

# ELABORAREA, CARACTERIZAREA ȘI EVALUAREA BIOLOGICĂ A GRANULELOR DE FOSFAT TRICALCIC

## PREPARATION, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL EVALUATION OF TRICALCIUM PHOSPHATE GRANULES

FLORENTINA GRIGORE<sup>1\*</sup>, MAGDALENA LUNGU<sup>1</sup>, DIANA SAVU<sup>2</sup>, MIHAI RADU<sup>2</sup>, GEORGETA VELCIU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Inginerie Electrică, INC DIE ICPE-CA, Splaiul Unirii Nr.313, Sector 3, București, România.

<sup>2</sup>Institutul Național de C-D pentru Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei, IFIN –HH, Str. Atomistilor 407, Măgurele, Ilfov, România

*Fosfatul tricalcic datorită biocompatibilității și biodegradabilității sale excelente a primit o atenție specială ca material de grefare pentru regenerarea osoasă. În această lucrare s-au preparat granule din  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  care au fost testate din punctul de vedere al biocompatibilității. În primul rând, s-au obținut materialele ceramice utilizând tehnica spumei poliuretanică plecând de la pulberi ultrafine de  $\beta\text{-TCP}$  obținute în laboratorul nostru și spuma poliuretanică produsă de S.C Poliflex. În al doilea rând, pentru a obține granule, spuma ceramică a fost granulată într-o sită cu dimensiunea ochiurilor cuprinsă în intervalul 500-1000 $\mu\text{m}$ . Compoziția chimică și morfologia au fost investigate utilizând difracția de raze X (DRX) și microscopia optică (MO). Caracteristicile suspensiei ceramice au fost determinate cu ajutorul aparatului ZetaPlus Brookhaven. Biocompatibilitatea produsului granular a fost analizată prin evaluarea efectului citotoxic utilizând metoda de difuzie în agar.*

*Tricalcium phosphate has received a special attention as graft for bone regeneration due to its excellent biocompatibility and biodegradability. In this paper, we prepared  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  granules that were tested in terms of biocompatibility. Firstly, we obtained the ceramic materials by polymeric sponge technique starting from ultrafine powders of  $\beta\text{-TCP}$  obtained in our laboratory and polyurethanes sponge from S.C Poliflex. Secondly, the ceramic foam was grained through a sieve with mesh sizes ranging between 500-1000  $\mu\text{m}$  to obtain the grains. The chemical composition and morphology were investigated using X-ray diffraction analysis (XRD) and optical microscopy (OP). The characteristics of the ceramic slurries were determined with the ZetaPlus Brookhaven device. The biocompatibility of the product was analyzed by evaluation of the cytotoxic effects, using the agar diffusion method.*

**Keywords:** tricalcium phosphate granules, ceramic suspensions, biocompatibility

### 1. Introducere

Compușii din fosfați de calciu au importanță în domeniul biomaterialelor datorită răspunsului lor pozitiv la testările biologice (in vitro și in vivo): bioactivitatea, biocompatibilitatea și osteoconductivitatea [1-5].

Hidroxiapatita (HAP), fosfatul tricalcic ( $\beta\text{-TCP}$ ), și combinațiile lor (HAP/TCP) sunt printre cei mai investigați fosfați de calciu pentru aplicații medicale.

Fosfatul tricalcic  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  este cel mai important material biodegradabil ceramic deoarece prezintă proprietatea de osteosinteză. De asemenea, cercetările întreprinse în ultimii ani au demonstrat că este atât o ceramică osteoconductivă cât și bioresorbabilă, motiv pentru care este intens utilizat în domeniul clinic precum: chirurgia ortopedică, stomatologie și inginerie tisulară [1-3,6-10].

Aceste ceramici pot fi utilizate sub formă de pulberi, granule, structuri dense și poroase.

În acest studiu, pentru a obține granule de  $\beta\text{-TCP}$ , s-a utilizat tehnica replicării spumei polimerice.

Această tehnică constă în introducerea spumei poliuretanică (PU) într-o suspensie ceramică. După eliminarea suspensiei în exces, sistemul PU/suspensie este ars rezultând structura ceramică

### 1. Introduction

Calcium phosphate compounds have importance in the field of biomaterials due to their positive „in vitro” and „in vivo” responses: bioactivity, biocompatibility and osteoconductivity [1-5].

