatelor obținute, s-a confirmat atât succesiunea de transformări termice ireversibile din faza polimorfă de tip dolomit/aragonite în cea de calcit și ulterior în compus de tip CaO, pentru marmură și respectiv scoică, cât și temperatura maximă de disociere corelată cu acestea ($\sim 900^\circ\text{C}$). Pentru a se conserva însă și stabilitatea masică, s-a stabilit că la 1300°C se asigură o conversie completă a ambelor tipuri de precursori în CaO (established that at a complete decomposition of both types of precursors into CaO is ensured).

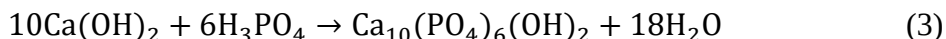
1.2.2. Rafinarea parametrilor cheie de sinteză

Temperatura de calcinare alături de concentrația reactivilor, pH-ul soluției și agitarea magnetică sunt parametrii cheie care guvernează performanța metodei de sinteză pentru aceste materiale. Concentrațiile raportate ale reactivilor variază în mare măsură între 0,15-1,0 M [40]. Aceste variabilități duc adesea la sinteza unor materiale calitative slabe cu un raport molar Ca/P mult mai diferit de cel al apatitei biologice (hidroxiapatită reacționată impură sau incompletă) [48]. Un alt factor cheie care determină gradul de conversie al materialelor precursorare în fosfați de calciu, este hidratarea oxidului de calciu rezultat în urma tratamentului termic aplicat acestora. Oxidul de calciu poate fi hidratat și transformat în hidroxid de calciu conform reacției 2. Acest pas a fost raportat ca fiind unul opțional [16], însă nu și în cazul acestei rute de sinteză. Dacă se urmărește direcția opțională, rezultatele indică o transformare incompletă a CaO în fosfat de calciu, iar cantitatea remanentă devine $\text{Ca}(\text{OH})_2$ în urma hidratării din timpul procesului de sinteză [38].



Conversia ulterioară a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a fost realizată numai prin metoda îmbunătățită. Îmbunătățirile au urmat concentrația de acid fosforic din valoarea calculată în conformitate cu stoichiometria chimică (reacția 3) și au variat prin creșterea treptată a acestuia cu 50% în studiul preliminar [38], și cu 10% în toate celelalte următoare [12-14, 17, 20, 21]. Reacția dintre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ și H_3PO_4 are la bază următoarele etape: anionii fosfat eliberați în urma dizolvării fosfaților acizi în apă reacționează cu cationii de Ca^{2+} , eliberați prelungit în urma dizolvării graduale a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ în apă, și formează o rețea coordonată denumită produs de reacție, care în condiții propice se consolidează/transformă în diverși fosfați de calciu [49, 50]. Cationii de Ca^{2+} reacționează cu moleculele de apă și formează prin hidroliză „aquisoli” încărcăți pozitiv. Aceștia reacționează la rândul lor cu anionii fosfat și formează săruri hidrofosfatice. Pe măsură ce reacția exotermă are loc, soluția se transformă într-un gel cu molecule slab interconectate. Densificarea gelului se produce gradual până în punctul în care amestecarea devine dificil de realizat. Acesta este momentul în care gelul cristalizează în jurul fiecărui grăunte de oxid de calciu nereacționat sub forma unei rețele cristaline. Gradul de cristalinitate al produșilor obținuți este dependent de rapiditatea cu care se produce dizolvarea $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Importanța agitării magnetice (stabilită la o valoare de 700 rpm) și a temperaturii constante (25°C) prezente pe tot parcursul procesului de sinteză a fost asociată cu o cristalizare crescută, o tendință redusă la formarea clusterelor și absența de urme de

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ [38]. Variația acestor parametri este imperativă, deoarece unele metode de sinteză raportate au fost considerate nesigure [7, 51].



Studiul preliminar a fost realizat începând cu o cantitate mai mică de pulbere de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (2 g) și un acid H_3PO_4 cu o concentrație mai mare (soluție 95%). Acest set-up a condus la obținerea unei probe lichide odată cu dublarea cantității de acid, în cazul pulberii derivate din scoici, și prin urmare stabilizarea limitei maxime de utilizare a reactivului chimic. În acest sens, procesul de sinteză a suferit ulterior o serie de etape de rafinare a parametrilor, stabilindu-se în primul rând proporții de amestec stoechiometric pentru pulberea de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ și H_3PO_4 , dar de concentrație mai slabă (85% solution). Astfel următoarele studii raportate [12, 52] pornesc de la un amestec de 10 g de pulbere de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ și 5.5 ml de H_3PO_4 adăugat prin pipetare cu o rată de adiție de 1 mL/min, în prezența a 200 ml de apă distilată (cantitate care a fost menținută constantă pe toată durata experimentelor). Posibilitatea modulării cantității de acid a fost redusă la un increment de 10%, fără a se atinge cantitatea dublă a acestuia. Suspensiile sintetizate de la fiecare precursor au urmat un proces de spălare-filtrare-îmbătrânire la temperatura camerei (72 h). După îndepărtarea excesului de apă, eliminarea completă a apei și acidului rămas a fost realizată prin uscarea pulberilor ceramice folosind o autoclavă (100°C timp de 2 ore). Acest pas este necesar pentru conservarea stabilității moleculare [8].

Ca rezultat, s-a stabilit că reacția dintre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ și H_3PO_4 rezultate funcționează din cantități calculate stoichiometrice cu până la 30% cantitate crescută de H_3PO_4 pentru sinteza bifazică a CaPs cu rapoarte variabile HA/brushite sau HA/monetite. Pentru a verifica reproductibilitatea rutei de sinteză pentru această plajă de H_3PO_4 și pentru a investi cantitatea de reactiv care favorizează apariția acestor tipuri de fosfați de calciu, studiile prezintă în acest teze de doctorat cu următorul interval maxim de adiție de H_3PO_4 (0% - cantitatea stoechiometrică, până la 90% - cantitatea maximă acceptată) [13].

1.2.3. Fosfații de calciu derivați după precipitare

Cel mai des menționat biomaterial pe bază de fosfat de calciu este hidroxiapatita stoichiometrică (HA) cu raport molar Ca/P de 1,67 [53]. Cu toate acestea, apatita naturală găsită în țesutul osos nu este stoichiometrică (raport molar Ca/P peste 1,67), cu grupări carbonat și urme ale unor alte elemente chimice încorporate în structura sa [54].

Conform rezultatelor raportate, pe parcursul etapelor de rafinare a metodei de sinteză concentrația în ioni de HPO_4^{4-} , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ și PO_4^{3-} se modifică odată cu pH-ul soluției [49], iar obținerea HA pure este favorizată doar în condiții stoechiometrice de preparare, și doar prin conversia pulberii de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ derivată din scoici marine [12, 13, 38, 52]. Tendința generală a transformărilor care se produc la $\text{pH} \leq 6.5$ și temperatură ambiantă este următoarea: ACP (fosfat de calciu amorf) $\rightarrow$ brushite (DCPD) $\rightarrow$ OCP (fosfat octacalcic) $\rightarrow$ HA [55]. În cazul resurselor de tip marmură dolomitică, datorită prezenței Mg în compoziția sa, se evidențiază de la prima concentrație de acid o compoziție bifazică alcătuită din HA și o fază secundară

de tip DCPD. Un substrat magnezic (prezent de la începutul reacției) influențează cristalizarea DCPD și a Hap astfel: ionii Mg^{2+} care se formează după hidroliza $Mg(OH)_2$ ocupă mai mult spațiu în rețeaua cristalină a fosfatului de calciu și deci scade gradul de cristalinitate al acestuia [55, 56]. Studiile raportează de asemenea și efectul inhibitor al magneziului asupra creșterii cristalelor de HA [57].

Brushite-ul este cel mai puțin stabil dintre fosfații de calciu cu solubilitate moderată și apare ca produs primar sau secundar în urma precipitării din soluții cu aciditate moderată sau neutre, la temperaturi de până la 40°C [55, 56, 58]. Datorită caracterului termodinamic metastabil, el poate rămâne stabil, sau dizolva, reprecipita ori dezintegra. De aceea el este considerat ca fază precursoră în formarea HA [59]. Dizolvarea sau reprecipitarea lui în faza termodinamică mai stabilă (HA) se realizează doar în medii subsaturate în calciu și ioni fosfat [60]. În particular, prezența sau absența nanocristalelor de HA, ca și produs primar format, influențează puternic gradul de formare al DCPD din moment ce nanocristalele pot servi drept nuclei și pentru formarea acestuia. Rezultatul acestei transformări constă într-un număr mai ridicat de cristale regulate, decât în cazul cristalizării directe a DCPD [56]. Recristalizarea este influențată de regulă de factori precum: temperatură, pH și prezența/absența unor ioni metalici (e.g., Mg^{2+}) [55].

Cu importanță biologică [58, 61, 62], DCPD a fost propus ca și intermediar atât în mineralizarea oaselor, cât și în dizolvarea smalțului în acizi (eroziune dentară) [63]. În medicină este folosit ca și intermediar în remineralizarea dinților și component primar pentru cimenturile pe bază de ortofosfați de calciu. În organism, particule de DCPD se găsesc în materia organică noncolagenoasă, în jurul fibrelor de collagen nonmineralizate, fiind considerate a fi „rezervorul” de ioni de calciu și fosfat necesar pentru o mineralizare ulterioară. Datorită solubilității sale ridicate comparativ cu HA (în condiții fiziologice), prezintă o rată ideală de resorbție *in vivo*, luând parte la procesul de remodelare osoasă [55, 64]. Mai mult decât atât, s-a demonstrat că DCPD tinde să se transforme *in vivo* în HA [65].

Odată cu creșterea cantității de acid și implicit prin inducerea condițiilor non-stoechiometrice de preparare, este favorizată precipitarea fazei DCPD în defavoarea celei de HA, înregistrându-se o scădere progresivă a proporției de fază de până la 18% HA [38]. Mai mult decât atât, odată atins pragul de 20% și 30% de H_3PO_4 adițional, pentru pulberea derivată din marmură și respectiv scoică, intervine și apariția fosfatului de calciu de tip monetite (DCPA). Monetitul este forma anhidră și mai puțin solubilă a brushite-ului (datorită absenței incluziunilor de apă), care poate fi cristalizată din soluții apoase, dar la 80-100 °C [58, 62]. Deși prezintă o stabilitate termodinamică mai ridicată la pH scăzut, din punct de vedere cinetic formarea brushite-ului se produce mai rapid. Pierderea în greutate a monetitului se datorează solubilității sale ridicate și se produce în favoarea apariției DCPD.

Spre deosebire de brushite, monetitul nu se regăsește în organismul uman în nicio calcifiere normală sau patologică [58]. Cu toate acestea, studiile raportează o solubilitate foarte ridicată a acestuia în mediile apoase la pH fiziologic, prin comparație cu alți fosfați biocompatibili [66].

Această suită de modificări în cazul fazelor de tip DCPD și DCPA se poate produce de la începutul reacției de transformare, fie prin precipitarea inițială a DCPD și conversia acestuia în DCPA după etapa de uscare în autoclavă, fie prin formarea directă a fazei DCPA ca urmare a unui conținut ridicat de acid în soluția de sinteză (aciditate crescută) [67]. În general, deoarece precipitarea DCPD se produce exotermic, în comparație cu mecanismul endotermic de formare al DCPA, tendința este de a forma brushite-ul ca și fază intermediară/finală stabilă [68, 69]. Odată depășit pragul de concentrații menționat mai sus, conținutul de HA a fost nedetectabil, compoziția finală până la 90% H_3PO_4 fiind bifazică de tip DCPD/DCPA în proporții diferite.

Testarea experimentală efectuată a ipotezei cercetării a condus la o tehnologie de sinteză complet reproductibilă, ușoară și ecologică, dezvoltată pentru conversia resurselor pe bază de carbonat de calciu (marmură dolomitică și scoici) în fosfați de calciu (CaPs) cu compoziție modulată [12, 13, 70]. În general, aceste rezultate confirmă posibilitatea extinderii gamei de precursori naturali pentru prepararea HA și, de asemenea, prezintă o sinteză alternativă pentru cimenturile pe bază de DCPD/DCPA.

Pentru implantarea ulterioară, compoziția chimică și de fază adecvată, precum și caracteristicile biomecanice și biologice ale materiilor prime vor fi evaluate în continuare pentru fabricarea produselor biomimetice.

1.3. Tehnologia de fabricație a produselor consolidate pe bază de fosfați de calciu

Obținerea de produse de tip scaffold cu aplicabilitate în domeniul medical a fost dezvoltată predominant prin prisma celor două categorii de metode, metode convenționale (e.g., gas foaming, progen leaching) și metode de fabricare aditivă, care permit replicarea anumitor proprietăți morfologice compatibile cu osul uman, însă nu și pe cele geometrice în domeniul micrometric [71, 72].

Din moment ce arhitectura internă a produselor dictează gradul de regenerare al țesutului osos după implantare, se urmărește modul în care acestea îndeplinesc cerințele pentru difuzia nutrienților, transportul de masă, adeziunea, proliferarea și migrarea celulară, concomitent cu cerințele mecanice specifice pentru fiecare segment osos. De aceea, focusul actual se încreaptă înspre găsirea unor metode de fabricare simplificate și cost-efficient, dar care să poată redă structura heterogenă și complexă a osului și să asigure și aportul de rezistență mecanică pentru ambele tipuri de aplicații, non- și load-bearing [34].

În această teză de doctorat, obiectivul principal a fost dezvoltarea, implementarea și promovarea unui biomodel 3D inspirat de natură cu porozitate spațială continuă și gradient de porozitate ca entitate capabilă să reproducă geometria, morfologia și rezistența structurii biologice (Figura 2). Prin această abordare, au fost abordate provocările majore: eliminarea solvenților toxici implicați în proces și lipsa proprietăților mecanice adecvate pentru aplicațiile purtătoare de sarcină. O inovație importantă este utilizarea de materiale strict biogene pe tot parcursul elaborării acestor produse, începând cu resursele brute de carbonat de calciu.

