

# COMPOZITE HIBRIDE BIORESORBABILE CU BIOACTIVITATE RIDICATĂ HYBRID BIORESORBABLE COMPOSITES WITH HIGH BIOACTIVITY PROPERTIES

CHRISTU ȚARDEI<sup>1\*</sup>, LUCIA MOLDOVAN<sup>2</sup>, OANA CRĂCIUNESCU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Inginerie Electrică, INCDIE ICPE-CA, Spl. Unirii nr.313, 74204 – București, România;

<sup>2</sup> Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Științe Biologice, Spl. Independenței, 060031, P.O. Box 17-16, București, România

*Scopul lucrării a constat în crearea unui model in vitro de inginerie tisulară, de compozit biocompatibil și bioresorbabil, prin combinarea pulberilor ceramice de fosfat tricalcic ( $\beta$ -TCP), component majoritar, cu collagen (COL). Mai mult, se asociază capacitatea osteoinductivă a collagenului cu caracteristicile superioare de bioactivitate și osteoconducție ale  $\beta$ -TCP. În prezentul studiu sunt elaborate și examinate două tipuri de structuri compozite COL/ $\beta$ -TCP, notate P1 și P2. Pulberile ceramice microcristaline de  $\beta$ -TCP au fost elaborate prin reacții în fază solidă la temperaturi ridicate, pe când nano-pulberile de  $\beta$ -TCP au fost obținute prin tehnici de precipitare. Bureții din collagen și TCP au fost elaborați din cele două sorturi de  $\beta$ -TCP și collagen (tipul I), în condiții similare mediului fiziologic. Morfologia și compoziția chimică au fost analizate prin difracție de raze X (DRX), microscopie electronică (MES), și spectroscopie IR. Biocompatibilitatea materialelor a fost evaluată prin măsurarea efectului citotoxic (viabilitatea și proliferarea celulară). Biocompatibilitatea structurilor compozite a fost testată prin metode biochimice pe culturi celulare de fibroblaste umane. Analiza statistică a rezultatelor s-a realizat cu ajutorul testului Student.*

*The purpose of this work was to create an in vitro model of tissue engineered hybrid biocompatible and bioresorbable composite by combining beta-tricalcium phosphate powders ( $\beta$ -TCP), as the main component, with collagen. Moreover, the collagen's osteoinductive capacity is associated with the superior bioactivity and osteoconduction of the  $\beta$ -TCP. In the present study two variants of COL/ $\beta$ -TCP scaffolds (P1 and P2) were prepared and examined. Microcrystalline  $\beta$ -TCP powders were prepared at high temperatures by solid-state reactions, and the nano-powders were produced by a precipitation technique. The collagen-TCP sponges were obtained by the reaction of two sorts of  $\beta$ -TCP powders (micro and nanometric size powders) with type I collagen under the physiological conditions. The morphology and chemical composition were analyzed semiquantitatively using X-ray diffraction analysis (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectroscopy (IR). The biocompatibility of the materials was evaluated by cytotoxic effects (cell death and cell proliferation). The biocompatibility of the obtained scaffolds was tested by biochemical methods on human fibroblast cultures. The Student's t-test was used for all statistical analyses.*

**Keywords:** biomaterials, beta-tricalcium phosphate, collagen, hybrid composites, resorbability

## 1. Introducere

Un interes special prezintă materialele sintetice cu caracteristici biologice, chimice, morfologice și mecanice similare cu ale țesutului osos. Pentru a fi folosite în ingineria țesutului osos, biomaterialele, inerte sau biodegradabile, naturale sau sintetice, trebuie să fie biocompatibile, osteoinductive, osteoconductive, integrative și compatibile mecanic cu țesutul osos biologic. Din punct de vedere chimic, osul este un material poros compozit, alcătuit în principal dintr-o fază organică (collagen și proteine necolagenice), și o fază anorganică sau minerală (fosfați de calciu) [1, 2].

Deoarece compusul fosfat tricalcic, variația polimorfică beta ( $\beta$ -TCP) are un caracter de resorbție mai pronunțat decât compusul hidroxiapatită (HAP), combinarea TCP cu collagenul (COL) poate acționa ca o structura (eșafodaj) 3D [3]. Numeroase materiale structurate au fost investigate pentru ingineria țesutului osos și cartilajului, dar o atenție specială a fost acordată com-

## 1. Introduction

Synthetic materials with biological, chemical, morphological and mechanical characteristics similar to the bone tissues present a special interest. Biomaterials, permanent or biodegradable, naturally-found or synthetic, need to be biocompatible as well as osteoinductive, osteoconductive, integrative and mechanically compatible with native bone to be used in bone tissue engineering. From a chemical point of view, the bone is a composite porous material mainly composed of an organic phase (collagen and other non-collagenic proteins), and an inorganic or mineral phase (calcium phosphates) [1, 2]. Since beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) is much greater resorbable than hydroxyapatite (HAP) the combination of TCP with collagen (COL) can act as a good scaffold materials [3]. Several scaffold materials have been investigated for tissue engineering bone and cartilage, but special attention has been devoted to calcium phosphate

\* Autor corespondent/Corresponding author,  
Tel.: +4021 346 82 978, e-mail: [chtardei@icpe-ca.ro](mailto:chtardei@icpe-ca.ro)

ponenților de fosfat de calciu datorită abilității acestora de a se lega direct de țesutul osos dur. Proiectarea unei astfel de structuri care să copieze osul mineral din punct de vedere compozițional și structural are o mare importanță în scopul de a promova adeziunea celulară, osteo-integrarea și formarea țesutului osos.

Recent, de mare interes se bucură utilizarea compusului fosfat tricalcic datorită caracteristicilor de biodegradabilitate și biocompatibilitate [4, 5]. Dintre cele trei forme alotropice ale fosfatului tricalcic,  $\beta$ -TCP, este preferată ca material bioceramic datorită stabilității chimice, rezistenței mecanice și coeficientului de bioresorbție favorabil. O solubilitate mare poate fi benefică în multe aplicații [6]. Suprasaturarea locală a ionilor constituenți ai fazei osului mineral, ia naștere din calitatea soluției de fosfat de calciu, care poate determina dezvoltarea structurii osoase.