Calcium hydroxyapatite (HAP), tricalcium phosphate ( $\beta\text{-TCP}$ ) and combinations of the two (HAP/TCP), are the more commonly investigated calcium phosphates for biomedical applications. Tricalcium phosphate  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  is the most important biodegradable ceramic material because it presents the property of osteosynthesis. Also, the studies made in the last years, have demonstrated that is an osteoconductive as well as bioresorbable ceramic, so it is extensively used in areas such as: orthopedic surgery, stomatology surgery and tissue engineering [1-3, 6-10]. This ceramics may be used in powders, granular, dense or porous form.

In this study, in order to obtain  $\beta\text{-TCP}$  granules, we used the polymeric sponge technique.

This technique involves inserting of the polyurethane (PU) foams into ceramic slurry. After elimination of the excess slurry and drying, the PU-foams are burnt off and, after sintering, ceramic foams are obtained and graining through a sieve with mesh sizes ranging between 500-1000  $\mu\text{m}$ .

\* Autor corespondent/Corresponding author,  
Tel. +40213467231, e-mail: [flori.grigore@icpe-ca.ro](mailto:flori.grigore@icpe-ca.ro)

care se granulează pe o sită cu dimensiunile ochiurilor cuprinse între 500-1000  $\mu\text{m}$ .

Proprietățile suspensiei ceramice sunt cruciale pentru caracteristicile spumei. În primul rând, conținutul de solid să fie ridicat, cu scopul de a reduce contracția în timpul arderii, o bună omogenitate și să fie stabile în timp.

Comportamentul suspensiei poate fi ajustat prin modificarea parametrilor de procesare cum ar fi: compoziția chimică a reactivilor, mărimea particulelor, adăugarea agenților de dispersie; funcția sistemului dispersant/solvent este în primul rând, pentru udarea suprafețelor, astfel încât forțele de atracție pot fi depășite și în al doilea rând, pentru a modifica proprietățile suprafeței astfel încât particulele nu se combină și nu se aglomerează [4,8,9,11].

Caracteristicile suspensiilor ceramice cum ar fi potențialul zeta și punctul iso-electric (PIE) au fost determinate cu aparatul ZetaPlus Brookhaven.

Compoziția chimică și morfologia au fost investigate prin difracție de raze X (DRX) și microscopie optică (MO). Biocompatibilitatea produsului s-a analizat prin evaluarea efectului citotoxic utilizând metode biochimice.

Lucrările viitoare se vor axa pe investigațiile „in vivo” a granulelor de  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

## 2. Experimentări

Materiile prime utilizate în această lucrare au fost: pulberi de  $\beta\text{-TCP}$  (obținute în laboratorul nostru), dispersanți (poliacrilat acid de sodiu și acid citric produse de Merck), liant (oxid de polietilenă) și spumă poliuretanică.

### 2.1 Prepararea suspensiei

În vederea obținerii unei suspensii stabile și omogene cu un conținut inițial de 75% solid au fost testați doi dispersanți: poli-acrilat acid de sodiu și acidul citric.

Prima etapă în elaborarea suspensiei a fost amestecarea mecanică a apei distilate cu dispersanții (1% din masa solidului). Apoi, pulberea a fost adăugată treptat pentru o perioadă de 5 minute pentru a prepara un sistem fluid necesar utilizării viitoare.

### 2.2. Prepararea granulelor de $\beta - \text{TCP}$

Pentru prepararea granulelor din  $\beta - \text{TCP}$  s-a utilizat tehnica spumei poliuretanică. Această tehnică a constat în imersarea unui burete polimeric în suspensie ceramică, eliminarea excesului și uscarea structurii infiltrate. Uscarea s-a realizat la aer pentru 48 de ore. Structura uscată a fost încălzită la 1000°C, în aer pentru a elimina buretele polimeric.

Descompunerea poliuretanului s-a realizat la temperatură mică, cu viteză scăzută în așa fel încât nici un stres să nu fie indus în structura nesinterizată a structurii ceramice. Buretele a fost total descompus

The properties of the ceramic slurries are crucial for the characteristics of the foams. Firstly, they should have high content of solids, in order to reduce the shrinkage during firing, good homogeneity and must be stable in time.

The suspensions behavior can be adjusted by modifying different processing parameters, such as the chemical composition of the reagents, the particle size, and the addition of dispersing agents; the function of dispersant/solvent systems is, first, to wet the surfaces so that attractive forces can be overcome and, second, to modify the surfaces properties so that the particles will not recombine or flocculate [4,8,9,11].