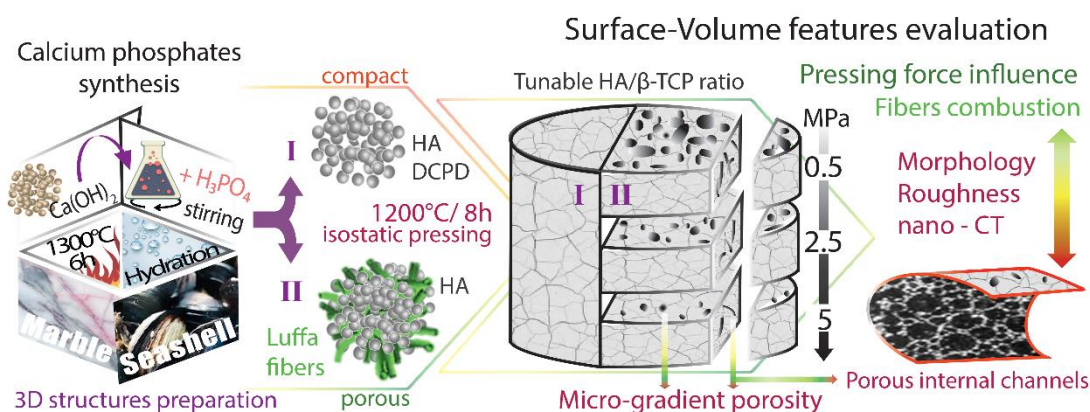


Figura 2. Reprezentare schematică a tehnologiei de fabricație urmărite în cadrul tezei de doctorat [14]

Acest studiu vine ca o necesitate primordială pentru a rezolva absența produselor similare pe piața clienților, abordările chirurgicale ortopedice cu risc ridicat pentru pacient și geometriile simpliste, caracteristicile structurale și mecanice ale structurilor 3D care nu pot oferi o compatibilitate osoasă personalizată optimă pentru un anumit caz clinic. Timpul redus necesar pentru fabricarea implanturilor biomimetice (câteva zile pentru un nou produs gata de utilizare) poate îmbunătăți calitatea vieții unui pacient - reduce perioadele de recuperare traumatică și medicală, reduce costurile generale și duce la o revenire mult mai

rapidă la curent Activității. În acest sens, sinteza și dezvoltarea materialelor și a tehnologiilor de fabricație bazate pe resurse biogene, cu interes biologic regenerativ, care pot contribui la refacerea sau conservarea funcțiilor fiziologice la nivelul zonelor vătămate, a constituit primul pas.

1.3.1. Agenți porogeni pe bază de fibre naturale

Fabricarea produselor poroase 3D a fost prevăzută prin abordarea limitărilor actuale ale dezvoltării materialelor derivate din biogen cu capacități biologice similare cu cele ale osului uman. Pentru produsele biomimetice obținute, metodele de simulare in vitro, precum și rezultatele in vivo sunt dependente de parametrii arhitecturali obținuți: i) macroporozitatea, dimensiunea porilor și caracteristicile suprafeței care promovează aderența și proliferarea celulelor, ii) nivelul ridicat de interconectivitate a porilor care permite creșterea celulelor și eliminarea reziduurilor rezultate din activitatea celulei.

Crearea și tranziția către structuri 3D poroase bazate pe materialele ceramice dezvoltate [12, 13, 38], s-au bazat în continuare pe materiale naturale cu eficiență energetică și costuri reduse. Strategiile bazate pe sisteme ierarhic poroase au fost deseori exploatate prin diferite căi de procesare pentru a obține materiale poroase. Una din direcții posibile de investigat constă în implicarea de diferite tipuri de fibră naturală drept agenți porigeni. Redirecționarea acestora în afara rolului de bază oferit în industria textilă și a modei, și implicarea în dezvoltarea de produse diferite cu destinații multiple, a condus la perceperea lor în timp drept *high performance fibers* [73].

Strategia are la bază extinderea posibilităților de obținere de noi materiale și produse disponibile la costuri avantajoase, urmărind totodată aspectele environmentally-friendly. Astfel, termeni precum regenerabil, reciclabil, biodegradabil și sustenabil au devenit cuvinte cheie și sunt evidențiate în toate studiile dedicate acestui domeniu [74-76]. O parte dintre aceste materiale regenerabile fibroase provin din activitățile agricole întreprinse pentru dezvoltarea economică a anumitor zone geografice și arii industriale (e.g., building sector, automotive, plastic industry), și prin urmare au beneficiat de o accesibilitate din ce în ce mai ridicată în ultimii ani [76-78].

Mai multe fibre naturale (de exemplu, luffa cilindrică, cânepă, lână) au apărut ca posibile șabloane naturale pentru produsele bioceramice dorite și aplicațiile biomedicale și au fost implicate în această tehnologie propusă. Mai mult, spre deosebire de binecunoscuta direcție de reinforcement, aici a fost urmată o rută mai puțin explorată, și anume *metoda șablonului de sacrificiu*. Metoda presupune folosirea fibrelor pe post de agent porogen de sacrificiu, adică încorporarea în matricea ceramică dorită, cu un anumit raport masic, și degradarea lor prin tratament termic la temperatură înaltă. În zona de încorporare a fibrelor, spațiul ocupat de acestea anterior tratamentului termic va fi transpus post sinterizare într-o rețea de pori de dimensiuni variabile și canale interconectate sub forma unui aranjament spațial intern, asemănător cu cel al osului natural [14, 17].

În acest sens, o prezentare completă a caracteristicilor fibrelor naturale, inclusiv comportamentul lor termic atât în atmosfera de sinterizare oxidativă, cât și reductivă, a fost

evaluată cu atenție în ref. [17]. Aspectele compoziționale și morfologice ale fibrelor brute au fost investigate în mai multe studii. Având în vedere că tratamentul termic aplicat este, în general, ultima etapă tehnologică fundamentală, stabilitatea termică este extrem de importantă pentru a stabili temperatura lor de disociere, reducerea previzibilă a acestora (componenta sacrificială) și influența mediului de sinterizare, după cum sa raportat în ref. [14, 17, 21]. Apoi, examinarea proprietăților morfo-compoziționale, structurale și citotoxice ale produselor de ardere rezultate (cunoscute și sub numele de caractere) care pot influența comportamentul biologic *in vitro* și *in vivo* al structurilor 3D, a fost de asemenea urmărită și dezvoltată în ref. [17].

a. Fibre de origine vegetală

Fibrele naturale de origine vegetală (e.g., *Luffa cylindrica*, hemp, cotton, sisal, bamboo, jute, lemn) beneficiază de o răspândire vastă, unele fiind regăsite predominant în zonele tropicale (e.g., *Luffa* fibres are cultivated in Asia and Africa) [79, 80]. Ele sunt considerate nanocompozite lignocelulozice compuse din fibrile de celuloză dispuse în formă de spirală într-o matrice amorfă alcătuită din compuși de tip hemiceluloză, pectină, lignină și ceară [74, 81]. Fibrilele sunt structuri reticulare tridimensionale rotunde și alungite ce prezintă secțiuni transversale goale la interior, și care sunt conectate între ele cu materiale rășinoase [74, 79]. Întreg ansamblul le conferă fibrelor vegetale proprietăți precum rezistență mecanică (tensile and flexural) și duritate considerabil ridicate, dar și o rezistență scăzută la temperaturi ridicate și la factorii de mediu care influențează procesele lor de îmbătrânire și degradare [82]. Prin urmare, utilitatea acestora a fost la început limitată la aplicații din sfera fabricațiilor textile (e.g., fashion products, mats, bath sponges, ropes, insole materials, filling materials) și mai puțin în zona industrială [74, 81].

Proprietățile benefice ale Luffei (e.g., detoxifiant, promotor pentru răcirea și circulația sângelui) au fost recunoscute în urmă cu mai bine de 400 ani [79]. Avansul științific a condus la implicarea fibrelor de *Luffa* pentru dezvoltarea de diverse produse industriale destinate pentru domenii precum cel al ingineriei farmaceutice, biotehnologie, ingineria mediului [79, 83]. În domeniul medical a fost raportată utilizarea unor bucăți de dimenisuni foarte mici de burete de *Luffa* pentru anumite afecțiuni sinusale ori ca și support pentru imobilizarea de proteine și celule [74, 84].

Din punct de vedere morfologic, fibrele de *Luffa* sunt dispuse aleatoriu și multidirecțional sub formă de rețele fibro-vasculare formând mănunchiuri, fiecare coloană internă fiind alcătuită din trei straturi dispuse de la exterior la interior (strat exterior, mijlociu și intern) [15, 34, 79]. Diametrul fibrelor variază în intervalul 0.2–1 mm pentru fiecare fibră individuală sau pe lungimea aceleași fibre, conducând la o diversitate a proprietăților [74]. Cu o utilizare mult mai îndelungată, de-a lungul mai multor civilizații, fibrele de cânepă au fost preferate datorită rezistenței ridicate și a dimensiunilor mai mari pe lungime, pentru realizarea de ropes, paper and textile products [85, 86]. Cânepa, și în principal cânepa industrială (*Cannabis sativa*), este una din plantele cele mai cultivate anual, obținându-se în final materiale sub formă de fibre și hurds [77].

În general, stratul exterior al fibrelor vegetale este format dintr-un conținut bogat în lignină și/sau pectină, care înconjoară omogen întreaga fibră, urmat de stratul mijlociu de celuloză și cel intern alcătuit din hemiceluloză [74]. Celuloza este un polizaharid natural semicristalin alcătuit din unități de anhydroglucoză conectate prin legături glicozidice și cu un grad ridicat de polimerizare [82, 87]. Hemiceluloza nu este un tip de celuloză, ci se diferențiază de aceasta prin prisma numărului și tipului de unități de zahăr, precum și a gradului de polimerizare redus cu un ordin de mărime de 10–100 ori, iar lignina este un polimer hidrocarbonat alcătuit din compuși alifatici și aromatici [82]. Polimerii de tip hemiceluloză și lignină sunt complet amorfii [77]. În funcție de condițiile habitatului în care au crescut (e.g., tip de sol, climă, specie), compoziția chimică a fibrelor poate diferi, însă majoritatea studiile raportează prezența elementelor precum C, O, N, P, Si [74, 84, 87]. O analiză elementală și structurală detaliată a fibrelor raw se regăsește în ref. [83].

Ipoteza prezentată în tehnologia propusă se bazează pe faptul că degradarea termică a materialelor pe bază de celuloză (toate fibrele naturale) duce la o pierdere de masă de 60% în greutate între 300-500°C și se termină până la 800°C cu formarea unui mic reziduu cărbunos [88]. Mai exact, procesul de degradare termică al acestora are la bază o succesiune de procese, care în funcție de condițiile de tratament termic (e.g., contactul direct cu atmosfera de lucru, existența/absența unor stimuli fizico-chimici de căldură, concentrația de oxygen), conduc la combustia fibrelor: deshidratare, depolimerizare, descompunerea compușilor rezultați în urma depolimerizării, formarea de produse non-volatile intermediare și descompunerea acestora [80, 81]. Aceste procese sunt delimitate în trei etape de descompunere, fiecare având asociat un interval de temperatură datorat influențelor aduse de mediul natural al fibrelor [89, 90]. Etapa preliminară cuprinde degradarea fibrelor prin deshidratare până la aproximativ 105°C [81]. Odată cu creșterea progresivă a temperaturii, se produce aprinderea fibrelor (etapa principală de ardere) prin depolimerizarea rapidă a stratului de celuloză și a celui de hemiceluloză, concomitent cu debutului degradării stratului de lignină și pectină [77, 80, 87]. Procesul de ardere se încheie la aproximativ 400–450°C prin ruperea completă a legăturilor dintre unitățile glicozil și formarea de produși de ardere/combustie (also known as *chars*) [80]. Cantitatea de lignină rămasă își poate continua procesul de disociere uneori chiar și până la temperatura de 900°C [87]. Se consideră că până la această temperatură, are loc etapa de descompunere fără ardere a tuturor produșilor de combustie formați prin fenomene de cracare și reformare, rezultând un material cărbunos (char) [81, 91].

b. Fibre de origine animală

Proteinele de tip keratină se regăsesc în rândul păsărilor, mamiferelor și al reptilelor sub diverse forme de material exoschelet ca și componentă principală (e.g., hair, feather, skin, horns) [92, 93]. Acestea sunt unele din cele mai răspândite proteine non-food, ieftine și regenerabile, cu o cifră de câteva milioane de tone produse anual ca urmare a activităților derulate de multiple arii industriale [93-95].

În ultimul deceniu, valorizarea și reciclarea acestor tipuri de resurse naturale, preponderant cele sub formă de fibre, a stârnit interesul și au fost propuse proceduri de extracție și purificare a keratinei din compoziție [94, 96]. Mai departe, keratina poate fi reintegrată în dezvoltarea de noi materiale (e.g., films, sponges, gels, foams) pentru diverse domenii precum cel farmaceutic, cosmetic, biotehnologic, medicinal, textil și non-textil [95, 97]. În domeniul medicinal a fost raportată ca fiind avantajoasă pentru aplicații de tip drug delivery, tissue reconstruction, ori ca și material de implantare [97].

Keratina este caracterizată de stabilitate termică ridicată, solubilitate redusă și de un aranjament structural complex dat de dispunerea încrucișată a legăturilor duble de sulf dintre aminoacizii cisteină din componență [92, 93, 96]. Nivelul de sulf și cisteină diferă în funcție de zona investigată – pentru fibrele de lână s-a constatat că stratul exterior este bogat în cisteină și legături de S, pe când cortexul este alcătuit din microfibrile cu conținut scăzut de S [93]. Prin urmare, rezistența și stabilitatea fibrelor de origine animală sunt oferite de un conținut ridicat de sulf [92]. La nivel structural, modelele de difracție caracteristice ale fibrelor redau existența fie a keratinei de tip α , fie a celei de tip β , cu excepția materialelor provenite de la păsări sau reptile care pot produce ambele tipuri. Tot aparte sunt și fibrele de lână care în starea naturală prezintă doar α keratin helixes, însă odată cu deformarea acestora apar și structurile de tip β [92]. Ambele structuri fibrilare sunt integrate într-o matrice amorfă de polipeptide interconectate [98].

Atunci când sunt expuse la temperaturi ridicate, fibrele de lână prezintă un caracter de degradare de la interior la exterior, procesul debutând cu pierderea apei adsorbite până la temperatura de 120–190°C [93, 98]. Descompunerea se continuă în două etape succesive, prin denaturarea structurilor cu conținut scăzut de sulf regăsite sub formă de keratină α , până la aproximativ 250°C [96]. Peste temperatura de 300°C și până la aproximativ 600–620°C se produce și descompunerea graduală a structurilor bogate în sulf de tip β [93, 94]. Procesul se consideră astfel încheiat, produsul de combustie rezultat prin volatilizarea keratinei duble fiind alcătuit din diverși compuși pe bază de azot și sulf [93, 96].

c. Produse realizate cu fibre naturale

Unele metode destinate obținerii compozitelor din fibre naturale/colagen/polimer și hidroxiapatită au fost deja brevetate [99]. Cu toate acestea, se concentrează pe păstrarea aspectului poros al șablonului natural [2, 6, 34] care nu corespunde în ceea ce privește accesibilitatea și regenerarea resurselor naturale, nivelul predefinit de porozitate, dimensiunea și forma porilor, morfologia și comportamentul mecanic al produsului final.