Natura interacțiilor la suprafață ale biomaterialului cu țesutul gazdă și celule este importantă pentru succesul implantului. Din această cauză, utilizarea nanopulberii de  $\beta$ -TCP în locul celor elaborate convențional poate reprezenta o soluție în crearea condițiilor favorabile procesului de formare a țesutului osos. Mai mult, capacitatea osteoinductivă a colagenului este asociată cu bioactivitatea și osteoconducția superioară a  $\beta$ -TCP [7-9]. Recent, o gamă largă de polimeri, naturali și sintetici precum gelatina și colagenul, au fost utilizați drept compozite hibride pentru aplicații de reconstrucție osoasă [4, 10].

În această lucrare sunt prezentate sinteza, caracterizarea și evaluarea compusului fosfat tricalcic, sub formă de micro- și nano-pulberi, component principal al compozitelor hibride bioresorbabile. Lucrarea științifică prezintă de asemenea o modalitate de a obține structuri unitare tip „bureți” pe bază de COL/  $\beta$ -TCP, caracterizarea structurală și evaluarea acestora prin teste *in vitro*.

## 2. Experimentări

### *Prepararea și caracterizarea compozitelor hibride COL/ $\beta$ -TCP*

COL de tip I a fost izolat din tendon de bovină tratat cu pepsină, utilizând acid acetic diluat. Soluțiile de colagen au fost purificate prin precipitare cu soluție 0,7M NaCl. Au fost determinate hidroxiprolina, conținutul total de azot și greutatea moleculară. Detalii și rezultate experimentale sunt prezentate în lucrarea [11].

#### **2.1. Prepararea $\beta$ -TCP prin reacție în fază solidă**

Pentru experimentări au fost utilizate materii prime de puritate avansată precum  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , toate de proveniență Merck. Toate probele au fost preparate prin reacția în fază solidă a amestecului de materii prime și apoi sinterizate în

compounds because of their ability to directly bond to hard tissue. Designing scaffold that mimic composition and structural aspect of the mineral bone is of great importance to promote cell-adhesion, osteo-integration and tissue formation. Recently, tricalcium phosphate (TCP) has been attracting attention due to its good biodegradability and biocompatibility [4, 5]. Among the three allotropic forms of TCP,  $\beta$ -TCP is preferred as a bioceramic because of its chemical stability, mechanical strength, and intermediate bioresorption rate. Higher solubility can be beneficial in some applications [6]. Local supersaturation of the constituent ions of the bone mineral phase, arising from an enhanced solution of calcium phosphate, may cause enhanced bone growth.

The nature of surface interactions of biomaterial with the host cell/tissue is very important for the implant success. For this reason, one may consider the use of beta-tricalcium phosphate nanopowder in place of conventional ones, a solution for favourable conditions in bone formation process. Moreover, the collagen's osteoinductive capacity is associated with the superior bioactivity and osteoconduction of the  $\beta$ -TCP [7-9]. Recently, a wide range of degradable polymers, including natural and synthetic polymers, gelatine and collagen, mixed with beta-tricalcium phosphate, has been used as hybrid biocomposites, in bone reconstruction applications [4, 10].

The present article reports synthesis, characterization and evaluation of beta-tricalcium phosphate, in form of micro- and nano-powders, as main component of bioresorbable hybrid composites. Scientific work also presents the way to prepare COL/ $\beta$ -TCP conjugated sponges, the structural characterization and *in vitro* assessments.

## 2. Experimental

### *Preparation and characterization of COL/ $\beta$ -TCP hybrid composites*

Type I COL was isolated from bovine tendon by pepsin treatment, using dilute acetic acid. The collagen solutions were purified by 0.7M NaCl precipitation. Hydroxyproline, total nitrogen content and molecular weight were determined. Details and experimental results were presented elsewhere [11].

#### **2.1. Preparation of $\beta$ -TCP by solid state reaction**

For experiments there have been used raw materials of high-purity such as  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , all from Merck, and used as received. All samples were prepared by reacting the appropriate chemical mixture, by solid-state reaction, at 1100°C for 2 hours, in air. Before

aer la 1100°C timp de 2 ore. Înainte de sinterizare, amestecul a fost omogenizat în etanol timp de 6 ore folosind bile din alumina, suspensia rezultată a fost uscată și calcinată timp de 2 ore la 900°C, temperatura la care începe formarea compusului fosfatului tricalcic. Curbele TG și DTG indică pierderea de masă totală în intervalul de temperatură 20-1000°C. Curbele DTA prin picurile endotermice și exotermice delimitează toate fenomenele care au loc în acest interval de temperatură. Pentru analiza structurii cristaline, a compoziției mineralogice și a parametrilor de rețea s-a utilizat difractometrul de raze X, Bruker-AXS, D8 ADVANCE, cu anod de Cu, iar cu ajutorul ecuației Scherrer s-a putut calcula dimensiunea medie a cristalitelor pentru pulberile ceramice elaborate, luând în calcul lărgimea la jumătatea picului de maximă intensitate (*full-width at half maxima*- **FWHM**), conform reacției (1):

$$d = \frac{0,9 \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (1)$$

unde,  $d$  reprezintă diametrul particulei,  $\lambda$  este lungimea de undă,  $\theta$  este unghiul de difracție, iar  $\beta$  reprezintă valoarea FWHM

### 2.2. Prepararea nano-pulberii de $\beta$ -TCP

Nanopulberile ceramice pe bază de fosfat tricalcic au fost sintetizate prin precipitare chimică din soluții apoase de săruri solubile.

Pentru experimentări s-au folosit reactivi de puritate înaltă,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  și  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , de proveniență Merck. O anumită cantitate de soluție concentrată (25%) de hidroxid de amoniu ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) a fost adăugată la amestecul de reacție, sub agitare continuă, pentru a asigura formarea, într-o primă etapă, a apatitei nestoichiometrice  $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ .

Soluția a fost agitată 1-3 ore și apoi spălată cu apă distilată și uscată la 60°C timp de 6h, urmată de calcinare timp de 2 ore la 800°C în atmosferă normală. Formarea compusului  $\beta$ -TCP și determinarea temperaturii de transformare a precursorului au fost evidențiate prin analiza de difracție de raze X (DRX), spectroscopie în infraroșu (IR) și analize termice (TG/DTG/ATD).

### 2.3. Elaborarea compozitelor poroase hibride

Compozitele hibride au fost elaborate prin amestecarea unei soluții de COL (0,6 % gr./vol.) cu  $\beta$ -TCP (5% gr./vol.) dizolvată într-o soluție tampon salină în prezența 0,2M HEPES și incubate timp de 24h la 35°C. Amestecurile realizate au fost transformate în structuri tip bureți prin congelare la -50°C timp de 48 ore. Compozitul COL/ $\beta$ -TCP a fost obținut în două variante C1 (COL: $\beta$ -TCP=1:1), și respectiv C2 (COL: $\beta$ -TCP=1:2). Drept etalon s-a folosit buretele numai din colagen.

sintering, the mixture was milled in ethanol for 6 hours using alumina media, dried the slurry and calcined below 900°C for 2 h, when starts the formation of the compound tricalcium phosphate. The curves TG and DTG indicate the total weight loss for a temperature range 20÷1100°C. The curves DTA by the endothermic and exothermic peaks delimitate all the phenomena which take place in the temperature range. An X-ray powder diffractometer, Bruker-AXS, D8 ADVANCE with CuK $\alpha$  radiation was used for crystal structure analysis, mineralogical composition. The crystal size of the  $\beta$ -TCP powders was estimated from the XRD spectra using the peak-breadth at half-maximum (*full-width at half maxima* - **FWHM**) and the Scherrer equation:

$$d = \frac{0,9 \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (1)$$

where,  $d$  is the crystal diameter,  $\lambda$  is the wavelength,  $\theta$  is the diffraction angle (in radians) and  $\beta$  is the **FWHM**.

### 2.2. Preparation of $\beta$ -TCP nano-powder

Ceramic nano-powders based on tricalcium phosphate, was synthesized by precipitation chemical synthesis, from salt solutions. For experiments we used high-purity reagent,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , all from Merck. A certain amount of concentrated (25%) ammonia water ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) were added to the reaction mixture to ensure the formation, in the first stage, of Ca-deficient apatite ( $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ) with continuous stirring. The solution was stirring for 1-3 hours and then washed with distilled water and dried at 60°C /6 h, followed by calcinations in an air atmosphere at about 800°C for 2 hours. The formation of the  $\beta$ -TCP and the right temperature transformation of precursor powders were evidenced by X-ray diffraction analysis (XRD), infrared spectroscopy (IR) and thermal analysis (TG/DTG/DTA).

### 2.3. Porous hybrid composites preparation

Porous composites were prepared by mixing a COL solution (0.6 % w/v) with  $\beta$ -TCP (5% w/v) dissolved in saline phosphate buffer in the presence of 0.2M HEPES and incubated at 35 °C, for 24 hours. The resulting mixture was conditioned as sponges by freeze-drying at -50°C for 48 hours. The COL/ $\beta$ -TCP composite was obtained in two variants: P1 (COL: $\beta$ -TCP 1:1), P2 (COL: $\beta$ -TCP 1:2). A control scaffold was prepared using COL alone.

### 2.4. In vitro biocompatibility evaluation of $\beta$ -TCP

Biocompatibility tests consisted mainly of

## 2.4. Evaluarea biocompatibilității $\beta$ -TCP, teste in vitro

Testele de biocompatibilitate au constat în principal în realizarea de măsurători de citotoxicitate, utilizând culturi de celule limfoblastice umane, prin determinarea viabilității celulare, cu metoda albastru de Trypan, și a proliferării celulare. Testele au fost realizate pe trei serii de pulberi ceramice, folosind diferite concentrații (0,125-5 mg/ml), în cinetici de 72 ore [12, 13]. Valorile medii ale celor trei măsurători au fost comparate cu valorile medii de control folosind testul Student, valorile cu semnificația statistică luate în considerare au fost cele pentru care  $p < 0,05$ .

## 2.5. Evaluarea biocompatibilității in vitro a compozitelor hibride COL/ $\beta$ -TCP

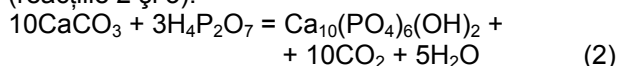
În structurile COL/ $\beta$ -TCP ( $5 \times 5 \times 3$  mm) au fost injectate fibroblaste dermale umane, (4-10 treceri), la densitatea celulară de  $1,5 \times 10^6$  și cultivate într-un mediu DMEM suplimentat cu 2mM L-glutamină, 1 % amestec antibiotic și 15 % ser fetal. Celulele au fost menținute în cultură la 37°C, cu 5%CO<sub>2</sub>, pentru perioade diferite de timp, și materialele compozite cultivate cu celulele au fost analizate ulterior prin microscopie optică. La 3 și respective 13 zile, structurile COL/-TCP au fost fixate în soluție Bouin și procesate pentru infiltrare cu parafină. Secțiuni de 15  $\mu$ m au fost colorate cu Haematoxylină Harris [14, 15]. O structură de collagen menținută în aceleași condiții a fost folosită drept control. Viabilitatea celulară a fost determinată cantitativ prin metoda MTT, descrisă anterior [11].

Culturi de celule, fără structuri de compozite, au fost folosite de asemenea drept control. Rezultatele au fost exprimate procentual și raportate la valorile de control, considerate 100%. Măsurătorile au fost realizate de trei ori.