The characteristics of the ceramic slurries such as zeta potential and iso-electric point (IEP) were determined with the ZetaPlus Brookhaven type. The chemical composition and morphology were investigated using X-ray diffraction analysis (XRD) and optical microscopy (OP). The biocompatibility of the product was analyzed by evaluation of the cytotoxic effects, using a biochemical method.

Future works will focus on “in vivo” investigation of the  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  granules.

## 2. Experiments

The starting materials used in this study were: beta-TCP powders obtained in our laboratory, dispersing agents (sodium polyacrylic acid and citric acid made by Merck), binder (polyethylene oxide) and polyurethane sponges.

### 2.1 Preparation of the suspension

In order to obtain stable and homogenous suspensions with an initial solid content of 75wt.%, two dispersants were tested: sodium polyacrylic acid and citric acid.

The first stage in the suspension elaboration was the mechanical mixing of distilled water and dispersants (1 wt.% based on dry solid mass). Then the powder was progressively added for a time period of 5 minutes to prepare a fluid system necessary to further utilization.

### 2.2. Preparation of the $\beta\text{-TCP}$ granules

For obtaining the  $\beta\text{-TCP}$  granules we used polymeric sponge technique. This technique consisted in immersion of the polymer sponge in ceramic suspension, removing the excess slurry and drying of the infiltrated structure. The drying was performed in air for 48 h. The dry structure was heated at 1000°C in air to volatilize the polymeric sponge.

The decomposition of the polymeric sponge was realized at low temperature, with a low rate, so that it is not induced any stress in the unsintered ceramic structure. The sponge was totally decomposed at around 600°C.

In order to obtain granules, the ceramic foam was grained through a sieve with mesh sizes

la o temperatură de aproximativ 600°C.

În vederea obținerii granulelor, spuma ceramică a fost granulată pe o sită cu dimensiunea ochiurilor aflate în intervalul 500-1000µm.

### 2.3. Testarea "in vitro" a citotoxicității

Testele de citotoxicitate au fost efectuate în conformitate cu standardul SN ISO 10993 (1).

**Condiții de cultură.** Celulele din linia celulară L929 de fibroblaști de șoarece (Sigma) au fost cultivate în mediu de cultură esențial (MEM Biochrom) suplimentat cu 10 % ser fetal bovin, penicilină/streptomycină (Biochrom), L-glutamină (Biochrom). Culturile celulare au fost menținute în incubator (REVCO) într-o atmosferă de 5% CO<sub>2</sub> și o temperatură de 37°C.

**Prepararea extractelor.** Înainte de a fi supus procedurii de extracție, materialul ceramic a fost sterilizat prin iradiere gama cu o doză de 25 kGy. Extractele pentru testele de citotoxicitate au fost obținute din probă în conformitate cu standardul SR EN ISO 10993-5 și SR EN ISO 10993-12. Pulberea de β-TCP a fost imersată în mediu de cultură complet pentru o perioadă de 24 h, la o temperatură de 37°C, fără agitație, cu un raport de extracție greutate-volum de 3 cm<sup>2</sup>/ml. Culturilor de celule li s-au aplicat atât extractul pur cât și diluții ale acestuia de 1/2, 1/5 și 1/10. Ca probă de control negativ a fost utilizat mediu de cultură esențial MEM fără ser, iar ca și control pozitiv s-a utilizat o soluție apoasă de 0,45 % fenol.

**Metoda de difuzie în agar.** Testarea s-a făcut în vase petri de 35 mm în diametru. S-a adăugat fiecărui vas de cultură o suspensie celulară pentru a se asigura o concentrație de celule de 1,5 x 10<sup>5</sup> celule/vas de cultură. Celulele se incubează timp de 24 h pentru a obține un monostrat celular subconfluent. După incubare, monostratul celular se acoperă cu un strat de agar nutritiv de 0,5 % (Sigma). După gelificarea agarozei, s-au plasat în contact cu agarul, discuri sterile Millipore îmbibate cu probele și controalele de testat și s-au incubat timp de 24 h. Apoi, s-au îndepărtat mostrele și s-a adăugat fiecărui vas soluție 0,01% de roșu neutru și s-a incubat 30 min la 37°C. După îndepărtarea colorantului, fiecare cultură s-a analizat microscopic. Observarea celulelor s-a făcut în 15 zone delimitate de caroiajul de pe fundul vaselor de cultură. Procentul de celule necolorate (lizate) s-a calculat prin împărțirea numărului de celule necolorate la numărul total de celule observate (colorate și necolorate).