Mai exact, pentru realizarea de produse, bucăți de dimensiuni și forme definite de Luffa sunt în general secționare și folosite ca și material schelet [16, 100, 101]. Procedura de pregătire a acestora implică de regulă: spălare și/sau hidratare în apă distilată pentru câteva minute până la câteva ore [16, 100], imersare în soluție de hidroxid de sodiu [15, 74, 100] sau expunere la diverse tratamente chimice (alkali, agenți pe bază de silan, macerare) ori fizice (corona discharge) [74]. Când intră în contact cu astfel de substanțe, se produc modificări benefice, la nivel structural și al suprafeței fibrelor naturale, pentru îmbunătățirea proprietăților mecanice ori a abilităților de absorpție [74, 78]. Scheletul astfel pregătit este

mai departe imersat/impregat în/cu soluție liant preparată cu polimeri de tip amidon [16], PVA [101, 102], celuloză și/sau PLLA [15], wood chips [100] și pulbere pe bază de fosfați de calciu, în proporții diferite. Urmează apoi etapa de uscare (câteva ore până la câteva zile la temperatură ambiantă) și/sau sinterizare pentru eliminarea scheletului, la temperatură în plajă 600–1250°C, timp de 2 ore [16, 100-102]. Urmând procedura, arhitectura scheletului este cea care va dicta și aranjamentul intern de pori/canale interconectate sau nu al produselor ceramice rezultate. Pentru aplicațiile industriale, care necesită realizarea unor produse compozit ranforsate cu un grad ridicat de adeziune între fibre și materialul matrice, etapa de îndepărtare prin sinterizare a scheletului fibros este eliminată [90, 103, 104].

Regenerarea osoasă necesită dimensiuni ale porilor între 100-150 μm ; o vascularizare și o osificare corespunzătoare necesită un diametru al porilor de cel puțin 300 μm [105]. Dimensiunea minimă a porilor pentru a atinge o porozitate adecvată este considerată de la 100 μm până la 1000 μm pentru regenerarea osoasă *in vivo*, în timp ce osteogeneza *in vitro* necesită un ordin de mărime mai mic [106]. Mai mult, dimensiunea interconectărilor variază în intervalul de 15-50 μm , ceea ce poate asigura vascularizația structurii și o suprafață mai mare [5, 14]. O vascularizare adecvată este esențială pentru colonizarea celulelor osteoblaste și creșterea osoasă [5]. Acest lucru se traduce prin prognoza de abordare a mai multor cerințe ortopedice legate de gradul de micro / macro-porozitate și interconectivitate [26].

Până în această etapă, puține studii de cercetare au fost publicate cu privire la cadrul potențial al structurilor poroase bazate pe fosfați de calciu biocompatibili din natură și 14% în greutate din fibre de luffa, prin metoda șablonului de sacrificiu. Procedura propusă în acestea implică însă utilizarea unui schelet ceramic și amestecarea fibrelor de Luffa fără agenți sau soluții liante pentru generarea unui grad și model de porozitate personalizat [14, 17, 21]. Astfel se poate simula distribuția aleatorie a porilor și canalelor (tortuozitate) și a procentului de porozitate în conformitate cu regiunea osoasă afectată. Rezultatele au arătat că arderea fibrelor la 1200°C a dus la formarea cu succes a unei structuri poroase cu pori și canale interconectate și porozitate micro-gradientă formată în interiorul canalelor [14, 17]. Mai mult, porozitatea totală (max. $\approx 20\%$) și caracteristicile mecanice au fost influențate și de forța de presare. Creșterea forțelor de presare pentru dezvoltarea produselor 3D favorizează valorile rezistenței la compresiune asemănătoare oaselor (20-65 MPa), dar reduc dimensiunile porilor și canalelor și, posibil și, capacitatea de vascularizație și creștere osoasă [14].

1.3.2. Agenți de consolidare pe bază de grafenă

Având în vedere compromisul evidențiat între caracteristicile mecanice și arhitecturale ale produselor 3D, a fost urmărit în continuare un mecanism de întărire prin incorporarea materialelor pe bază de grafen (maxim 2% în greutate) pentru a susține biofuncționalizarea structurilor poroase. În special, datorită armăturii cu grafen, proprietățile mecanice au fost o evaluare țintă în ceea ce privește micro-duritatea, rezistența la compresiune și rezistența la îndoire [20, 21]. Alegerea lor este în general motivată de-a

lungul sarcinilor mecanice de-a lungul osului natural și a aplicabilității prognozate a produselor dezvoltate.

Având în vedere caracterul fragil și rezistența la uzură, tracțiune și rupere scăzute a structurilor ceramice pe bază de fosfați de calciu (poroase și compacte), necesitatea ranforsării acestora a devenit o direcție de cercetare în sine [107-110]. Odată cu apariția unui defect, ruperea fragilă se produce rapid de la suprafața structurii către interior, având efecte catastrofice chiar din primele stagii de la momentul implantării, motiv pentru care utilizarea unor astfel de produse pentru aplicații load-bearing de reconstrucție osoasă a fost restricționată [111-114]. Prin urmare, studiile de cercetare vizează combinarea și consolidarea materialelor pe bază de fosfați de calciu cu alte materiale cu caracteristici adecvate pentru implantare [115]. În ultimul deceniu, unele dintre materialele care au stârnit din ce în cel mai mult atenția cercetătorilor sunt cele pe bază de grafenă [116, 117].

Termenul de grafenă este dedicat pentru aranjamentul de tip unistrat al atomilor de carbon cu structură sub formă de fagure, grafena fiind un prim exemplu de cristal bidimensional [116, 118, 119]. Plecând de la numărul de straturi succesive de atomi de carbon (între 2–10 straturi), s-au dezvoltat ulterior o serie de materiale derivate, denumite și *familia materialelor pe bază de grafenă*, cu grosime maximă de aproximativ 100 nm: graphene nanoplatelets (GNP), graphene nano-sheets (GNS), graphene nano-tubes (GNT), graphene nano-onions (GNO), graphene nano-ribbons (GNR), oxid de grafenă (GO) și oxid de grafenă redus (rGO), ultimele două fiind obținute prin metode chimice de oxidare [18, 118]. Grafena poate fi sintetizată prin mai multe procedee fizice și chimice, fiecare conducând la obținerea unei morfologii diferite a materialului, de unde și denumirile prezentate mai sus [18]. Datorită proprietăților lor mecanice (Young modulus =0.5–1 TPa, intrinsic strength $\approx$ 130 GPa), de suprafață, electrice, termice, chimice, optice și biologice, materialele pe bază de grafenă au fost introduse și în aplicațiile din domeniul biomedical (e.g., ortopedice, drug delivery, biosensing, cancer therapy) ca și ranforsanți mecanici, pentru îmbunătățirea stabilității și rezistenței mecanice a diferitelor tipuri de produse [107, 115, 120-123].

Încorporarea de materiale pe bază de grafenă ca și fază secundară pentru consolidarea produselor ceramice destinate regenerării osoase conduce atât la creșterea rezistenței mecanice, cât și la îmbunătățirea proprietăților structurale și biologice, mai ales că odată expuse la temperaturi mai mari de 600°C grafena se oxidează și este alterată structural progresiv [124, 125]. Pentru a produce efectele dorite, trebuie acordată o atenție deosebită procesului de încorporare în materialul matrice, astfel că s-au identificat o serie de factori care pot influența considerabil comportamentul final al produselor: i) puterea de legătură interfațială, ii) cantitatea de grafenă, iii) metoda și gradul de dispersie/distribuire, iv) caracteristicile mecanice ale matricei, v) dimensiunile particulelor matricei de pulbere, vi) eficiența stresului și transferul de sarcină de la matrice la grafenă și vii) pregătirea produselor armate [19-21, 121, 126].

Pentru produsele compozit pe bază de fosfați de calciu și grafenă, mecanismele de ranforsare vizează formarea unei bariere de propagare a fisurilor prin devierea fisurilor,

ramificarea și unirea acestora [19]. Grafena sub formă de nanoplatelets prezintă o suprafață specifică mai ridicată și un aranjament tridimensional de tip multi-layer de graphene sheets (între 10 și 30), fiind capabilă să îmbrace particulele ceramice și să genereze o creștere a suprafeței de contact cu materialul matrice [110, 127]. De asemenea, morfologia, dimensiunea și rugozitatea suprafeței a GNP joacă un rol important pentru transferul de sarcină mecanică de la matricea ceramică, facilitând augmentarea mechanical interlocking and barrier (e.g., rezistență, rigiditate, duritate) și îmbunătățirea modulului elastic al produselor [127].

Studiile raportează ranforsarea cu succes a HA și/sau a materialelor bifazice HA/ β -TCP cu grafenă de tip GO, rGO, nano-platelets, prin diverse metode precum, sinteză in-situ, sinterizare cu plasmă, electro-spinning sau depunere, presare izostatică la cald (HIP), pulverizare la rece în vid și amestecare convențională [114, 128-130]. Datorită grupărilor funcționale care se pot detașa și reatașa cu ușurință (formând materiale hibride), oxidul de grafenă (GO) a fost indicat ca fiind adecvat pentru aplicații industriale ce necesită modificarea suprafeței grafenei [131]. De asemenea, s-a demonstrat și influența funcționalităților de oxigen asupra cristalizării HA, nanocristalele putând crește pe suprafața GO sau rGO [132].

Produsele compozit pe bază de HA și grafenă se pot realiza sub diferite forme (e.g., powder, bulk, scaffold, coating, film), fiecare având destinată un tip de aplicație (e.g., reconstrucția osoasă, acoperirea implanturilor metalice) [19]. Procesul de preparare al produselor compozit a fost raportat în unele studii cu o primă etapă de pregătire a suprafeței materialelor pe bază de grafenă (mostly GO and rGO) în soluție de alcool izopropilic, clorură de calciu și apă (raport volumic 1:1) și ultrasonare/agitare magnetică continuă timp de câteva zeci de minute, urmând ca pulberea de HA să fie adăugată în soluția rezultată; produsul final ranforsat rezultă după etapa de uscare timp de o zi la 40°C ori prin liofilizare [133, 134]. Pentru materialele de tip GO și rGO prepararea se poate realiza în soluție, dată fiind capacitatea excelentă de dispersie a acestora în medii apoase [113]. Datorită acestor proprietăți, GO poate fi folosit și pentru legarea de ioni metalici sau nanoparticule [134].

Încorporarea materialelor de tip GNP a fost raportată atât prin rute umede cât și uscate. În primul caz, soluțiile sunt diferite față de GO/rGO, mostly pe bază de bromuri, iar suspensia creată cu pulberea ceramică este supusă mai departe la etape de amestecare prin ball milling și presare la cald [135]. Pentru a reduce și chiar elimina riscul contaminării materialelor pe această cale, studiile publicate recent propun ranforsarea matricei ceramice prin încorporarea mecanică și dispersarea prin ultrasonare a GNP, independent de cantitatea de agent utilizată [20, 21]. Obținerea produselor se realizează tot prin presare, însă la temperatura ambiantă. În timpul compactării și presării se produce orientarea preferențială a GNP între particulele ceramice, blocând astfel formarea și propagarea fisurilor sau extinderea ariei acestora [135].

Îmbunătățirea funcțiilor mecanice a fost în general corelată cu raportul masic între matricea de HA/material pe bază de grafenă (GO, rGO, GNS, GNP) și gradul de omogenizare a acestor materiale, astfel că o cantitate de GO/rGO de 1 wt.% a condus în

general la o creștere a durității cu $\approx 30\%$, a modului de elasticitate cu $\approx 50\text{--}70\%$ și a rezistenței la rupere (fracture toughness) cu $80\text{--}100\%$ [127, 128, 130]. Comparativ cu un produs doar pe bază de HA, rezistența la rupere și rezistența la compresiune a produselor compozit poate atinge chiar și valori duble odată cu încorporarea unei cantități de 5 wt.% de grafenă, încadrându-se în plaja de valori raportată pentru osul natural trabecular [120, 126]. Îmbunătățirea proprietăților tribologice a produselor a fost explicată ca fiind efectul formării unei pelicule aderente pe bază de carbon pe anumite zone din suprafața particulelor/produselor în momentul uzurii [116].

În cazul produselor ranforsate cu GNP, rezistența la încovoiere și fracture toughness au înregistrat creșteri de până la 55% și respectiv 75% comparativ cu valorile obținute pentru produsele fără agent de ranforsare [135], iar rezistența la compresiune a atins valori cel puțin duble la rația de 1 wt.% GNP [20, 21]. Studiile cele mai recent publicate [20, 21] expun de asemenea și posibilitatea ranforsării unor structuri poroase dezvoltate prin intermediul fibrelor naturale (consolidarea matricei ceramice expuse pe cele două rute din Figura 2), și delimitează concret cantitatea de grafenă optimă pentru ambele tipuri de produse (compacte și poroase).

1.3.3. Influența parametrilor de sinterizare asupra caracteristicilor globale

Conform strategiei propuse în această teză de doctorat, au fost dezvoltate trei produse diferite, funcție de adăugarea și încorporarea a doi agenți, fibre Luffa și nanoplachete de grafen ca porogen și, respectiv, consolidare mecanică ($\text{CaPs} \pm \text{Luffa} \pm \text{GNP}$) [13, 14, 17, 20, 21]. Consolidarea produselor presate finale a fost realizată prin sinterizare la temperatură ridicată. Sinterizarea este o etapă crucială pentru inducerea caracteristicilor definitorii ale produselor, acționând asupra acestora prin mecanismul tipului difuziei la suprafață și la limitele de grăunte, difuziei în volum și evaporare-condensare, conducând în final și densificarea microstructurii [136, 137].

Procesul de sinterizare, în funcție de temperatură și mediul de lucru, stabilește caracteristicile compoziționale, arhitecturale și comportamentul mecanic al structurilor ceramice [138-140]. Această strategie permite ajustarea matricei ceramice la diferite compoziții de fază HA/TCP după sinterizare, fără oxid de calciu rezidual. Datorită parametrilor de sinteză modulați și a tratamentului termic ulterior în atmosferă oxidativă și reductivă controlată, un risc foarte scăzut de contaminare cu reziduuri (urme de oxid de calciu), care rezultă din reacția dintre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (obținută prin transformarea termică a carbonat de calciu) și H_3PO_4 , este asigurat [12, 13].

La temperaturi mai ridicate, descompunerea HA duce la formarea parțială a β -TCP și α -TCP [108, 127, 139]. S-a demonstrat anterior că la o temperatură de 1200°C , menținută timp de 8 ore în atmosferă de aer, compoziția chimică inițială a materialelor ceramice sintetizate (HA și HA/DCPD) se transformă în fosfați de calciu bifazici cu rapoarte modulate HA/ β -TCP (70-100%/30-0%) [12, 14]. Păstrând constante temperature și durata de sinterizare, un mediu reductiv – azotul, a fost, de asemenea, luat în considerare pentru a evalua perspectiva diferitelor compoziții de fază și degradarea șabloanelor naturale. Prin urmare, rezultatele au indicat o descompunere accentuată aproape integrală a HA și DCPD

în β -TCP, α -TCP și $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ phases, cu proporții diferite funcție de prezența și cantitatea de grafenă [21]. De asemenea, și faza DCPD a fost indicată ca responsabil pentru promovarea descompunerii HA în faze de tip TCP [141], în timp ce descompunerea sa progresivă poate conduce la apariția fazelor de tip pirofosfat ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) [142, 143].

Ambele materiale TCP prezintă o solubilitate crescută decât cea a hidroxiapatitei și sunt absorbite mai rapid *in vivo* [29, 144]. Raționamentul din spatele dezvoltării unor astfel de materiale se bazează pe similitudinea lor compozițională cu componenta minerală a osului natural, precum și pe proprietățile binecunoscute de biodegradabilitate, bioactivitate, osteoconductivitate și osteointegrare care susține remodelarea țesutului osos [13, 52, 145]. În general, materialele bifazice guvernează dissolution rate și regenerarea țesutului gazdă după implantare [145].