## 3. Rezultate și discuții

### 3.1. Prepararea $\beta$ -TCP prin reacție în fază solidă

În primul rând ne-am propus să determinăm temperatura optimă de calcinare și în al doilea rând cinetica procesului de formare a fosfatului tricalcic. Din curbele DTA combinate cu difracția de raze X rezultă că temperatura optimă de calcinare este la 900°C. Uneori, difractogramele produselor calcinate prezintă existența, alături de compusul  $\beta$ -TCP, și a hidroxiapatitei, în cantitate foarte mică, indicând faptul că apa nu a fost eliminată în întregime până la această temperatură. Formarea acestui compus este posibilă ca urmare a reacției dintre CaCO<sub>3</sub> și H<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (format prin condensarea H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Prin creșterea în continuare a temperaturii de calcinare are loc transformarea HAP în TCP (reacțiile 2 și 3).



cytotoxicity measurements, performed on human lymphoblast cell cultures, determining the cell viability by Trypan blue method, and the proliferation rates by cell counting. The ceramic powders were tested in triplicates, using varying concentrations (0.125-5 mg/ml) in 72 h kinetics [12, 13]. Averages for the triplicates were compared to the control averages using a two tailed Student's T test, and statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

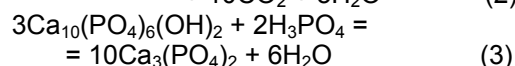
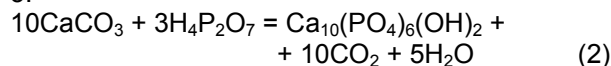
### 2.5. In vitro biocompatibility evaluation of COL/ $\beta$ -TCP scaffolds

Human dermal fibroblasts, from 4-10 passage, were injected into COL/ $\beta$ -TCP scaffolds ( $5 \times 5 \times 3$  mm), at a cell density of  $1.5 \times 10^6$  and cultivated in DMEM medium supplemented with 2mM L-glutamine, 1 % antibiotic mixture, 15 % fetal calf serum. The cells were maintained in culture, at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> for different periods of time and samples of the composite materials seeded with cells were subsequently analyzed by light microscopy. At 3 and 13 days, respectively, the COL/-TCP scaffolds were fixed in Bouin solution and processed for paraffin inclusion. Sections of 15  $\mu$ m were stained with Harris's Haematoxylin [14, 15]. A collagen scaffold maintained in the same conditions was used as control. Cell viability was quantitatively determined by the MTT method, as described elsewhere [11]. Cells cultured without scaffolds were used as a control. The results were expressed as percentage, with the control value set at 100 %. The experiments were performed in triplicate.

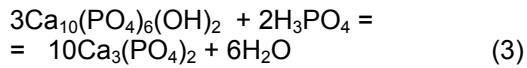
## 3. Results and discussion

### 3.1. Preparation of $\beta$ -TCP by solid state reaction

On one hand it was finding out the intended to determine the optimal calcinations temperature and on the other hand the kinetics the process of the tricalcium phosphate. From the curves DTA combined with the X-ray diffraction results that the 900°C is optimal temperature of calcinations. Sometimes, XRD on the calcined products showed the existence of a small amount of HAP (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) in addition to Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, indicating that water was not exhausted entirely up to this temperature. The formation of this compound is possible as a result of reaction between CaCO<sub>3</sub> and H<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (formed by condensation of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), reactin 2. By further increasing the calcination temperature, HA transformed into  $\beta$ -TCP, according to the reaction 3:



The patterns show an excellent agreement



Diagramele de difracție de raze X pentru compusul beta-TCP sunt în conformitate cu cele publicate în lucrările JCPDS (9-169). Termograma pentru compusul beta-TCP arată evoluția endotermică continuă și patru puncte termice distincte pe parcursul reacției dintre  $\text{CaCO}_3$  și  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , de la temperatura camerei la  $950^\circ\text{C}$ . Reacția în faza solidă dintre  $\text{CaCO}_3$  și  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pentru raportul molar Ca/P de 3/2, cu formarea fosfatului tricalcic, poate suferi o procedură complexă [16]. Spectrul infraroșu pentru beta fosfatul tricalcic prezintă benzi de absorbție, specifice grupării  $\text{PO}_4$ , la 551, 609, 971, și respectiv la 1045 și  $1122\text{ cm}^{-1}$ , specifice compusului  $\beta$ -TCP [16].

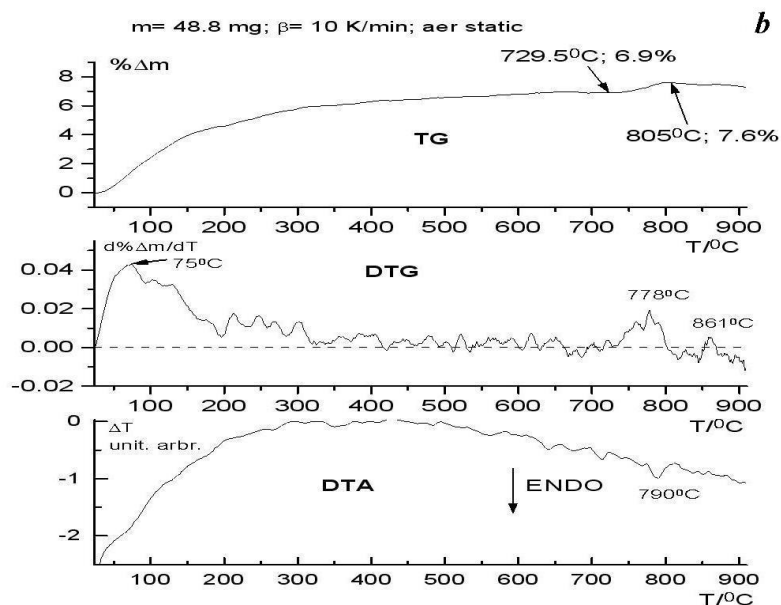
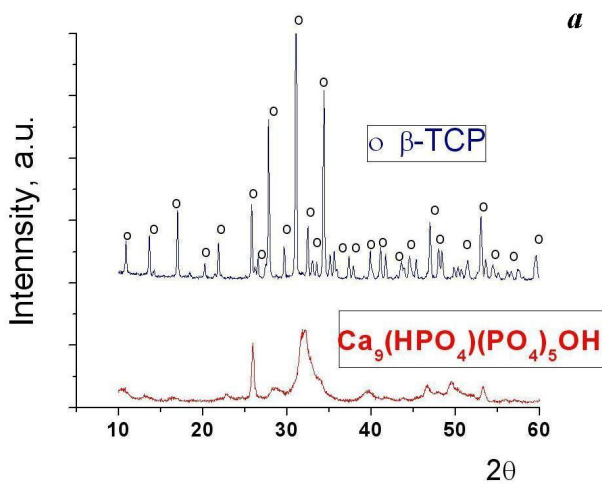