## 3. Rezultate

### 3.1. Caracterizarea suspensiei ceramice

Dispersibilitatea pulberii de β-TCP în apă distilată, a fost evaluată printr-un simplu experiment de sedimentare, utilizând în suspensie 20% solid (4 g în 20 cm<sup>3</sup> apă distilată) într-un

ranging between 500-1000 µm.

### 2.3. In vitro cytotoxicity testing

The cytotoxicity tests were performed by according to SN ISO 10993 (1).

**Culture conditions.** Mouse fibroblast L929 cell line (Sigma) were cultured in minimal essential medium (MEM Biochrom) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Biochrom), penicillin/streptomycin (Biochrom), L-glutamine (Biochrom). Cultures were maintained in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C (REVCO incubator).

**Preparation of extracts.** Before extraction, the ceramic material was sterilized by gamma-irradiation with 25 KGy. Extracts for the cytotoxicity test have been obtained from material in accordance with SR EN ISO 10993-5 and SR EN ISO 10993-12 standards. The material were immersed in complete culture medium for 24 h, at 37°C without agitation, with a weight-volume ratio of 3 cm<sup>2</sup>/ml. The pure extract and the 1/2, 1/5 and 1/10 dilutions were added to the cells. Minimal essential medium MEM without serum was used as negative control and a solution of 0.45 % phenol was used as positive control.

**Agar diffusion method.** A monolayer of L929 cells (1.5 x 10<sup>5</sup> cells/dish) was grown in 35 mm petri dishes for 24 h. The monolayer was then overlaid by a 0.5 % agarose-nutrient layer (Sigma). A volume of 1 ml of agarose was used for each dish. After gelation of the agarose layer, sterile Millipore discs (10 mm in diameters) soaked with samples and controls were added on top of the layer and incubated for 24 h. Then the discs were removed and the agarose layer was covered by 1 ml of 0.01 % neutral red solution and incubated at 37°C for 30 min. The neutral reds were aspirated and the cell coloration was microscopically assessed. Measurements were performed with the use of a 40X objective magnification. For analysis, the 15 different fields were chosen on a straight line reaching from the left border through the center to the right border of petri dish. The percentage of avital (uncoloured) cells of each field was calculated by dividing the number of uncoloured cells by the total number of cells (colored plus uncoloured cells).

## 3. Results

### 3.1. Characterization of the ceramic suspensions

The dispersibility of the β-TCP powder in distilled water was evaluated firstly by simple sedimentation experiment, using 20 wt.% solid-loaded suspensions (4 g powder in 20 cm<sup>3</sup> deionized water) in the pH range of 7-12.

The particle-settling characteristics of a 20 wt.% slips left undisturbed for sediment in a

interval al pH cuprins între 7-12.

Caracteristicile de sedimentare ale suspensiilor cu 20 % solid, lăstate nemișcate în cilindri de sticlă au fost studiate măsurând înălțimea sedimentului în funcție de pH.

Înălțimea stratului de sediment după 24 ore, prezentat în figura 1, arată că pulberile de  $\beta$ -TCP din apa distilată s-au aglomerat. Volumul cel mai scăzut al sedimentării, care indică o stabilizare ridicată a soluției a fost obținută în cazul probelor realizate cu agenți de dispersie, la un pH de  $\sim 10$ .

Suspensiile conținând 0,02 % particule cu sau fără adaosuri (poliacrilat acid de sodiu și acid citric) au fost caracterizate cu aparatul ZetaPlus Brookhaven. Figura 2 prezintă curbele potențialului zeta funcție de pH, în cazul suspensiilor cu și fără agenți de dispersie (1% poliacrilat de sodiu și acid citric).