Temperatura de disociere a șabloanelor naturale, reducerea previzibilă și influența mediului de sinterizare au fost, de asemenea, evaluate atât în atmosfera oxidativă, cât și în atmosfera reductivă. S-a stabilit că tratamentul în aer al fibrelor de Luffa se produce mai rapid în aer datorită procesului de piroliză, comparative cu un mediu reductiv, în care arderea fibrelor este hindered, iar degradarea se produce prin carbonizare [17, 84].

Din punct de vedere al efectului mediului de sinterizare asupra produselor dezvoltate, independent de acesta, prin sacrificial template method, odată atinsă temperature de 1200°C , fibrele se descompun integral [17, 21]. Se generează astfel în locul lor pori și canale interconectate asemănătoare cu canalele haversine de la nivelul osului natural, fără a rămâne la interiorul acestora urme de produși de combustie, și un gradient de micro-porozitate datorat substanțelor volatile eliminate în timpul procesului de descompunere [14, 17]. Studiile de cercetare raportează ca factori general importanți pentru structurile poroase implantabile forma/geometria (e.g., sferic, rectangular, trabecular), dimensiunea ($>100\text{--}200\ \mu\text{m}$), tortuozitatea și interconectivitatea dintre pori/canale, pentru o adeziune, proliferare, colonizare și dezvoltare celulară propice pentru formarea de vase sangvine și țesut osos nou [3, 146]. În acest sens, produsele 3D sinterizate în ambele ambianțe respectă cerințele de regenerare osoasă.

Agentul de ranforsare pe bază de grafenă încorporat în matricea ceramică se reduce în timpul sinterizării la temperature ridicate ($>600^\circ\text{C}$) prin procese de oxidare [114, 147] și acționează pe parcursul acesteia ca și accelerator pentru descompunerea HA și a DCPD și generator de micro-porozitate în ambele medii de sinterizare [20, 21]. În cadrul acestor studii s-a raportat totodată pentru prima dată și posibilitatea combinării grafenei cu un agent porogen fibros, de origine naturală. Astfel, în cazul produselor poroase, grafena acționează ca și adjuvant din punct de vedere compozițional și mecanic, independent de mediul de sinterizare. Din punct de vedere mecanic, efectele mai pronunțate ale decompunerii matricei ceramice și al formării unui gradient de porozitate mult pronunțat, de la suprafața către volumul produselor, induc o fragilizare a structurilor direct-dependent de cantitatea de grafenă încorporată [21, 148].

Astfel, în funcție de tipul de produs necesar, programul de sinterizare urmat și cantitatea de agenți (progen și de ranforsare), rezultatele delimitează intervale optime pentru fabricarea de implanturi custom-made.

1.3.4. Reconstrucție 3D suprafață-volum a produselor

Datorită posibilității de vizualizare la nivel microstructural și topographic, și a cuantificării anumitor parametri esențiali (e.g., rugozitate, porozitate și interconectivitate de pori/canale) metodele de reconstrucție 3D digitală, de suprafață și în volum, au fost implicate cu succes în variate aplicații pentru mai multe arii de cercetare (de exemplu, știința materialelor, geostiința, știința alimentelor, biologia, fabricarea aditivă) [149, 150].

Pentru reconstrucția topografică a suprafețelor de interes (materiale, celule, produse 3D) se utilizează imagini de microscopie achiziționate la diferite puteri de mărire cu ajutorul unor microscopie cu capacitate de furnizare a unei rezoluții ridicate (e.g., atomic force, confocal or scanning electron microscope) [151-153]. Procesarea ulterioară a acestor imagini cu softuri dedicate de reconstrucție topografică a fost efectuată în majoritatea studiilor prin intermediul suitei de programe MountainsMap® (Digital Surf, Besançon, France) [151-156]. Primul pas al procesului de reconstrucție implică izolarea stratului topografic și a celui de intensitate – analiză de la suprafață până la adâncimea maximă detectată prin intermediul unui cod de culori (fiecare secțiune de adâncime este redată vizual cu o culoare diferită de la bright orange – peak surface și până la navy blue – valley depth). Prin combinarea celor două imagini se pot evidenția și cuantifica caracteristicile de interes (parametrii și profilele de rugozitate) prin diferite metode (threshold, segmentare, detecție circulară) [152, 154, 156].

Tehnica X-ray CT a fost introdusă în practica curentă în a doua jumătate a secolului XX având o rezoluție de doar 300 μm , aceasta atingând ulterior cote mai ridicate în domeniul submicrometric și nanometric [149, 157]. Din punct de vedere al redării arhitecturii interne (structura poroasă) la nivel performant, s-a raportat că metodele ideale de reconstrucție și vizualizare ar trebui să fie nedistructive, neinvazive, tridimensionale și să permită analiza repetată a probelor în starea originală fără o pregătire obligatorie în prealabil și la parametri de lucru normali (temperatură ambiantă și presiune atmosferică) [149, 158].

Rezoluția imaginilor de reconstrucție CT este dictată de mai mulți factori, precum sistemul optic de mărire implicat, tipul și rezoluția detectorului și mărimea fasciculului de raze X [157]. Din punct de vedere al principiului fizic, se reconstruiește virtual întreaga probă analizată prin rotirea acesteia în jurul unui ax în timp ce este baleiată de fasciculul de raze X, urmând ca prin intermediul funcțiilor matematice să fie create și analizate individual slice-uri 2D de la nivelul probei [26, 149, 157]. Din punct de vedere digital, se recurge la funcții de filtrare, pentru îmbunătățirea contrastului, și de threshold pentru izolarea și caracterizarea detaliilor de interes din fiecare imagine-slice, în mod special a celor legate de forma, dimensiunea, distribuția și interconectivitatea porilor (voids) [149, 157, 159].

Parametrii legați de rețeaua internă de pori și/sau canale dictează după implantare modul în care se asigură transportul nutrienților, invazia cu celule și supraviețuirea acestora și/sau formarea de vase de sânge, și implicit și a gradului de formare de țesut osos nou [160].

Astfel, comparativ cu metodele clasice de determinare a porozității care prezintă o serie de dezavantaje, prin utilizarea tehnicilor nedistructive se poate urmări constant arhitectura probelor pe parcursul fluxului tehnologic și se pot îmbunătăți caracteristicile produselor pentru o compatibilitate optimă cu zona de reconstruit [26, 150, 161].

În ceea ce privește produsele 3D poroase dezvoltate prin implicarea de fibre naturale de Luffa, tehnica nano-CT a fost implicată încă de la început pentru a evidenția fezabilitatea metodei de obținere a produselor [14]. Even more so, s-a conturat și demonstrat capacitatea acestor fibre de a genera pori și canale interne interconectate, distribuite aleatoriu la interiorul produselor, prin descompunere completă, fără urme de produși de combustie [14, 17, 21]. Astfel, s-a observat și modul în care structura fibrelor se transformă sub influența temperaturii ridicate din compact în secțiuni tubulare cu pereți sub formă de matrice poroasă [17]. Aceste secțiuni tubulare izolate prin reconstrucție 3D la nivel de produs se identifică cu canalele formate, acestea preluând aspectul tortuos, conform cu modul de integrare a fibrelor în matricea ceramică [17, 21]. Mai mult decât atât, dat fiind procesul de eliminare al substanțelor volatile în timpul degradării termice a fibrelor raportat ca fiind responsabil pentru microstructura poroasă a fibrelor post sinterizare, s-a investigat și suprafața internă a canalelor [14]. S-a demonstrat, prin procesarea digitală a micrografiilor SEM cu softul MountainsMap®, că proprietățile de porozitate se transferă de la fibre către matricea ceramică în timpul trataemntului termic, canalele prezentând la interior o textură microporoasă și un grad de rugozitate considerabil, aspect considerat favorabil pentru ancorarea mai facilă a celulelor și formarea mai rapidă de țesut osos nou [17, 162].

1.4. Caracterizarea și testarea *in vitro* a produselor obținute pentru aplicații biomedicale

În vederea parcurgerii unui program de investigații complet, materialele și produsele pe bază de CaPs, sintetizate și procesate conform procedurii dezvoltate, au fost testate în vederea evaluării comportamentului biologic *in vitro* prin mai multe metode. Astfel, pulberile derivate din marmură și socici la toate concentrațiile de H_3PO_4 au fost studiate din punct de vedere al viabilității și proliferării celulare (teste LIVE/DEAD, MTT) pe linii celulare de tip pre-osteoblaste, în extracția media [13]. Rezultatele au confirmat capacitatea acestora de a susține și facilita supraviețuirea și proliferarea celulelor, morfologia și densitatea acestora rămânând nealterate de cantitatea de acid/tip de CaPs sintetizat (HA, DCPD, DCPA), pentru ambele perioade de incubare (1-3 zile). Prin urmare, toate materialele dezvoltate prezintă proprietăți de biocompatibilitate adecvate pentru utilizarea în aplicațiile de regenerare osoasă.

Odată cu stabilirea rutelor de procesare a materialelor pulverulente, produsele green și sinterizate au fost supuse de asemenea unei game de testare celulară complexă, utilizând aceeași gamă de celule pre-osteoblaste [12, 52]. Testele de toxicitate prin analiza eliberării de enzyme LDH nu au indicat alterarea membranei plasmatiche nici la perioade lungi de incubare (4 zile). Mai mult decât atât, testele de viabilitate și proliferare celulară au evidențiat o afinitate crescută a produselor ceramice derivate din marmură și socici, comparativ cu proba de referință (HA comercială). Din punct de vedere al adeziunii celulare și morfologiei celulelor, imaginile de microscopie prin fluorescență confirmă capacitatea de dezvoltare, maturare și răspândire a filamentelor de actină și vinculină pe toate suprafețele investigate.

Evaluarea citotoxicității *in vitro* a produselor de ardere pure, o nouă abordare în caracterizarea schelelor, este obligatorie pentru a stabili ce șabloane sunt adecvate pentru o analiză ulterioară *in vivo* și sunt fără risc pentru pacient. În acest sens, mediile de extracție pe bază de produși de combustie (char powders) au fost investigate pentru prima dată din punct de vedere al biocompatibilității celulare [17]. Doar în cazul fibrelor de Luffa studiile au indicat o viabilitate și proliferare a celulelor osteoblaste mai mare de 95% pentru ambele perioade de incubare, astfel că există o probabilitate foarte scăzută să apară efecte citotoxice și riscuri asociate pacienților în cazul în care pe suprafața canalelor interne rămân urme de produs de combustie (char).

Un alt aspect cheie pentru succesul regenerării osoase *in vivo*, constă în investigarea comportamentului biologic al componentei de ranforsare mecanică [35]. Astfel, studiile dedicate pentru materialele pe bază de grafenă au raportat că răspunsul biologic și viabilitatea celulelor sunt în primul rând dependente de dimensiunea și morfologia acestora [18, 163]. Dimensiuni de ordinul nanometrilor au condus la scăderea viabilității celulare. Cu toate acestea, materialele susțin creșterea și proliferarea celulelor fibroblaste și osteoblaste în funcție de cantitatea încorporată [130]. S-a demonstrat că, în funcție de structura bacteriilor, al timpului de expunere și al concentrației de grafenă, aceasta inhibă creșterea bacteriilor de tip *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* și *Bacillus subtilis* și distruge membrana celulară a acestora la câteva ore după inițierea contactului direct [118, 163, 164].



Article

Naturally-Derived Biphasic Calcium Phosphates through Increased Phosphorus-Based Reagent Amounts for Biomedical Applications

Aura-Cătălina Mocanu ^{1,2}, George E. Stan ^{3,*}, Andreea Maidaniuc ^{1,4} , Marian Miculescu ¹, Iulian Vasile Antoniac ¹ , Robert-Cătălin Ciocoiu ¹, Ștefan Ioan Voicu ⁵, Valentina Mitran ⁶, Anișoara Cîmpean ⁶ and Florin Miculescu ^{1,*}

¹ Department of Metallic Materials Science, Physical Metallurgy, University Politehnica of Bucharest, 313 Splaiul Independentei, J Building, District 6, 060042 Bucharest, Romania; mcn_aura@hotmail.com (A.-C.M.); andreea.maidaniuc@gmail.com (A.M.); m_miculescu@yahoo.com (M.M.); antoniac.iulian@gmail.com (I.V.A.); ciocoiurobert@gmail.com (R.-C.C.)

² Department of Research, Development and Innovation, S.C. Nuclear NDT Research & Services S.R.L, 104 Berceni Str., Central Laboratory Building, District 4, 041919 Bucharest, Romania

³ National Institute of Materials Physics, Laboratory of Multifunctional Materials and Structures, 405A Atomistilor Str., 077125 Măgurele-Ilfov, Romania

⁴ Destructive and Nondestructive Testing Laboratory, S.C. Nuclear NDT Research & Services S.R.L, 104 Berceni Str., Central Laboratory Building, District 4, 041919 Bucharest, Romania

⁵ Department of Analytical Chemistry and Environmental Engineering, University Politehnica of Bucharest, 1-7 Gh. Polizu Str., Polizu campus, L 015 Building, District 1, 011061 Bucharest, Romania; svoicu@gmail.com

⁶ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bucharest, 91-95 Splaiul Independentei, 050095 Bucharest, Romania; valentinamitran@yahoo.com (V.M.); anisoara.cimpean@bio.unibuc.ro (A.C.)

* Correspondence: george_stan@infim.ro (G.E.S.); f_miculescu@yahoo.com (F.M.); Tel.: +40-21-3169563 (F.M.)

Received: 21 December 2018; Accepted: 23 January 2019; Published: 25 January 2019



Abstract: Calcium carbonate from marble and seashells is an eco-friendly, sustainable, and largely available bioresource for producing natural bone-like calcium phosphates (CaPs). Based on three main objectives, this research targeted the: (i) adaptation of an indirect synthesis route by modulating the amount of phosphorus used in the chemical reaction, (ii) comprehensive structural, morphological, and surface characterization, and (iii) biocompatibility assessment of the synthesized powdered samples. The morphological characterization was performed on digitally processed scanning electron microscopy (SEM) images. The complementary 3D image augmentation of SEM results also allowed the quantification of roughness parameters. The results revealed that both morphology and roughness were modulated through the induced variation of the synthesis parameters. Structural investigation of the samples was performed by Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction. Depending on the phosphorus amount from the chemical reaction, the structural studies revealed the formation of biphasic CaPs based on hydroxyapatite/brushite or brushite/monetite. The *in vitro* assessment of the powdered samples demonstrated their capacity to support MC3T3-E1 pre-osteoblast viability and proliferation at comparable levels to the negative cytotoxicity control and the reference material (commercial hydroxyapatite). Therefore, these samples hold great promise for biomedical applications.