Fig. 1. (a) Spectrul de difracție pentru precursor și compusul  $\beta$ -TCP calcinat la  $800^\circ\text{C}$ ; (b) Curbele TG/DTG/DTA pentru compusul  $\beta$ -TCP / (a) The X-ray diffraction patterns for formed precursor and  $\beta$ -TCP compound calcined at  $800^\circ\text{C}$ , (b) the TG/DTG/DTA curves of the  $\beta$ -TCP compounds.

with the published JCPDS files for beta-TCP. The thermogram of TCP, shows a continuously endothermic evolution and four distinct thermal events during the reaction of  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , from room temperature to  $900^\circ\text{C}$ . The solid state reaction between  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , mixed in a Ca/P molar ratio of 3/2 to form TCP, may suffer a complex procedure. Experimental details were presented in [16]. The infrared spectrum for beta-tricalcium phosphate compound sintered at  $1100^\circ\text{C}$  shows absorption bands specifically for  $\text{PO}_4$  group at 551, 609, 1045 and respectively at  $1122\text{ cm}^{-1}$  [16].

### 3.2. Preparation of low-temperature $\beta$ -TCP

From this methods, in the first stage intermediary precursor was obtained, characteristics picks are calcium-deficient apatite- $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ , in accordance with ASTM 46-0905 files. Initial XRD analysis of samples calcined at  $800^\circ\text{C}$  indicated the transformation from apatite tricalcium phosphate to  $\beta$ -TCP, like unique phase, figure 1a. Differential thermal analysis (DTA) data showing in figure 1b, indicate an endothermic peak at  $\sim 790^\circ\text{C}$ , corresponding to the transformation from precursor to  $\beta$ -TCP, in correlation with X-ray diffraction measurements.

However, it is important to know and to control the phase evolution during process for optimizing the process to obtain  $\beta$ -TCP compound. It is well known that the precipitation process has a high number of variables that influence chemical equilibrium and physical nature of precipitates: stoichiometry, temperatures, stirring time, pH and thermal treatment.

### 3.2. Prepararea $\beta$ -TCP de temperatură joasă

Prin această metodă, într-o primă etapă se obține un compus intermediar nestoechiometric, denumit și hidroxiapatită deficitară, cu formula  $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ , picurile caracteristice fiind în concordanță cu fișele ASTM 46-0905.

Analizele inițiale de difracție de raze X pe probele calcinate la  $800^\circ\text{C}$  au indicat formarea compusului fosfat tricalcic, variația polimorfică de temperatură joasă beta, ca fază unică (fig. 1a).

Datele de analiză termică diferențială (DTA) prezentate în figura 1b, indică prezența unui pic endotermic la  $790^\circ\text{C}$ , corespunzător procesului de transformare a precursorului în  $\beta$ -TCP. Fenomenul este pus în evidență inclusiv prin măsurători DRX.

Cu toate acestea, pentru optimizarea procesului este important de știut și controlat întregul proces de formare a compusului. Procesul de precipitare are un număr mare de variabile care influențează echilibrul chimic și natura fizică a precipitatului: stoechiometria, timpul de agitare, pH și ulterior tratamentul termic. Parametrii celulei de rețea și valorile dimensiunilor medii de cristalit pentru cele două tipuri de pulberi de  $\beta$ -TCP, comparativ cu fișele ASTM sunt listate în tabelul 1

Din acest motiv, se poate considera că, folosirea nanopulberii de fosfat tricalcic în locul celor elaborate convențional, poate reprezenta o soluție favorabilă în procesul de formare a osului, în principal datorită suprafeței specifice superioare a pulberii, favorabilă creșterii celulare, dar și a interacției celule-matrice și respectiv a procesului de formare a țesutului osos.

The unit cell parameters and average crystallite size values for the two sorts of  $\beta$ -TCP powders, comparatively with ASTM Files are listed in table1.

For this reason, one may consider the use of beta-tricalcium phosphate nano-powder in place of conventional ones, a solution for favourable conditions in bone formation process, due to its superior surface properties favourable for cell growth, cell-matrix interaction and tissue formation, respectively.

### 3.3. COL/ $\beta$ -TCP scaffold preparation and characterization

Composite materials were prepared as sponges, by freeze-drying of two mixtures of COL/ $\beta$ -TCP, in different weight ratios, 1:1 for sample P1 and 1:2 for sample P2. Macroscopically, both types of scaffolds were similar to the control, having a microporous structure; the composite sponges had a honeycomb structure, with pores of several microns in diameter; the amount of  $\beta$ -TCP deposits on the collagen surface was higher for the P2 sample than in P1 sample, figure 2.

The tight bonding formation could be due to the reaction between Ca ions in the particles and carboxyl groups in collagen polypeptide chains. The tight bonding between  $\beta$ -TCP particles and collagen fibrils in the composites demonstrated an integrated structure, which was reproducible when  $\beta$ -TCP/collagen ratio ranged from 1 to 2. Such integrated structure would make

Tabelul 1

Parametrii celulei elementare și valorile dimensiunilor medii de cristalit pentru  $\beta$ -TCP  
The unit cell parameters and average crystallite size values for  $\beta$ -TCP compounds

Componentul / Compound	a (Å)	c (Å)	V(Å)	D(nm)
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cf. ASTM 09-169	10.429	37.380	3476.08	
$\beta$ -TCP convențional / Conventional $\beta$ -TCP	10.436	37.379	3525.55	$\leq 5\mu\text{m}$
$\beta$ -TCP de temperatură joasă / $\beta$ -TCP nano-powder	10.419	37.307	3483.55	$\leq 84\text{nm}$

### 3.3. Prepararea și caracterizarea structurii poroase COL/ $\beta$ -TCP

Compozitele ceramice sub formă de bureți au fost elaborate prin tehnica "freeze-drying". Au fost preparate două tipuri de compozite COL/ $\beta$ -TCP cu rapoarte masice diferite, 1:1 pentru proba P1 și 1:2 pentru proba P2.