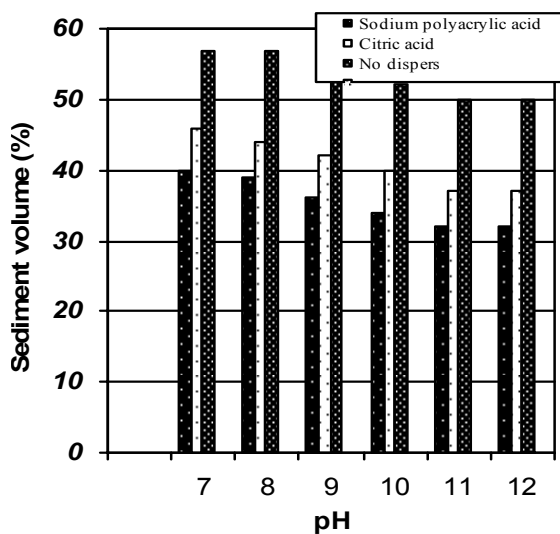


Fig.1 - Variația volumului de sediment cu pH-ul.  
Variation of sediment volume with pH level.

Punctul iso-electric (PIE), în absența dispersanților a fost găsit la  $\text{pH}=7,6$ . Adiția diferiților dispersanți crește valoarea negativă a potențialului zeta ceea ce conduce la o creștere a forțelor repulsive dintre particule.

### 3.2 Caracterizarea granulelor de $\beta$ -TCP

Microstructura granulelor a fost evaluată prin analiza imaginii optice (fig. 3). Observațiile de la microscopul optic relevă suprafețe neregulate și rugoase, fără incluziuni străine; dimensiunea granulelor de  $\beta$ -TCP (obținute în laboratorul nostru) după sinterizare se află în intervalul 500-1000  $\mu\text{m}$ .

Analizele de difracție de raze X (DRX) ale probelor tratate termic la 1000°C arată prezența compusului  $\beta$ -TCP ca fază unică în concordanță cu fișa JCPDS Nr. 09-0169.

### 3.3 Evaluarea biocompatibilității

Rezultatele obținute în urma testelor demonstrează faptul că produsul PG  $\beta$ -TCP (produs granular din beta-fosfat tricalcic) prezintă o bună biocompatibilitate.

glass cylinders were studied by measuring sedimentation heights as a function of pH.

The sedimentation heights after 24 h, shown in Figure 1, reveal that the  $\beta$ -TCP powder was highly flocculated in distilled water. The lowest sedimentation volume which indicates the highest stabilization was obtained at condition where  $\text{pH} \sim 10$  for samples made with dispersing agents.

The suspensions containing 0.02 wt.% particles without and with two dispersants (sodium polyacrylic acid and citric acid) was characterized with ZetaPlus Brookhaven device. Figure 2 shows the zeta potential curves of the suspensions as a function of pH, without and with dispersing agents (1% sodium polyacrylate acid and citric acid).

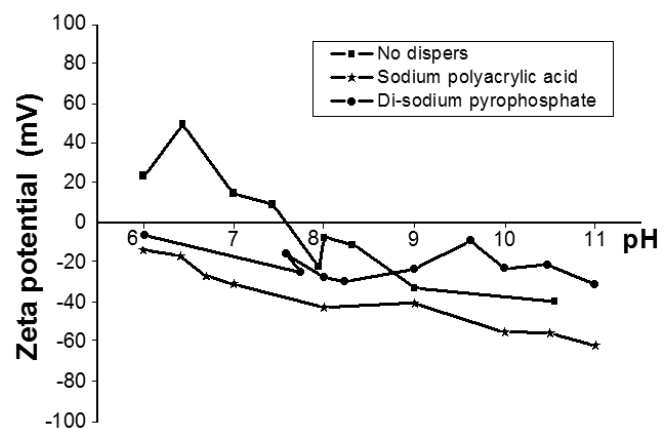


Fig. 2 - Curbele potențialului zeta pentru suspensii în prezența sau absența agenților de dispersie / The zeta potential curves for suspensions in the absence and presence of dispersing agents.

The iso-electric point (IEP), in absence of dispersants, was found at  $\text{pH}=7.6$ . The addition of the different dispersants increases the negative zeta potential values leading to an increase of the repulsive force among particles.

### 3.2 Characterization of the $\beta$ -TCP granules

The microstructure of granules was evaluated through analyzing of the optical images (Figure 3). Observation by optical microscopy reveals an irregular and rough surfaces, without foreign inclusions; the dimensions of the  $\beta$ -TCP granules (obtained in our laboratory) after sintering were in the range of 500-1000  $\mu\text{m}$ .

The X-ray diffraction analysis (XRD) of the samples heat treated at 1000°C showed the presence of the  $\beta$ -TCP as the unique phase in accordance with JCPDS file No. 09-0169.