Keywords: dolomitic marble; seashell; CaCO₃ derived-calcium phosphates; modulated synthesis set-up; SEM; image analysis; pre-osteoblasts



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Full length article

Internal and external surface features of newly developed porous ceramics with random interconnected 3D channels by a fibrous sacrificial porogen method



Aura-Cătălina Mocanu^{a,f}, Marian Miculescu^a, Teodor Machedon-Pisu^b, Andreea Maidaniuc^{a,f}, Robert Cătălin Ciocoiu^a, Mariana Ioniță^{c,d}, Iuliana Pasuk^e, George E. Stan^{c,*}, Florin Miculescu^{a,*}

^a University Politehnica of Bucharest, Department of Metallic Materials Science, Physical Metallurgy, 313 Splaiul Independentei, 060042 Bucharest, Romania

^b Transilvania University of Brasov, Materials Engineering and Welding Department, 29 Eroilor Blvd., 500036, Brasov, Romania

^c University Politehnica of Bucharest, Advanced Polymer Materials Group, 1-7 Gh. Polizu Str., 011061 Bucharest, Romania

^d University Politehnica of Bucharest, Faculty of Medical Engineering, 1-7 Gh. Polizu Str., 011061 Bucharest, Romania

^e National Institute of Materials Physics, 405A Atomistilor Str., 077125 Măgurele, Ilfov, Romania

^f S.C. Nuclear NDT Research & Services S.R.L., 104 Berceni Str., 041919 Bucharest, Romania

ARTICLE INFO

Keywords:

CaPs
Natural fibers
Ceramic-porous-structures
Surface features
CT techniques

ABSTRACT

The bone remodeling research field has shifted focus towards sustainable, eco-friendly and reproducible manufacturing technologies of 3D structures. It is now accepted that a suitable internal architecture and an active interface between the 3D structure and host bone-tissue constitute the two most critical traits for a successful bone tissue engineering application.

A completely reproducible synthesis set-up was recently developed for calcium phosphate (CaP) bioceramics preparation from natural highly available marble and seashells. The influence of the pressing force in the fabrication process of porous 3D scaffolds derived from such CaPs by a sacrificial porogen method using natural fibers is here investigated. The fiber-ceramic based-products underwent thermal processing, followed by surface and volume features characterization. After fibers' thermal removal, interconnected 3D channels were obtained, which could allow a suitable in vivo irrigation and implant-associated negative side-effects prevention. This method provides the prospect of tunable HA/ β -TCP content in the case of both precursors' derived-scaffolds.

The morphological results revealed the internal and external pores dimensions, modulated through different pressing forces that led to a controlled total porosity, evidenced by computed tomography techniques. Further, the wettability and mechanical features supported the advance of the novel porous-ceramic-structure designs as reliable bone reconstruction alternatives.

1. Introduction

Incrementally, in the past two decades, it has come to attention the possibility to integrate/adapt plentiful natural resources for bone tissue engineering applications. This comes as a response to the (i) higher frequency and (ii) intricacy of orthopedic problems, correlated with (i) global population growth, tendency to pro-active lifestyles and increasing life expectancy, and (ii) large defects generated by trauma, pathological conditions or tumor resection [1,2]. Given the complexity of the defects that fall outside the bone ability to self-repair, bone tissue engineering is often seen as an interdisciplinary strategy meant to reduce and overcome the need for autologous bone transplantation, which is the gold standard for osseous reconstruction [3,4]. For

successful surgical intervention, the substitute structure needs to harmoniously combine key bone-mimicking requirements such as chemical composition, 3D structure, mechanical features and biological behavior [4–6].

In this regard, scaffolding methods from conventional techniques to additive layer manufacturing have drawn special attention and occupy important places amid the fabrication technologies of 3D structures [7]. However, none of them is flawless, especially when it comes to bone-like ceramic materials processing. Nowadays, the prominent materials for bone reconstruction are the calcium phosphates (CaP), among which hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) and β -tricalcium phosphate (β -TCP, rhombohedral $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) are the most important due to their adequate chemistry, mechanical features and capacity to promote

* Corresponding authors.

E-mail addresses: george_stan@infim.ro (G.E. Stan), f_miculescu@yahoo.com (F. Miculescu).

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.05.354>

Received 1 April 2019; Received in revised form 17 May 2019; Accepted 30 May 2019

Available online 31 May 2019

0169-4332/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Comprehensive analysis of compatible natural fibre as sacrificial progen template for tailored ceramic 3D bioproducts destined for hard tissue reconstruction

Aura-Cătălina Mocanu^a, Florin Miculescu^{a,*}, Marian Miculescu^a, Robert Cătălin Ciocoiu^a, Andreea Mădălina Pandeale^{b,c}, George E. Stan^d, Anișoara Cîmpean^e, Ștefan Ioan Voicu^b, Lucian-Toma Ciocan^f

^a University Politehnica of Bucharest, Department of Metallic Materials Science, Physical Metallurgy, 313 Splaiul Independentei, J Building, District 6, 060042, Bucharest, Romania

^b University Politehnica of Bucharest, Department of Analytical Chemistry and Environmental Engineering, 1-7 Gh. Polizu Str., 011061, Bucharest, Romania

^c University Politehnica of Bucharest, Advanced Polymer Materials Group, 1-7 Gh. Polizu Str., 011061, Bucharest, Romania

^d National Institute of Materials Physics, Laboratory of Multifunctional Materials and Structures, 405A Atomistilor Str., 077125, Măgurele-Ilfov, Romania

^e University of Bucharest, Department of Biochemistry and Molecular Biology, 91-95 Splaiul Independentei, 050095, Bucharest, Romania

^f "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, Prosthetics Technology and Dental Materials Department, 37 Dionisie Lupu Str., 020022, District 1, Bucharest, Romania

ARTICLE INFO

Keywords:

Fibres
Thermal properties
Ceramic bioproducts
Biomedical applications

ABSTRACT

For successful bone remodelling, the implantable 3D structures require suitable internal architectures which can be achieved by the use of fibres as natural templates. The ability of fibres to generate complex configurations for 3D bioceramic products was preliminarily reported by sacrificial fibrous-porogen method. This study aims to demonstrate the safe-prospect of repurposing natural-fibres (i.e. luffa, hemp, wool) for embedment into a calcium phosphate (CaPs) matrix prepared through a completely reproducible route, and the beneficial influence of fibres upon structural, topographic and mechanical features of CaPs-products, since a complete assessment of the fibres-combustion-products resulted after thermal treatment was not yet disclosed. The complex investigation program based on i) thermo-gravimetric (TGA-DTG), ii) structural (XRD, FTIR-ATR), iii) morpho-compositional (SEM/EDS) and, most importantly, iv) biological cytotoxicity assays of fibres-derived chars, clearly indicated that luffa-fibres are the safest (>95% cell-survival) to be considered for bioceramic porous-orthopaedic-implants. Further, as exposed by nano-CT, the high temperature pyrolysis of luffa-fibres led to 3D interconnected channels inside the products, which allows a suitable vascularization and osteointegration. The topographic reconstruction of channels-inside-surface revealed a secondary 3D network of micro-pores. Along with the mechanical features, the novel bioceramic porous structures stand as reliable bone-repair alternatives.

1. Introduction

Concerning the direct impact on the bone tissue engineering field, the strategy of employing natural porous resources (e.g. marine sponges, algae, coral, wood) as reinforcement for the bioceramic products by replica method or direct foaming [1–3] may come as a response to current high frequency age-related pathologies, the limited capacity of bone to repair itself in critical situations (e.g. large defects generated by trauma, chronic diseases or tumour resection) and to the well-known demerits of the bone repair gold standard (i.e. insufficient donor sites,

disease transmission and morbidity) [4,5]. Therefore, the target is to reduce the need of autologous grafts harvesting by developing valid tissue-engineering alternatives.

The last century historical events, the economic downside and the global increase of energy consumption motivated the current generation of scientists to comprehensively explore the future of “high-performance fibres (HPF)”, apart from their natural destination in the fashion industry [6,7].

Biofibres, either as plant-derived (e.g. hemp, cotton or luffa sponge-gourds), mineral (e.g. graphite) or animal-keratin-based (e.g. hairs,

* Corresponding author.

E-mail addresses: f.miculescu@yahoo.com, florin.miculescu@upb.ro (F. Miculescu).

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.10.113>

Received 24 September 2020; Accepted 14 October 2020

Available online 17 October 2020

0272-8842/© 2020 Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. All rights reserved.

Article

Fiber-Templated 3D Calcium-Phosphate Scaffolds for Biomedical Applications: The Role of the Thermal Treatment Ambient on Physico-Chemical Properties

Aura-Cătălina Mocanu ¹, Florin Miculescu ^{1,*}, George E. Stan ², Andreea-Mădălina Pandele ^{3,4}, Mihai Alin Pop ⁵, Robert Cătălin Ciocoiu ¹, Ștefan Ioan Voicu ³ and Lucian-Toma Ciocan ⁶

- ¹ Department of Metallic Materials Science, Physical Metallurgy, University Politehnica of Bucharest, 313 Splaiul Independentei, J Building, RO-060042 Bucharest, Romania; mc_n_aura@hotmail.com (A.-C.M.); ciocoiurobert@gmail.com (R.C.C.)
- ² National Institute of Materials Physics, 405A Atomistilor Street, RO-077125 Măgurele, Romania; george_stan@infim.ro
- ³ Department of Analytical Chemistry and Environmental Engineering, University Politehnica of Bucharest, 1-7 Gh. Polizu, RO-011061 Bucharest, Romania; pandele.m.a@gmail.com (A.-M.P.); svoicu@gmail.com (Ș.I.V.)
- ⁴ Advanced Polymer Materials Group, University Politehnica of Bucharest, 1-7 Gh. Polizu, RO-011061 Bucharest, Romania
- ⁵ Department of Materials Science, Faculty of Materials Science and Engineering, ICDT, University Transilvania of Brasov, 10 Institutului, RO-500484 Brasov, Romania; mihai.pop@unitbv.ro
- ⁶ Prosthetics Technology and Dental Materials Department, "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy, 37 Dionisie Lupu Street, RO-020022 Bucharest, Romania; tcioacan@yahoo.com
- * Correspondence: florin.miculescu@upb.ro; Tel.: +40-21-316-95-63



Citation: Mocanu, A.-C.; Miculescu, F.; Stan, G.E.; Pandele, A.-M.; Pop, M.A.; Ciocoiu, R.C.; Voicu, Ș.I.; Ciocan, L.-T. Fiber-Templated 3D Calcium-Phosphate Scaffolds for Biomedical Applications: The Role of the Thermal Treatment Ambient on Physico-Chemical Properties. *Materials* **2021**, *14*, 2198. <https://doi.org/10.3390/ma14092198>

Academic Editor: Andrew Ruys

Received: 5 April 2021
Accepted: 23 April 2021
Published: 25 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A successful bone-graft-controlled healing entails the development of novel products with tunable compositional and architectural features and mechanical performances and is, thereby, able to accommodate fast bone in-growth and remodeling. To this effect, graphene nanoplatelets and *Luffa*-fibers were chosen as mechanical reinforcement phase and sacrificial template, respectively, and incorporated into a hydroxyapatite and brushite matrix derived by marble conversion with the help of a reproducible technology. The bio-products, framed by a one-stage-addition polymer-free fabrication route, were thoroughly physico-chemically investigated (by XRD, FTIR spectroscopy, SEM, and nano-computed tomography analysis, as well as surface energy measurements and mechanical performance assessments) after sintering in air or nitrogen ambient. The experiments exposed that the coupling of a nitrogen ambient with the graphene admixing triggers, in both compact and porous samples, important structural (i.e., decomposition of β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ into α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and α - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) and morphological modifications. Certain restrictions and benefits were outlined with respect to the spatial porosity and global mechanical features of the derived bone scaffolds. Specifically, in nitrogen ambient, the graphene amount should be set to a maximum 0.25 wt.% in the case of compact products, while for the porous ones, significantly augmented compressive strengths were revealed at all graphene amounts. The sintering ambient or the graphene addition did not interfere with the *Luffa* ability to generate 3D-channels-arrays at high temperatures. It can be concluded that both *Luffa* and graphene agents act as adjuvants under nitrogen ambient, and that their incorporation-ratio can be modulated to favorably fit certain foreseeable biomedical applications.

Keywords: marble; graphene; *Luffa*; sintering ambient; reinforced bio-products; biomedical; applications

1. Introduction

Incipient discoveries in the realm of ceramic materials for bone healing applications can be dated back to over half a century ago [1,2]. However, it was not until the beginning of the 1980s that the medical community started using and marketing calcium phosphates

Capitolul 3 – Concluzii generale

La nivel global, în domeniul stomatologic și ortopedic există anual un număr ridicat de cazuri care presupun implantarea unor produse de substituție osoasă. Subiectul tezei de doctorat a fost ales din considerente legate de unele aspecte corelate cu defectele osoase care pot fi rezolvate mai greu folosind produsele actuale. Cercetarea experimentală a vizat dezvoltarea unei tehnologii de fabricație noi, complete, reproductibile, ieftine și sustenabile a unor produse 3D de restaurare și substituție/reconstrucție osoasă. Produsele care pot fi obținute folosind această tehnologie sunt obținute din biomateriale ceramice nanostructurate derivate din resurse naturale, cu un comportament biologic performant și prezintă caracteristici interne (compoziție, structură, porozitate), externe (proprietăți de suprafață) și mecanice modulabile, în funcție de necesarul pacientului.

În general, se consideră că un material ideal pentru regenerarea osoasă trebuie să îmbine armonios caracteristicile compoziționale, structurale, geometrice/arhitecturale și mecanice, pentru asigurarea succesului *in vivo*. Plecând de la aceste considerente, cercetările experimentale și implicit teza de doctorat au fost structurate în conformitate cu schema prezentată la pagina 4. Rezultatele obținute folosind această secvență logică au fost publicate în reviste de specialitate și prezentate la conferințe, pentru fiecare etapă sau stadiu de dezvoltare de material/produs 3D existând cel puțin un articol științific publicat.

Urmărind o direcție environmentally-friendly, studiul a pornit de la premisa posibilității de sinteză a unor materiale ceramice de tip fosfați de calciu biomimetici din precursori de origine naturală de tip marmură și scoici marine autohtone (carbonat de calciu). Acestea constituie alternative avantajoase pentru sinteza materialelor de substituție osoasă. În acest sens, varianta de sinteză aleasă a implicat precipitarea umedă, cu adaos de reactiv chimic necesar (acid fosforic). Plecând de la datele prezentate în literatura de specialitate, s-a reușit rafinarea rutei de sinteză, prin utilizarea unei cantități de acid fosforic până la nivelul maxim permis, suplimentar față de cantitatea stoechiometrică calculată. Astfel, s-au obținut fosfați de calciu biomimetici, prin conversia separată a celor două resurse naturale de carbonat de calciu (Articolul 1). În cadrul acestei prime etape, obiectivul principal a implicat obținerea unei rute reproductibile, cu parametri de lucru bine stabiliți, pe baza cărora să se poată sintetiza și obține în final o plajă cât mai largă de pulberi cu compoziție fazică modulată: $HA \rightarrow HA/DCPD \rightarrow HA/DCPA \rightarrow \beta\text{-}/\alpha\text{-TCP}$, în proporții diferite.