La controlul microscopic ambele tipuri de structuri au fost similare cu proba control, prezentând o structură microporoasă tip fagure, cu diametrul porilor de ordinul micronilor. Cantitatea de material ceramic depus pe suprafața fibrelor de collagen a fost mai mare în cazul compozitelor P2 comparativ cu probele P1, (fig. 2).

Tăria legăturii formate poate fi dată de reacția dintre ionii de calciu (din materialul ceramic) și grupările carboxil din lanțurile polipeptidice din collagen, și demonstrează obținerea unor structuri

significant contributions in reliably tailoring properties of the porous composites by varying  $\beta$ -TCP content.

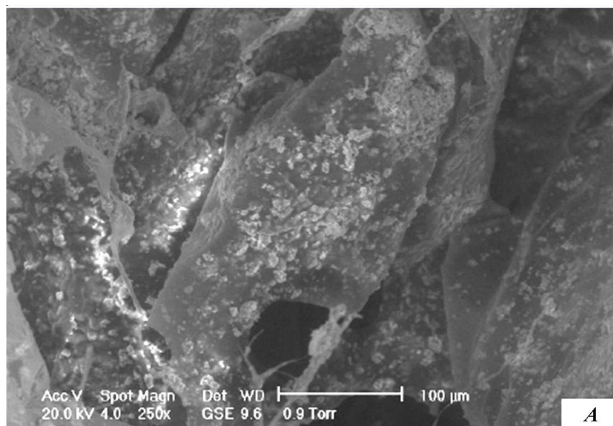
The optimal scaffold design and fabrication techniques must be able to create porous structures adequate to attaining the desired mechanical function and mass transport properties (permeability and diffusion properties).

### 3.4. Biocompatibility evaluation of $\beta$ -TCP powders

The biocompatibility was determined by cellular behaviour occurring in the presence of biomaterials. In our experiments, the cell viability and cell proliferation were assessed.

Cytotoxicity tests showed that the ceramic material not only did not induced cell toxicity and inhibit cell proliferation, but at high concentration

integrate ce pot fi reproductibile când raportul  $\beta$ -TCP/COL este în domeniul 1 până la 2. Astfel de structuri integrate pot juca un important rol în proiectarea unor compozite poroase cu proprietăți definite prin modificarea conținutului de fază ceramică,  $\beta$ -TCP.



(>1 mg/ml) induced a slight increase in the proliferation rate. Cell proliferation was not inhibited even after 72 h and at highest concentration used, 5 mg/ml. These observations indicate that the ceramic material is not toxic for human cells when tested in the 0.125-5 mg/ml range, figure 3.



Fig.2 - Nanocompozite poroase (bureți) din TCP/Colagen, alcătuite dintr-o rețea de fibre de colagen pe suprafața cărora sunt depuse particule ceramice de  $\beta$ -TCP; A – pentru probele P1; B – pentru probele P2 / *Porous samples (sponges) from TCP/Collagen nanocomposites showing the composite body consisting of collagen fibrous bundles with  $\beta$ -TCP deposits on the collagen surface; A – P1 sample; B – P2 sample.*

Design-ul optim al structurii și tehnicile de fabricare trebuie să fie capabile să creeze structuri poroase adecvate pentru a atinge funcțiile mecanice dorite dar și proprietăți de transport masic (proprietăți de permeabilitate și difuzie).

### 3.4. Evaluarea biocompatibilității pulberilor de $\beta$ -TCP

Biocompatibilitatea a fost determinată de evaluarea comportării unui mediu de celule în prezența biomaterialelor. În experimentele noastre au fost evaluate viabilitatea și proliferarea celulară. Testele de citotoxicitate arată că materialul ceramic nu numai că nu induce toxicitatea celulară și nu inhibă proliferarea celulară, dar la concentrație mare (>1 mg/ml) induce o mică creștere a ratei de proliferare. Proliferarea celulară nu a fost inhibată decât după 72h și la o concentrație mare, 5 mg/ml.

For beta-TCP nanopowders none of the concentrations (range 0.005-5 mg/ml) did not determine an increase in cell mortality or a decrease in cell proliferation compared to control cells. Proliferation rates were significantly higher in cell cultures with high concentrations of ceramic nanopowders after 72 h of culture, figure 4. The lack of cell mortality associated with nanopowders is indicative for a good biological compatibility, while the increase in cell proliferation suggests that the ceramic nanopowders might stimulate cell mechanisms that require further evaluations.

### 3.5. Biocompatibility evaluation of COL/ $\beta$ -TCP scaffolds

The data demonstrated that the presence of the composite samples COL/ $\beta$ -TCP (P1 and P2) in the dermal fibroblast culture was not a stress

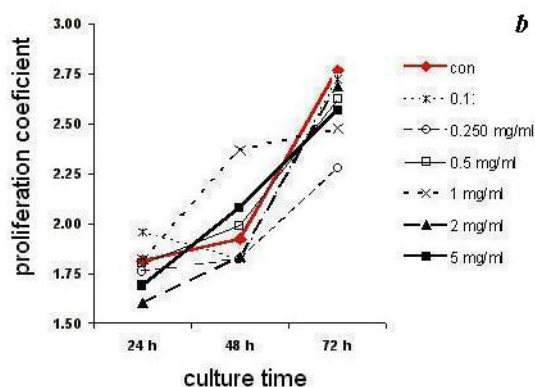
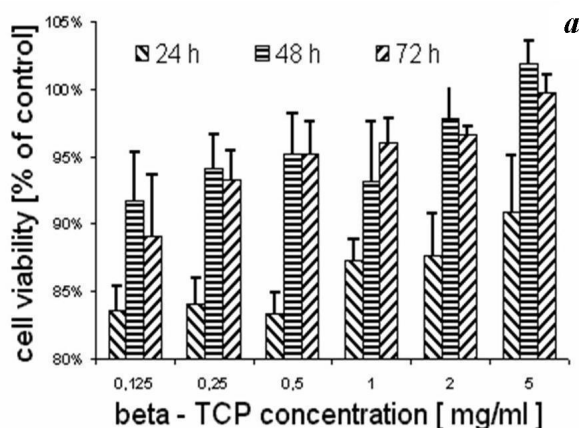