Ținând cont de destinația materialelor și a produselor derivate, au fost necesare studii avansate pentru investigarea proprietăților de suprafață și a celor biologice. Reconstrucțiile topografice digitale efectuate cu softul MountainsMap au reliefat texturi microporoase pentru întreaga gamă de materiale sintetizate, indiferent de precursorul natural ori de cantitatea de acid implicate. Proprietățile de biocompatibilitate și caracterul non-citotoxic al materialelor pulverulente au fost demonstrate prin teste de viabilitate, citotoxicitate și proliferare celulară și analiză microscopică prin fluorescență, evidențiindu-se niveluri comparabile cu cele ale unui material comercial de tip hidroxiapatită.

Pentru dezvoltarea unor prototipuri de produse 3D poroase folosind materialele bioceramice sintetizate, soluția aleasă a presupus încorporarea unor fibre naturale, de origine vegetală (*Luffa cylindrica* și cânepă) și animală (lână) (Articolele 2 și 3). O primă etapă în procesul de dezvoltare a structurilor poroase, corelată cu necesitatea îndeplinirii criteriului de biocompatibilitate a acestora, a implicat caracterizarea produșilor de combustie/ardere a fibrele de *Luffa cylindrica*, cânepă și lână care au fost alese ca potențiali agenți porogeni. Prin aplicarea unor tratamente termice (până la 1200°C) asupra acestor fibre, s-a observat descompunerea completă doar în cazul fibrelor de *Luffa*, în atmosferă de lucru oxidativă (aer). Cercetările au continuat cu evaluarea citotoxicității, demonstrându-se caracterul citocompatibil al tuturor produșilor de combustie. Cele mai ridicate rate de viabilitate și proliferare celulară au fost identificate pentru produșii de combustie rezultați din fibrele de *Luffa*.

Produsele prototip obținute au prezentat canale interne formate prin dezintegrarea termică a agentului porogen de tip *Luffa cylindrica*. *In vivo*, acestea permit irigarea produselor ceramice massive pentru substituție osoasă cu un flux adecvat de sânge și fluide corporale. Astfel, folosind materiale bioceramice sintetizate în condiții stoechiometrice (hidroxiapatită din scoici marine și fosfat de calciu bifazic HA/DCPD din marmură), s-au dezvoltat cu succes *i)* produse compacte și *ii)* structuri poroase cu canale interne interconectate prin adiția one-step a fibrelor naturale de *Luffa*. Nu au fost utilizate materiale liant sau tratamente chimice aplicate în prealabil asupra fibrelor, sinterizarea finală fiind efectuată în aer, la temperaturi înalte (1200°C).

În cazul produselor de substituție osoasă, unele dintre cele mai importante aspecte clinice sunt legate de proprietățile de suprafață și de cele mecanice. În acest sens, acestea au fost studiate pentru ambele tipuri de produse dezvoltate, pentru obținerea unor caracteristici surface-volume adecvate fiind analizat ca parametru cheie forța de presare. În cazul produselor ceramice obținute prin metoda adaosului de sacrificiu, presiunea cu care sunt comprimate amestecurile de pulberi bioceramice și fibre induce dimensiunea (diametrul) canalelor și caracteristicile mecanice. Cercetările efectuate în acest sens au condus la concluzia că utilizarea unor forțe de valoare ridicată poate îmbunătăți comportamentul și proprietățile mecanice, dar modifică drastic aspectul rețelei 3D interne de micro-pori și canale, reducând considerabil dimensiunile diametrelor acestora și implicit și posibilitățile de vascularizare și formare de țesut osos nou. Se ajunge astfel la un prim compromis necesar pentru asigurarea caracteristicilor optime de porozitate și rezistență mecanică în vederea unei osteointegrări adecvate.

Pentru obținerea unor caracteristici mecanice superioare, o etapă ulterioară a cercetării s-a bazat pe continuarea procesului one-step de dezvoltare al produselor compacte și poroase, prin ranforsarea acestora cu nanoplachete de grafenă. S-a reușit dispersarea omogenă a acestora în pulberea bioceramică, indiferent de cantitatea folosită. Consolidarea și particularitățile definitorii pentru comportamentul mecanic al produselor finite (compacte și poroase) au fost studiate în funcție de tratamentul termic aplicat. Un factor determinant este reprezentat atmosfera gazoasă din interiorul cuptorului de tratament termic (Articolul

4). Astfel, modularea mediului de lucru în prezența agentului de ranforsare conduce la dispariția acestuia și la apariția unei variabilități compoziționale favorabile de fosfați de calciu monofazici, bifazici și trifazici, fiecare combinație prezentând caracteristici mecanice în concordanță cu cerințele de regenerare osoasă. Suplimentar, conversia matricei ceramice într-o gamă diferită de fosfați de calciu oferă posibilitatea stabilirii unei resobții programabile a substituenților osoși bioceramici și în consecință, a unei regenerări osoase mai rapide, după implantarea produselor respective.

Consecințele favorabile ale adității de grafenă pot fi urmărite mai departe de comportamentul mecanic, prin generarea unei micro-porozități adiționale la nivelul componentei ceramice compacte. Corelat cu capacitatea fibrelor de Luffa de a genera structuri de canale interne cu distribuție asemănătoare cu distribuția spațială a vaselor de sânge la nivelul osului natural, produsele obținute folosind această tehnologie au caracteristicile optime necesare substituenților osoși folosiți în stomatologie și ortopedie. Modificarea plajei compoziționale induce și schimbări morfologice importante pentru rezistența mecanică globală a produselor, prin extinderea dimensiunii grăunților și a porilor din matricea ceramică.

Pe termen lung, se preconizează că tehnologia de fabricare dezvoltată va conduce la apariția unor produse cu destinație medicală superioare, în primul rând prin extinderea plajei de aplicații posibile. Dependent de cazul medical particular, se pot folosi produse cu diferite caracteristici la nivel compozițional, morfologic, arhitectural și mecanic, pentru fiecare pacient în parte. Tehnologia permite modularea fiecărui astfel de parametru, prin alegerea favorabilă a precursorului natural, a raportului optim agent porogen/agent de ranforsare și până la selecția mediului de sinterizare, pentru a se dobândi efectele benefice ale produselor (bone regenerator sites) custom-made.

Capitolul 4 – Contribuții originale aduse domeniului

Studiile experimentale prezentate în cadrul acestei teze de doctorat implică o serie de contribuții originale care au urmărit dezvoltarea unei rute tehnologice integrate pentru obținerea unor materiale bioceramice pe bază de fosfați de calciu de origine biogenă. S-a reușit obținerea unor materiale pentru substituție osoasă noi, cu directă aplicabilitate ca implanturi stomatologice și ortopedice pentru reconstrucția defectelor osoase cu dimensiuni și caracteristici variabile. Tehnologia propusă poate fi privită ca un proces cu trei etape de dezvoltare.

Prima etapă s-a bazat pe rafinarea și perfectarea rutei de sinteză a unor materiale bioceramice de origine biogenă. S-au folosit resurse naturale sustenabile de tip carbonat de calciu, precum marmura și scoicile marine autohtone, pentru obținerea pe cale facilă și cost-efficient a materialelor vizate: fosfați de calciu monofazici și/sau bifazici. În acest sens, s-a stabilit că un prim factor cheie implicat în sinteza corectă și reproductibilă a materialelor bioceramice este cantitatea de reactiv chimic necesar pentru conversia resurselor naturale. Caracterizările fizico-chimice efectuate au conturat dinamismul reacțiilor chimice, evidențiind *trei plaje compoziționale* cu rezultate reproductibile și precipitarea HA în condiții stoechiometrice, doar pentru resursele de tip scoici.

○ O contribuție importantă în domeniul tezei este reprezentată de faptul că s-au identificat pentru prima dată prin sinteza de tip precipitare umedă din resurse de tip marmură și scoici două tipuri de compoziții. Prima este reprezentată de amestecul bifazic HA/DCPD obținut stabil până la adaosuri de acid fosforic de 10% și 10-30%. A doua presupune posibilitatea de obținere a amestecului bifazic HA/DCPA care se stabilizează la plaje de concentrații mai ridicate, până la maximum 90%, pentru ambele tipuri de materiale derivate. Pentru determinarea plajei optime (în intervalul 0-30%) de utilizare a reactivului chimic, în concordanță cu cerințele pentru produsele substituție și reconstrucție osoasă, s-au efectuat studii complexe de redare digitală a topografiei, folosind softul MountainsMap. Astfel, s-a evidențiat caracterul microporos al materialelor independent de precursorul natural sau de cantitatea de acid utilizată, însă cu grad de rugozitate diferit. Toate materialele sintetizate au fost caracterizate *in vitro* pentru determinarea performanțelor biologice.

○ Un alt element de noutate reliefat în cadrul cercetărilor este reprezentat de stabilirea unui protocol de fabricare one-step a unor produse ceramice „green” cu porozitate spațială controlată și arhitectură internă cu canale interconectate, asemănătoare cu cea a osului natural. Îndeplinirea acestui obiectiv a presupus folosirea unor agenți porogeni din gama fibrelor naturale cu posibilitate de descompunere și reducere la temperatură înaltă, metodă denumită *fibrous sacrificial template method*. Procesul propus contribuie la eliminarea etapelor intermediare de tratament chimic al fibrelor, a necesității utilizării materialelor liante (raportate pentru asigurarea conexiunii dintre agenții porogeni și materialul matrice) și implică a riscurilor asociate acestora chiar și după sinterizarea la temperaturi înalte (e.g., reziduuri remanente toxice), și a soluționării problemei de vascularizare a produselor de osteo-reconstrucție.

⊙ Pentru prima dată s-a reușit parametrizarea procesului tehnologic, prin stabilirea condițiilor optime de comprimare și sinterizare a amestecurilor de material ceramic și fibre naturale. S-au investigat exhaustiv și comparativ produșii de combustie/ardere rezultați în urma descompunerii termice a fibrelor naturale în două medii de lucru (aer/azot). Tratamentele termice efectuate pe trei tipuri de fibre naturale (e.g., Luffa cilindrică, cânepă, lână) au evidențiat posibilitatea dezintegrării termice complete doar a fibrelor de Luffa și cu precădere în atmosferă de lucru de aer, la temperatură mai mari de 1000 °C.

⊙ O altă caracteristică importantă pentru domeniul abordat este reprezentată de expunerea pentru prima dată a caracterului biocompatibil a produșilor rezultați în urma descompunerii termice a fibrelor, prin efectuarea unor teste de citotoxicitate *in vitro*. Printre altele, s-a identificat și tipul de fibră naturală care generează un produs de combustie patient-risk-free (>95% viabilitate și proliferare celulară) și capabil să genereze canale cu dimensiuni comparabile cu cele de la nivelul țesutului osos.

⊙ Un rezultat important îl reprezintă identificarea rezultatului procesului de descompunere termică a fibrelor naturale în sine, care este însoțit de evacuarea compușilor volatili rezultați. Acest process conduce la formarea unei matrici porose în canalele generate de descompunerea fibrelor, apărând astfel un gradient de micro-porozitate identificat la suprafața probelor poroase și în întregul volum al acestora. Prezența fibrelor de Luffa în timpul tratamentului termic conduce la conservarea fosfatului de calciu bifazic format de tip HA/ β -TCP, cu dimensiuni crescute de cristalit și proporții diferite funcție de precursorul natural (70-100%/30-0%), fără alterarea parametrilor de rețea.

Păstarea configurației poroase a produselor și totodată îmbunătățirea caracteristicilor mecanice ale acestora a necesitat dezvoltarea unei modalități compatibile de consolidare prin ranforsarea matricii bioceramice. S-a optat pentru folosirea unui material de ranforsare cu capacitate ridicată de distribuție și încorporare în matricea ceramică de tip fosfat de calciu și de densificare superioară a produselor la temperatură ridicată, urmărindu-se procesul de sinterizare în două medii diferite (oxidativ vs. reducător/aer vs. azot).

⊙ O descoperire importantă constă în demonstrarea gradului de influență a agentului de ranforsare de tip nanoplachete de grafenă asupra caracteristicilor compoziționale și arhitecturale în vederea obținerii de produse compacte, precum și compatibilitatea cu fibrele de Luffa. Aceste aspecte au fost analizate pentru toate cantitățile de grafenă încorporată, delimitându-se clar raportul adecvat de combinare a celor doi agenți pentru produsele poroase, aspect unic în literatura de specialitate.

⊙ S-a stabilit efectul mediului de tratament termic asupra produselor obținute. Pentru ambele medii de sinterizare (aer și azot), prezența concomitentă a grafenei și a lufei reprezintă un factor de influență compozițională și structurală. Mediul oxidativ favorizează descompunerea accentuată a matricii ceramice până la extincția HA sau HA/DCPD și formarea integrală a fosfatului tricalcic β -TCP, în timp ce mediul reducător conduce la o descompunere a compușilor inițiali în proporții variabile de β -TCP, α -TCP și $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ odată cu creșterea cantității de grafenă.

⊙ S-a determinat cantitatea optimă de grafenă care poate fi folosită, în funcție de tipul de produs dorit și de mediul de sinterizare. Astfel, pentru produsele compacte, în cazul sinterizării în azot, cantitatea maximă este de 0.25 wt.%, în timp ce pentru cele poroase restricțiile sunt impuse de sinterizarea în aer până la maxim 0.50 wt.%. Fiecare combinație de fosfați de calciu prezintă proprietăți mecanice și grade de resorbabilitate diferite, adecvate pentru mai multe tipuri de aplicații de regenerare osoasă.

În consecință, studiile derulate au condus la dezvoltarea unei noi tehnologii complete pentru fabricarea de produse 3D compacte și poroase (composite assemblies) cu proprietăți modulare, capabile să satisfacă o plajă largă de cerințe pentru implementarea mai departe în aplicații substituenți osoși, load- and non-load bearing. Produsele care pot fi astfel obținute pot fi fabricate custom-made în funcție de specificitatea defectului osos și de gama de proprietăți necesară la nivel de pacient.

Importanța contribuțiilor originale aduse în domeniul ingineriei materialelor și prezentate în cadrul acestei teze de doctorat a fost susținută și recunoscută în cadrul a 5 conferințe internaționale și prin publicarea rezultatelor în 4 articole științifice, în reviste de specialitate pentru domeniul abordat, cotate Clarivate Analytics și cu factor de impact în intervalul 3.623 – 6.707.

Based on the developed manufacturing technology proposed in the PhD thesis, a national patent application was filed (**A-00258**) on May 17th 2021: „*Procedeu de obținere a unui produs pentru reconstrucția defectelor osoase, pe bază de hidroxiapatită și fosfat de calciu bifazic biogen*” by F. Miculescu, A.C. Mocanu, G. Stan, I.V. Antoniac, M.C. Costoiu, Ș.I. Voicu, M. Miculescu, I.M. Mateș, A. Semenescu.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat pot fi completate în viitor cu unele cercetări experimentale:

- testare preclinică, *in vitro* și *in vivo* pe model animal, și validarea metodei de fabricare și a programului de caracterizare a materialelor și produselor derivate din marmură și scoici marine;
- studii de reproductibilitate a rutei de sinteză perfectate urmărind influența habitatului natural asupra proprietăților finale ale materialelor și produselor (aplicabil pentru scoici);
- obținerea unor materiale de referință/control, cu parametri de obținere și procesare bine delimitați, cu raporturi cunoscute între diferitele tipuri de fosfați de calciu constituenți, și care să fie utilizate ulterior în analiza calității altor produse de tip substituent osos.

Referințe

1. Tihan, G.T., et al., *Innovative methodology for developing a bone grafting composite biomaterial starting from the seashell of Rapana thomasiana*. Comptes Rendus Chimie, 2017. **20**(4): p. 440-445.
2. Lalzawmliana, V., et al., *Marine organisms as a source of natural matrix for bone tissue engineering*. Ceramics International, 2018.
3. Abbasi, N., et al., *Porous scaffolds for bone regeneration*. Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 2020. **5**(1): p. 1-9.
4. Shrivats, A.R., M.C. McDermott, and J.O. Hollinger, *Bone tissue engineering: state of the union*. Drug discovery today, 2014. **19**(6): p. 781-786.
5. Hadagalli, K., et al., *Faster Biomineralization and Tailored Mechanical Properties of Marine-Resource-Derived Hydroxyapatite Scaffolds with Tunable Interconnected Porous Architecture*. ACS Applied Bio Materials, 2019. **2**(5): p. 2171-2184.
6. Studart, A.R., R.M. Erb, and R. Libanori, *Bioinspired hierarchical composites*, in *Hybrid and hierarchical composite materials*. 2015, Springer. p. 287-318.
7. Miculescu, F., et al., *Bioceramics derived from marble and sea shells as potential bone substitution materials*, in *Bioceramics and biocomposites: from experiment to clinical use*, I. Antoniac, Editor. 2016, Wiley.
8. Miculescu, F., et al., *Cortical bone as resource for producing biomimetic materials for clinical use*. Dig J Nanomater Biostruct, 2012. **7**: p. 1667-77.
9. Diggs, A.B., *Influence of Calcium Phosphate Composition and Design on Bone Regeneration, Degradation and Mechanical Function*. 2013, The University of Michigan.
10. Miculescu, F., et al., *Thermal Degradation and Morphological Characteristics of Bone Products*. Reactions and Mechanisms in Thermal Analysis of Advanced Materials, 2015: p. 393-410.
11. Miculescu, F., et al., *Micro-analytical comparison on elemental composition of nonstoichiometric bovine bone derived hydroxyapatite*. Key Engineering Materials, 2014. **638**.
12. Miculescu, F., et al., *Influence Of The Modulated Two-Step Synthesis Of Biogenic Hydroxyapatite On Biomimetic Products' surface*. Applied Surface Science, 2017. **438**: p. 147-157.
13. Mocanu, A.-C., et al., *Naturally-Derived Biphasic Calcium Phosphates through Increased Phosphorus-Based Reagent Amounts for Biomedical Applications*. Materials, 2019. **12**(3): p. 381.
14. Mocanu, A.-C., et al., *Internal and external surface features of newly developed porous ceramics with random interconnected 3D channels by a fibrous sacrificial porogen method*. Applied Surface Science, 2019. **489**: p. 226-238.
15. Cecen, B., et al., *Biocompatibility and biomechanical characteristics of loofah based scaffolds combined with hydroxyapatite, cellulose, poly-L-lactic acid with chondrocyte-like cells*. Materials Science and Engineering: C, 2016. **69**: p. 437-446.
16. Fadli, A., et al., *Hydroxyapatite Powder Prepared by Low Temperature Hydrothermal Method from Sea Shells*. Science and Engineering, 2014.
17. Mocanu, A.-C., et al., *Comprehensive analysis of compatible natural fibre as sacrificial porogen template for tailored ceramic 3D bioproducts destined for hard tissue reconstruction*. Ceramics International, 2021. **47**: p. 5318-5334.
18. Lalwani, G., et al., *Toxicology of graphene-based nanomaterials*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **105**: p. 109-144.
19. Li, M., et al., *An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications*. Bioactive materials, 2018. **3**(1): p. 1-18.
20. Mocanu, A.-C., et al., *Preliminary Studies on Graphene-Reinforced 3D Products Obtained by the One-Stage Sacrificial Template Method for Bone Reconstruction Applications*. Journal of Functional Biomaterials, 2021. **12**(1): p. 13.
21. Mocanu, A.-C., et al., *Fibre-Templated 3D Calcium-Phosphate Scaffolds for Biomedical Applications: The Role of the Thermal Treatment Ambient on Physico-Chemical Properties*. Materials, 2021. **14**(9): p. 2198.
22. Ross, A.M., et al., *Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity*. Small, 2012. **8**(3): p. 336-355.
23. Cimpean, A., et al., *Biomaterials as modulators of macrophage inflammatory response*, in *Biomaterials*, J.N. Govil, Editor. 2013, Studium Press LLC USA. p. 139-176.
24. Barbosa, T.P., et al., *Topography and surface energy of dental implants: a methodological approach*. Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering, 2017. **39**(6): p. 1895-1907.
25. Popa, A., et al., *Bioglass implant-coating interactions in synthetic physiological fluids with varying degrees of biomimicry*. International Journal of Nanomedicine, 2017. **12**: p. 683.
26. Sánchez-Salcedo, S., et al., *Synthesis of HA/ β -TCP bioceramic foams from natural products*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2016. **79**(1): p. 160-166.
27. Holanda, J.N.F., *Nanostructured Calcium Phosphate-Based Bioceramics from Waste Materials*, in *Handbook of Ecomaterials*, L.M.T.

- Martínez, O.V. Kharissova, and B.I. Kharisov, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 1-18.
28. Agbeboh, N.I., et al., *Environmentally sustainable processes for the synthesis of hydroxyapatite*. Heliyon, 2020. **6**(4): p. e03765.
 29. Lertcumfu, N., et al. *Processing and Properties of Biphasic Calcium Phosphates Bioceramics Derived from Biowaste Materials*. in *Key Engineering Materials*. 2018. Trans Tech Publ.
 30. Pokhrel, S., *Hydroxyapatite: preparation, properties and its biomedical applications*. Advances in Chemical Engineering and Science, 2018. **8**(04): p. 225.
 31. Miculescu, F., et al., *Biomimetic calcium phosphates derived from marine and land bioresources*. Hydroxyapatite—Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets; InTechOpen: London, UK, 2018: p. 89-108.
 32. Miculescu, F., et al., *Structural and morphological induced modifications in hydroxyapatite obtained by bone thermal treatments*. JOURNAL OF OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS, 2015. **17**(9-10): p. 1361-1366.
 33. Miculescu, F., et al., *Tuning hydroxyapatite particles' characteristics for solid freeform fabrication of bone scaffolds*, in *Advanced Composite Materials*, A. Tiwari, Editor. 2016, Wiley.
 34. Bairo, F. and M. Ferraris, *Learning from Nature: Using bioinspired approaches and natural materials to make porous bioceramics*. International Journal of Applied Ceramic Technology, 2017. **14**(4): p. 507-520.
 35. Barros, A.A., et al., *In vitro bioactivity studies of ceramic structures isolated from marine sponges*. Biomedical Materials, 2016. **11**(4): p. 045004.
 36. Erythropel, H.C., et al., *The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles*. Green chemistry, 2018. **20**(9): p. 1929-1961.
 37. Maidaniuc, A., et al., *Induced wettability and surface-volume correlation of composition for bovine bone derived hydroxyapatite particles*. Applied Surface Science, 2018. **438**: p. 158-166.
 38. Miculescu, F., et al., *Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite particles for high value nanocomposites and biomaterials*. Vacuum, 2017. **146**: p. 614-622.
 39. Trinkunaite-Felsen, J., et al., *Environmentally benign fabrication of calcium hydroxyapatite using seashells collected in Baltic Sea countries: A comparative study*. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2016. **191**(6): p. 919-925.
 40. Santhosh, S. and S.B. Prabu, *Synthesis and characterisation of nanocrystalline hydroxyapatite from sea shells*. International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology, 2012. **2**(3-4): p. 276-283.
 41. Rujitanapanich, S., P. Kumpapan, and P. Wanjanoi, *Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation*. Energy Procedia, 2014. **56**: p. 112-117.
 42. Rathje, W., *Zur Kenntnis der Phosphate I: Über Hydroxylapatit*. Bodenkunde und Pflanzenernährung, 1939. **12**(1-2): p. 121-128.
 43. Vecchio, K.S., et al., *Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants*. Acta Biomaterialia, 2007. **3**(6): p. 910-918.
 44. Lemos, A.F., et al., *Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally from nacreous material*. Journal of the European Ceramic Society, 2006. **26**(16): p. 3639-3646.
 45. Rodriguez-Navarro, C., et al., *Thermal decomposition of calcite: Mechanisms of formation and textural evolution of CaO nanocrystals*. American Mineralogist, 2009. **94**(4): p. 578-593.
 46. Satterfield, C.N. and F. Feakes, *Kinetics of the thermal decomposition of calcium carbonate*. AIChE journal, 1959. **5**(1): p. 115-122.
 47. Toprak, G., *Characteristics of Limes Produced from Marbles and Limestones*. 2007, Citeseer.
 48. Kim, S.-K., *Marine Biomaterials: Characterization, isolation and applications*. 2013: CRC Press.
 49. Şahin, E., *Synthesis and characterization of calcium phosphate cement based macroporous scaffolds*. 2012.
 50. Abbona, F., H.E.L. Madsen, and R. Boistelle, *The final phases of calcium and magnesium phosphates precipitated from solutions of high to medium concentration*. Journal of crystal growth, 1988. **89**(4): p. 592-602.
 51. Shavandi, A., et al. *A Review of Synthesis Methods, Properties and Use of Hydroxyapatite as a Substitute of Bone*. in *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2015. Trans Tech Publ.
 52. Mitran, V., et al., *Osteoblast Cell Response to Naturally Derived Calcium Phosphate-Based Materials*. Materials, 2018. **11**(7): p. 1097.
 53. Ślósarczyk, A., Z. Paszkiewicz, and C. Paluszkiwicz, *FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods*. Journal of Molecular Structure, 2005. **744-747**: p. 657-661.
 54. Rey, C., et al., *Bone mineral: update on chemical composition and structure*. Osteoporosis International, 2009. **20**(6): p. 1013-1021.
 55. Yanovska, A., et al., *A study of brushite crystallization from calcium-phosphate solution in the presence of magnesium under the action of a low magnetic field*. Materials Science and Engineering: C, 2012. **32**(7): p. 1883-1887.
 56. Rosa, S. and H.E.L. Madsen, *Influence of some foreign metal ions on crystal growth kinetics of*

- brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). *Journal of Crystal Growth*, 2010. **312**(20): p. 2983-2988.
57. Boanini, E., M. Gazzano, and A. Bigi, *Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature*. *Acta biomaterialia*, 2010. **6**(6): p. 1882-1894.
 58. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine*. Materials, 2009. **2**(2): p. 399-498.
 59. Krambeck, A.E., et al., *Profile of the brushite stone former*. *The Journal of urology*, 2010. **184**(4): p. 1367-1371.
 60. Cama, G., et al., *Tailoring brushite for in situ setting bone cements*. *Materials Chemistry and Physics*, 2011. **130**(3): p. 1139-1145.
 61. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates*. *Journal of materials science*, 2007. **42**(4): p. 1061-1095.
 62. Dorozhkin, S.V. and M. Epple, *Biological and medical significance of calcium phosphates*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002. **41**(17): p. 3130-3146.
 63. Barrère, F., C.A. van Blitterswijk, and K. de Groot, *Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics*. *International journal of nanomedicine*, 2006. **1**(3): p. 317.
 64. Pina1a, S., et al., *Biological responses of brushite-forming Zn-and ZnSr-substituted β -tricalcium phosphate bone cements*. *European Cells and Materials*, 2010. **20**: p. 162-177.
 65. Ginebra, M.-P., et al., *Calcium phosphate cements as drug delivery materials*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**(12): p. 1090-1110.
 66. Desai, T.R., S.B. Bhaduri, and A.C. Tas, *A self-setting, monetite (CaHPO_4) cement for skeletal repair*. *Advances in Bioceramics and Biocomposites II, Ceramic Engineering and Science Proceedings*; Wereszczak, A., Lara-Curzio, E., Mizuno, M., Eds, 2007: p. 61-69.
 67. Montazerolghaem, M., et al., *Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts*. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. **52**: p. 212-218.
 68. Sivakumar, G., et al., *Crystallization and characterization of calcium phosphates: brushite and monetite*. *Crystal Research and Technology*, 1998. **33**(2): p. 197-205.
 69. Tamimi, F., Z. Sheikh, and J. Barralet, *Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite*. *Acta biomaterialia*, 2012. **8**(2): p. 474-487.
 70. Miculescu, F., *New technology for the synthesis and manufacturing of biomimetic implants derived from biogenic resources used for bone reconstruction surgery*. 2017.
 71. Cox, S.C., et al., *3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications*. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. **47**: p. 237-247.
 72. Giannitelli, S., et al., *Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering*. *Acta biomaterialia*, 2014. **10**(2): p. 580-594.
 73. Millington, K. and J. Rippon, *Wool as a high-performance fibre*, in *Structure and properties of high-performance fibres*. 2017, Elsevier. p. 367-408.
 74. Tanobe, V.O., et al., *A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*)*. *Polymer Testing*, 2005. **24**(4): p. 474-482.
 75. Guimarães, J., et al., *Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibres of Brazil*. *Industrial Crops and Products*, 2009. **30**(3): p. 407-415.
 76. Satyanarayana, K.G., G.G. Arizaga, and F. Wypych, *Biodegradable composites based on lignocellulosic fibres—An overview*. *Progress in polymer science*, 2009. **34**(9): p. 982-1021.
 77. Stevulova, N., et al., *Thermal degradation of natural and treated hemp hurds under air and nitrogen atmosphere*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2017. **128**(3): p. 1649-1660.
 78. Tanobe, V.O., et al., *Sponge gourd (*Luffa cylindrica*) reinforced polyester composites: preparation and properties*. *Defence Science Journal*, 2014. **64**(3): p. 273-280.
 79. Chen, Y., et al., *In-depth analysis of the structure and properties of two varieties of natural luffa sponge fibres*. *Materials*, 2017. **10**(5): p. 479.
 80. Dorez, G., et al., *Effect of cellulose, hemicellulose and lignin contents on pyrolysis and combustion of natural fibres*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2014. **107**: p. 323-331.
 81. Mngomezulu, M.E., et al., *Review on flammability of biofibres and biocomposites*. *Carbohydrate polymers*, 2014. **111**: p. 149-182.
 82. John, M.J. and S. Thomas, *Biofibres and biocomposites*. *Carbohydrate polymers*, 2008. **71**(3): p. 343-364.
 83. Saeed, A. and M. Iqbal, *Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications*. *Biotechnology progress*, 2013. **29**(3): p. 573-600.
 84. Zhang, Y.-H., et al., *Thermal destruction of luffa sponge under air and nitrogen*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2017. **128**(1): p. 53-60.
 85. Dai, D. and M. Fan, *Characteristic and performance of elementary hemp fibre*. *Materials Sciences and Applications*, 2010. **1**(06): p. 336.
 86. Kabir, M., et al., *Effects of chemical treatments on hemp fibre structure*. *Applied Surface Science*, 2013. **276**: p. 13-23.
 87. Rachini, A., et al., *Comparison of the thermal degradation of natural, alkali-treated and silane-treated hemp fibres under air and an inert atmosphere*. *Journal of applied polymer science*, 2009. **112**(1): p. 226-234.