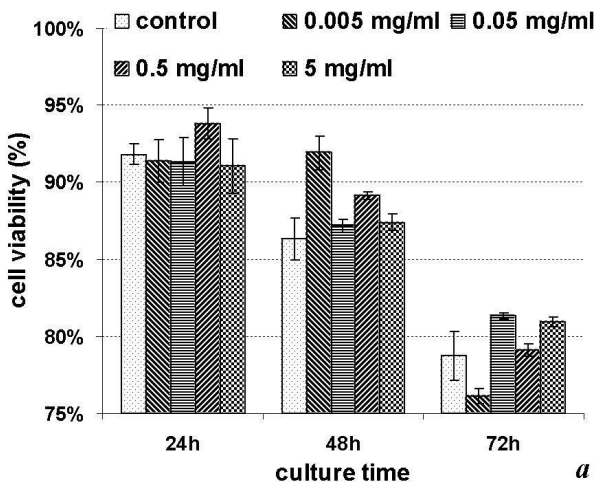
Fig. 3 - Cinetica viabilității celulare (a) și respectiv, a proliferării celulare (b) pentru  $\beta$ -TCP microcristalin / *Kinetic of cell viability (a), and proliferation (b) for conventional beta  $\beta$ -TCP powder.*

Aceste observații indică faptul că materialul ceramic testat în intervalul de concentrații 0,125-5 mg/ml nu este toxic pentru celulele de origine umană (fig. 3).

Pentru nanopulberile ceramice de  $\beta$ -TCP nu s-a determinat o creștere a mortalității celulare sau o reducere a proliferării celulare pentru întreg domeniul de concentrații testat (0,005-5 mg/ml), comparativ și cu lotul control. Rata de proliferare a fost semnificativ mai mare în culturile celulare cu concentrații mai mari de nanopulberi după 72h de cultură. Lipsa mortalității celulare asociată cu nanopulberile de  $\beta$ -TCP indică o compatibilitate biologică bună, în timp ce creșterea proliferării sugerează faptul că nanopulberile ceramice ar putea stimula mecanismele celulare, necesitând investigații suplimentare, figura 4.

### 3.5. Evaluarea biocompatibilității compozitelor COL/ $\beta$ -TCP

Datele experimentale demonstrează faptul că prezența probelor compozite de COL/ $\beta$ -TCP (P1 și P2) în culturile de celule nu a constituit un factor de stres pentru acestea, celulele s-au dezvoltat favorabil păstrându-și morfologia normală. După 24 ore viabilitatea celulelor a fost de 95 % pentru P1 și 97 % pentru P2. După 72 ore procentul de celule viabile a fost de 96% pentru P1 și respectiv 98%



factor; the cells exhibited a favorable development, maintaining their normal morphology. After 24 hours, the cell viability was 95 % for P1, and 97 % for P2. After 72 hours, the percent of viable cells was 96 % for P1 and 98 % for P2, figure 5. The cell proliferation was superior in P1 and P2 sponges compared to the control (type I collagen sponge) at both periods of time. These results confirm the low cytotoxicity of the tested scaffolds and were in agreement with histological evaluation [17].

### 4. Conclusions

The bioresorption properties of  $\beta$ -TCP are well correlated with the microstructure. For this reason, one may consider the use of beta-tricalcium phosphate nanopowder in place of conventional ones, a solution for favourable conditions in bone formation process. Our study established a method to synthesize two variants of composite materials, with a COL/ $\beta$ -TCP weight ratio of 1:1 and 1:2, respectively. Both variants of composites (P1 and P2) discussed in this paper exhibited good cellular proliferation and attachment into the sponges. In conclusion, association of COL with  $\beta$ -TCP allows obtaining stable hybrid composites which prevented  $\beta$ -TCP

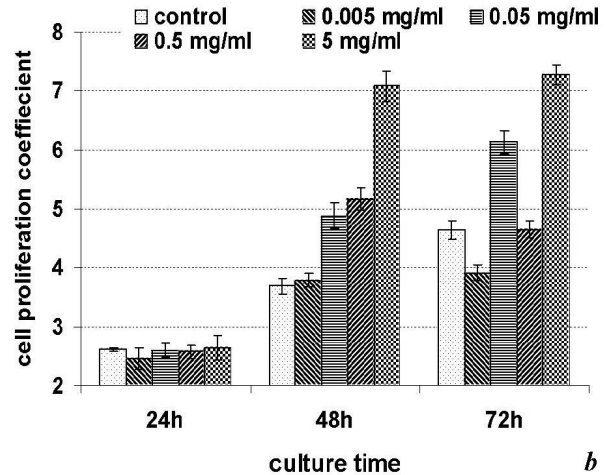


Fig. 4 - Cinetica viabilității celulare (a) și proliferarea celulară (b) pentru nano-pulberia de  $\beta$ -TCP / Kinetic of cell viability (a) and proliferation (b) for low temperature beta  $\beta$ -TCP powder.