88. Cazalbou, S., et al., *Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates*. Journal of Materials Chemistry, 2004. **14**(14): p. 2148-2153.
89. NagarajaGanesh, B. and R. Muralikannan, *Extraction and characterization of lignocellulosic fibres from Luffa cylindrica fruit*. International Journal of Polymer Analysis and Characterization, 2016. **21**(3): p. 259-266.
90. Shahzad, A., *A study in physical and mechanical properties of hemp fibres*. Advances in Materials Science and Engineering, 2013. **2013**.
91. Song, K., et al., *Structure and thermal properties of tar from gasification of agricultural crop residue*. Journal of thermal analysis and calorimetry, 2015. **119**(1): p. 27-35.
92. Zoccola, M., A. Aluigi, and C. Tonin, *Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes*. Journal of Molecular Structure, 2009. **938**(1-3): p. 35-40.
93. Brebu, M. and I. Spiridon, *Thermal degradation of keratin waste*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2011. **91**(2): p. 288-295.
94. Bertini, F., et al., *Wool keratin-polypropylene composites: Properties and thermal degradation*. Polymer degradation and stability, 2013. **98**(5): p. 980-987.
95. Aluigi, A., et al., *Composite biomaterials from fibre wastes: Characterization of wool-cellulose acetate blends*. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2008. **39**(1): p. 126-132.
96. Aluigi, A., et al., *Keratins extracted from Merino wool and Brown Alpaca fibres as potential fillers for PLLA-based biocomposites*. Journal of materials science, 2014. **49**(18): p. 6257-6269.
97. Cardamone, J.M., *Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR)*. Journal of molecular structure, 2010. **969**(1-3): p. 97-105.
98. Manich, A., et al., *Thermomechanical analysis of merino wool yarns*. Journal of thermal analysis and calorimetry, 2005. **82**(1): p. 119-123.
99. Roy, I., et al., *Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **250**(1): p. 25-33.
100. Alshaaer, M., et al., *Fabrication of porous bioceramics for bone tissue applications using luffa cylindrical fibres (LCF) as template*. Processing and Application of Ceramics, 2017. **11**(1): p. 13-20.
101. Thepsri, N., L. Kaewsichan, and J. Kaewsrichan, *Bioactivity behavior of porous β -TCP/CS composite scaffolds for bone tissue engineering*. 2012.
102. Saekhow, J., J. Kaewsrichan, and L. Kaewsichan. *Preparation of a scaffold from (nano) hydroxyapatite-zirconium by sol-gel technique and evaluate its physical properties*. in 10th International PSU Engineering Conference, Hat Yai, Thailand, May 14. 2012.
103. Ouajai, S. and R. Shanks, *Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments*. Polymer degradation and stability, 2005. **89**(2): p. 327-335.
104. Das, O., et al., *Development of waste based biochar/wool hybrid biocomposites: Flammability characteristics and mechanical properties*. Journal of cleaner production, 2017. **144**: p. 79-89.
105. Bose, S., S. Vahabzadeh, and A. Bandyopadhyay, *Bone tissue engineering using 3D printing*. Materials Today, 2013. **16**(12): p. 496-504.
106. Mucalo, M.R., *Novel Advances and Approaches in Biomedical Materials Based on Calcium Phosphates*. 2019, Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
107. Baradaran, S., et al., *Characterization of nickel-doped biphasic calcium phosphate/graphene nanoplatelet composites for biomedical application*. Materials Science and Engineering: C, 2015. **49**: p. 656-668.
108. Dee, P., et al., *Bioinspired approaches to toughen calcium phosphate-based ceramics for bone repair*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2020: p. 104078.
109. Liu, Y., J. Huang, and H. Li, *Synthesis of hydroxyapatite-reduced graphene oxide nanocomposites for biomedical applications: oriented nucleation and epitaxial growth of hydroxyapatite*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. **1**(13): p. 1826-1834.
110. Nosrati, H., et al., *Investigating the mechanical behavior of hydroxyapatite-reduced graphene oxide nanocomposite under different loading rates*. Nano Express, 2020. **1**(1): p. 010053.
111. Bermejo, R., *"Toward seashells under stress": Bioinspired concepts to design tough layered ceramic composites*. Journal of the European Ceramic Society, 2017. **37**(13): p. 3823-3839.
112. Brundavanam, R.K., D. Fawcett, and G.E.J. Poinern, *Synthesis of a bone like composite material derived from waste pearl oyster shells for potential bone tissue bioengineering applications*. International Journal of Research in Medical Sciences, 2017. **5**(6): p. 2454-2461.
113. Edwin, N., S. Saranya, and P. Wilson, *Strontium incorporated hydroxyapatite/hydrothermally reduced graphene oxide nanocomposite as a cytocompatible material*. Ceramics International, 2019. **45**(5): p. 5475-5485.
114. Türk, S., et al., *The effect of reduction of graphene oxide on the formation of hydroxyapatite and tricalcium phosphate*. Vacuum, 2018. **148**: p. 1-10.
115. Nosrati, H., et al., *Comparison of the effect of argon, hydrogen, and nitrogen gases on the reduced graphene oxide-hydroxyapatite*

- nanocomposites characteristics*. BMC chemistry, 2020. **14**(1): p. 1-13.
116. Miranzo, P., M. Belmonte, and M.I. Osendi, *From bulk to cellular structures: A review on ceramic/graphene filler composites*. Journal of the European Ceramic Society, 2017. **37**(12): p. 3649-3672.
 117. Nosrati, H., et al., *In situ synthesis of three dimensional graphene-hydroxyapatite nano powders via hydrothermal process*. Materials Chemistry and Physics, 2019. **222**: p. 251-255.
 118. Sharma, D., et al., *Insight into the biosensing of graphene oxide: Present and future prospects*. Arabian Journal of Chemistry, 2016. **9**(2): p. 238-261.
 119. Syama, S. and P. Mohanan, *Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application*. International journal of biological macromolecules, 2016. **86**: p. 546-555.
 120. Oğuz, Ö.D. and D. Ege, *Preparation of graphene oxide-reinforced calcium phosphate/calcium sulfate/methylcellulose-based injectable bone substitutes*. MRS Communications, 2019. **9**(4): p. 1174-1180.
 121. Baradaran, S., et al., *Mechanical properties and biomedical applications of a nanotube hydroxyapatite-reduced graphene oxide composite*. Carbon, 2014. **69**: p. 32-45.
 122. Eqtesadi, S., et al., *Reinforcement with reduced graphene oxide of bioactive glass scaffolds fabricated by robocasting*. Journal of the European Ceramic Society, 2017. **37**(12): p. 3695-3704.
 123. Zhang, L., et al., *A tough graphene nanosheet/hydroxyapatite composite with improved in vitro biocompatibility*. Carbon, 2013. **61**: p. 105-115.
 124. Baudín, C., T. Benet, and P. Pena, *Effect of graphene on setting and mechanical behaviour of tricalcium phosphate bioactive cements*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2019. **89**: p. 33-47.
 125. Zeng, Y., et al., *Graphene oxide/hydroxyapatite composite coatings fabricated by electrochemical deposition*. Surface and Coatings Technology, 2016. **286**: p. 72-79.
 126. Ananth, K.P., et al., *Investigation of biphasic calcium phosphate (BCp)/polyvinylpyrrolidone (PVp)/graphene oxide (GO) composite for biomedical implants*. Ceramics International, 2020. **46**(15): p. 24413-24423.
 127. Basirun, W.J., B. Nasiri-Tabrizi, and S. Baradaran, *Overview of hydroxyapatite-graphene nanoplatelets composite as bone graft substitute: mechanical behavior and in-vitro biofunctionality*. Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, 2018. **43**(3): p. 177-212.
 128. Dong, H. and S. Qi, *Realising the potential of graphene-based materials for biosurfaces—A future perspective*. Biosurface and Biotribology, 2015. **1**(4): p. 229-248.
 129. Fathyunes, L., J. Khalil-Allafi, and M. Moosavifar, *Development of graphene oxide/calcium phosphate coating by pulse electrodeposition on anodized titanium: Biocorrosion and mechanical behavior*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2019. **90**: p. 575-586.
 130. Li, M., et al., *Electrophoretic deposition and electrochemical behavior of novel graphene oxide-hyaluronic acid-hydroxyapatite nanocomposite coatings*. Applied surface science, 2013. **284**: p. 804-810.
 131. Kang, B.K., et al., *Synthesis and characterization of a mesoporous and three dimensional N-doped graphene structure via the Couette-Taylor flow and hydrothermal method*. Journal of the European Ceramic Society, 2017. **37**(12): p. 3673-3680.
 132. Núñez, J.D., et al., *Integration and bioactivity of hydroxyapatite grown on carbon nanotubes and graphene oxide*. Carbon, 2014. **79**: p. 590-604.
 133. Rajesh, A., et al., *Physicochemical properties of nanocomposite: hydroxyapatite in reduced graphene oxide*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **76**: p. 203-210.
 134. Yao, C., et al., *Graphene oxide and creatine phosphate disodium dual template-directed synthesis of GO/hydroxyapatite and its application in drug delivery*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **73**: p. 709-715.
 135. Zhao, Y., et al., *Microstructure and anisotropic mechanical properties of graphene nanoplatelet toughened biphasic calcium phosphate composite*. Ceramics International, 2013. **39**(7): p. 7627-7634.
 136. Lukić, M., et al., *Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering*. Journal of the European Ceramic Society, 2011. **31**(1-2): p. 19-27.
 137. Feng, C., et al., *Additive manufacturing of hydroxyapatite bioceramic scaffolds: Dispersion, digital light processing, sintering, mechanical properties, and biocompatibility*. Journal of Advanced Ceramics, 2020. **9**: p. 360-373.
 138. Jurgelane, I., et al., *Effect of sintering temperature on sorption properties and compressive strength of calcium phosphate ceramic granules*. Materials Letters, 2021. **282**: p. 128858.
 139. Yetmez, M., *Sintering behavior and mechanical properties of biphasic calcium phosphate ceramics*. Advances in Materials Science and Engineering, 2014. **2014**.
 140. Anastasiou, A., et al., *β -pyrophosphate: A potential biomaterial for dental applications*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **75**: p. 885-894.
 141. Krut'ko, V., et al., *Calcium phosphate foam ceramic based on hydroxyapatite-brushite powder*

- mixture. *Glass and Ceramics*, 2019. **76**(3): p. 113-118.
142. Safronova, T., et al., *Calcium phosphate ceramic in the system Ca (PO₃)₂-Ca₂P₂O₇ based on powder mixtures containing calcium hydrophosphate*. *Glass and Ceramics*, 2018. **75**(7): p. 279-286.
 143. Topsakal, A., et al., *Synthesis and characterization of antibacterial drug loaded β -tricalcium phosphate powders for bone engineering applications*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2020. **31**(2): p. 1-17.
 144. Santhosh, S. and S.B. Prabu, *Characterization of Nano-Hydroxyapatite Synthesized from Sea Shells Through Wet Chemical Method*. *International Journal of Nanoscience*, 2012. **11**(05): p. 1250031.
 145. Logesh, M., A. Marimuthu, and A. Ballamurugan, *Fabrication of graphene incorporated biphasic calcium phosphate composite and evaluation of impact of graphene in the in-vitro biomineralization process*. *Materials Chemistry and Physics*, 2019. **232**: p. 75-81.
 146. Bobbert, F. and A. Zadpoor, *Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017. **5**(31): p. 6175-6192.
 147. White, A.A., et al., *Optimization of the sintering atmosphere for high-density hydroxyapatite-carbon nanotube composites*. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010. **7**(suppl_5): p. S529-S539.
 148. Champion, E., *Sintering of calcium phosphate bioceramics*. *Acta biomaterialia*, 2013. **9**(4): p. 5855-5875.
 149. Schoeman, L., et al., *X-ray micro-computed tomography (μ CT) for non-destructive characterisation of food microstructure*. *Trends in Food Science & Technology*, 2016. **47**: p. 10-24.
 150. Thompson, A., I. Maskery, and R.K. Leach, *X-ray computed tomography for additive manufacturing: a review*. *Measurement Science and Technology*, 2016. **27**(7): p. 072001.
 151. Töberg, S. and E. Reithmeier, *Quantitative 3D Reconstruction from Scanning Electron Microscope Images Based on Affine Camera Models*. *Sensors*, 2020. **20**(12): p. 3598.
 152. Garczyk, Ż., S. Stach, and Z. Wróbel, *Evaluation Of Implant Surface Porosity Using It Tools*. in *The Book of Articles National Scientific Conference "Science and Young Researchers" III edition*. 2019. Lainović, T., et al. *3-D areal functional parameters extracted from AFM data of polished dental tooth-restorative nanocomposites*. in *European Microscopy Congress 2016: Proceedings*. 2016. Wiley Online Library.
 154. Țălu, Ș., S. Stach, and S. Abdolghaderi, *The effects of deposition time on the nanoscale patterns of Ag/DLC nanocomposite synthesized by RF-PECVD*. *Microscopy research and technique*, 2019. **82**(5): p. 572-579.
 155. Nishimiya, K., et al., *Micro-optical coherence tomography for endothelial cell visualization in the coronary arteries*. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 2019. **12**(9): p. 1878-1880.
 156. Reddy, V., et al., *Study on surface texture of Fused Deposition Modeling*. *Procedia Manufacturing*, 2018. **25**: p. 389-396.
 157. Bin, B., et al., *Multi-scale method of Nano (Micro)-CT study on microscopic pore structure of tight sandstone of Yanchang Formation, Ordos Basin*. *Petroleum Exploration and Development*, 2013. **40**(3): p. 354-358.
 158. Bossa, N., et al., *Micro-and nano-X-ray computed-tomography: A step forward in the characterization of the pore network of a leached cement paste*. *Cement and Concrete Research*, 2015. **67**: p. 138-147.
 159. Markl, D., et al., *Analysis of 3D prints by x-ray computed microtomography and terahertz pulsed imaging*. *Pharmaceutical research*, 2017. **34**(5): p. 1037-1052.
 160. Yoshikawa, H., et al., *Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering*. *Journal of the Royal Society Interface*, 2008. **6**(suppl_3): p. S341-S348.
 161. Ajaxon, I., et al., *Evaluation of a porosity measurement method for wet calcium phosphate cements*. *Journal of biomaterials applications*, 2015. **30**(5): p. 526-536.
 162. Feller, L., et al., *Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants*. *BioMed research international*, 2015. **2015**.
 163. Pinto, A.M., I.C. Goncalves, and F.D. Magalhaes, *Graphene-based materials biocompatibility: a review*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. **111**: p. 188-202.
 164. Guo, X. and N. Mei, *Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials*. *Journal of food and drug analysis*, 2014. **22**(1): p. 105-115.