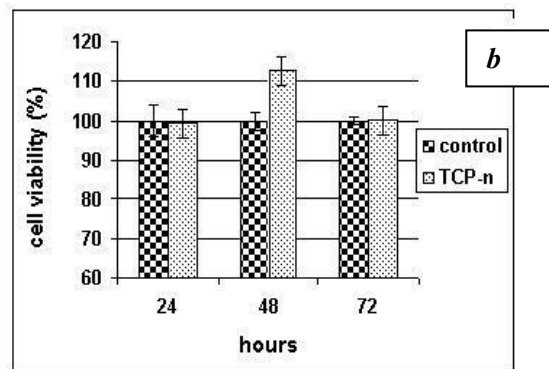
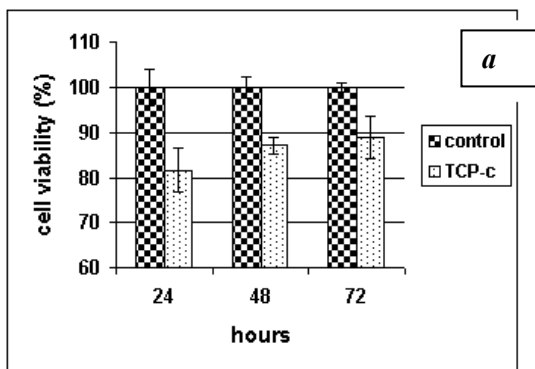


Fig. 5 - Diagrama viabilității celulare în cazul cultivării fibroblastelor în prezența structurilor de COL/ $\beta$ -TCP, pentru pulberile micronice (a) și nanopulberile de  $\beta$ -TCP (b) / Diagram of cell viability in the case of fibroblasts cultivation in the presence of COL/ $\beta$ -TCP scaffolds, for conventional (a) and  $\beta$ -TCP nanopowders (b).



pentru P2. Pentru aceeași perioadă de timp proliferarea celulară a fost superioară în bureții P1 și P2 comparativ cu lotul control (burete collagen de tip I), figura 5. Aceste rezultate confirmă citotoxicitatea scăzută a structurilor testate și au fost în concordanță și cu evaluarea histologică [17].

#### 4. Concluzii

Proprietățile de bioresorbție ale  $\beta$ -TCP sunt bine corelate cu microstructura. Din acest motiv, se poate considera faptul că, folosirea nanopulberii de fosfat tricalcic în locul celor elaborate convențional (micrometrice), poate reprezenta o soluție favorabilă în procesul de formare a osului. Prin acest studiu s-a stabilit o metodă de sinteză pentru cele două variante de compozite hibride COL/ $\beta$ -TCP, cu un raport masic 1:1 și respectiv 1:2. Ambele variante de compozite (notate P1 și P2) prezentate în lucrare demonstrează o bună proliferare celulară, cât și o atașare bună a celulelor în interiorul structurilor. În concluzie, s-a demonstrat că asocierea COL cu  $\beta$ -TCP permite obținerea de compozite hibride stabile, prevenind dispersia pulberii ceramice în mediul de lucru, rezultând un biomaterial ușor de fasonat ce poate fi utilizat ca o structură cu porozitate controlată, pentru migrarea și proliferarea celulară.

#### Notă

Această lucrare a fost finanțată din proiectul Nr. 61012/2007, prin Programul Național de Cercetare, „Parteneriate în Domenii Strategice”, Subprogramul 4.

#### REFERENCES

1. D. Gotor and J.T. Czernuszka, "Mineralization and cross-Linking Techniques to Improve the Mechanical Properties of Collagen-Calcium Phosphate Composites to be used as Bone Analogues", *Eur. Cell Mater.*, 2004, **7**(1), 55.
2. D.W. Sommerfeldt, and C.T. Rubin, *Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton*. *Eur. Spine J.*, 2001, **10**, 86.
3. Y. Shikinami, K. Okazaki, M. Saito, M. Okuno, S. Hasegawa, et al., Bioactive and bioresorbable cellular cubic-composite scaffolds for use in bone reconstruction, *J. R. Soc. Interface* 2006, **3**, 805.
4. M. Saito, H. Shimizu, M. Beppu, and M. Takagi, The role of  $\beta$ -tricalcium phosphate in vascularized periosteum, *J. Orthop. Sci.*, 2000, **5**, 275.

dispersion in media, resulting in an easily moulded biomaterial that could be used as scaffolds, with controlled porosity, for cell migration and proliferation.

#### Acknowledgement.

*This work was supported by Project No. 61012/2007, from Romanian Research Programme 4 "Partnership in Strategic Domains".*

\*\*\*\*\*

5. D. Tadic, M. and Epple, A thorough physicochemical characterisation of 14 calciumphosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomaterials*, 2003, **25**, 987.
6. M. Preda, A. Melinescu, I. Teoreanu, R. Trușcă, and G. Cotigă, Alternating routes for hydroxyapatite synthesis, *Romanian Journal of Materials* 2006, **36**(2), 81.
7. A.R. Vaccaro, The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft, *Orthopedics*, 2002, **25** (5), 571.
8. I.R. Zerbo et al., Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases. *Clin Oral Implants Res.*, 2001, **12**, 379.
9. Z. Artzi et al., Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2004, **19**, 357.
10. Kuo-Yu Chen, Pei-Chi Shyu, Guo-Chung Dong, Yueh-Sheng Chen, Wei-Wen Kuo and Chun-Hsu Yao, Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite, *Biomaterials*, March 2009, **30** (9), 1682.
11. E.I. Oprea, L. Moldovan, O. Crăciunescu, W. Buzgariu, Ch. Țârdei and O. Zărnescu, "A bioactive collagen- $\beta$  tricalcium phosphate scaffold for tissue engineering", *Central European Journal of Biology*, 2006, **1**, 61.
12. H. Zeng et al., The experimental study on mixed culture of osteoblasts and tricalcium phosphate ceramics in vitro. *J Tongji Med Univ.* 1999, **19**, 131.
13. B. Aybar et al., Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Implants Res.* 2004, **15**, 119.
14. G. Saraswathy, T. P. Sastry, S. Pal1, M. Sreenu, and R. V. S. Kuma, A new bio-inorganic composite as bone grafting material: in vivo study, *Trends Biomater. Artif. Organs*. 2004, **17** (2), 37.
15. Chao Zou, Wenjian Weng, Xuliang Deng, Kui Cheng, Xinggang Liu, et al., Preparation and characterization of porous b-tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure, *Biomaterials* 2005, **26**, 5276.
16. Ch. Țârdei, F. Grigore, I. Pașuk, and S. Stoleriu, "The Study of  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  Substitution of  $\beta$ -Tricalcium phosphate", *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2006, **8** (2), 568.
17. O. Crăciunescu, C.Țârdei, and L.Moldovan, Nano- $\beta$ -tricalcium phosphate/collagen materials with improved biostability for bone replacement applications, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 2009, Volume 7297, Article number 72971B.

\*\*\*\*\*