### 3.3 Evaluation of the biocompatibility

Cytotoxicity assay results proved that the PG  $\beta$ -TCP (granular product based on beta-tricalcium phosphate) product has good biocompatibility.

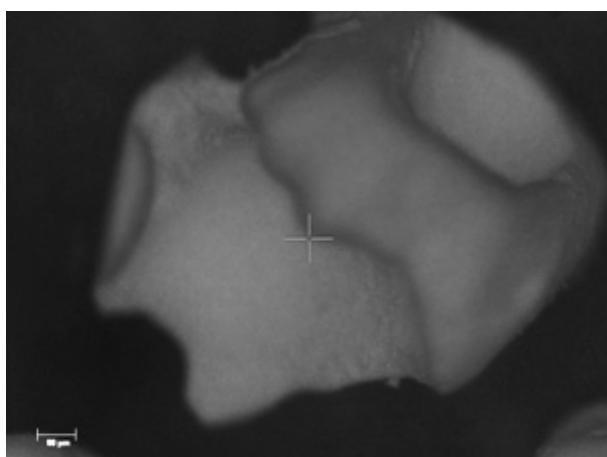
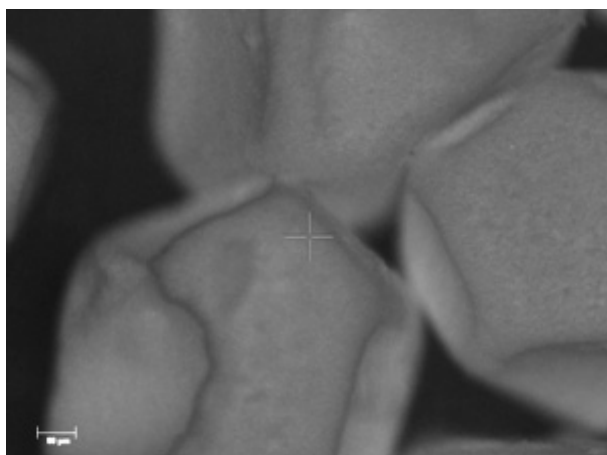


Fig. 3 - Imagini optice ale granulelor de  $\beta$ -TCP.  
Optical images of the  $\beta$ -TCP granules.

Răspunsul fibroblastelor la contactul cu extractele nediluate și diluate a fost cuantificat conform standardelor SR EN ISO 10993. Nu a fost observat nici un efect toxic al mostrelor testate asupra celulelor. Monostratul celular a rămas intact fără a prezenta celule lizate (fig 4, tabelul 1). Controlul negativ nu are efect citotoxic, în timp ce controlul pozitiv prezintă un grad de citotoxicitate moderată (se observă un număr mai mare de celule lizate care nu încorporează colorantul vital roșu neutru).

### 5. Discuții și concluzii

În această lucrare s-au elaborat granule de  $\beta$ -TCP (fază unică) cu dimensiuni în intervalul 500-1000  $\mu$ m cu forme rugoase.

Cel mai eficient dispersant utilizat în această lucrare pentru a obține suspensii stabile a fost poliacrilatul de sodiu care a permis obținerea unei suspensii ceramice cu un conținut de 75 % solid. Pulberea de  $\beta$ -TCP sintetizată prin precipitare din soluții de săruri s-a aglomerat la dispersia în apă distilată; punctul iso-electric a fost găsit la pH=7,6. S-a stabilit că 1% dispersant la pH~10 a fost suficient pentru a dezaglomera pulberea de  $\beta$ -TCP.

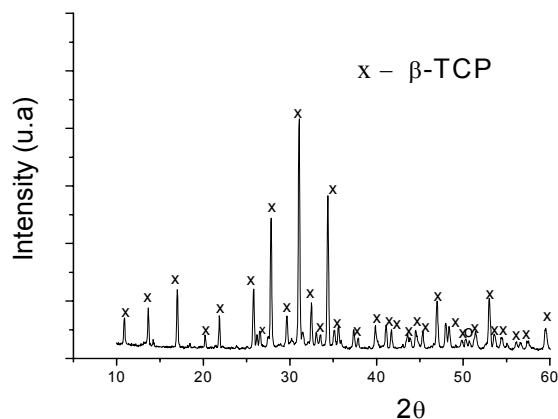


Fig. 4 - Spectrele de difracție de raze X ale granulelor de  $\beta$ -TCP  
The X-ray diffraction patterns for  $\beta$ -TCP granules.

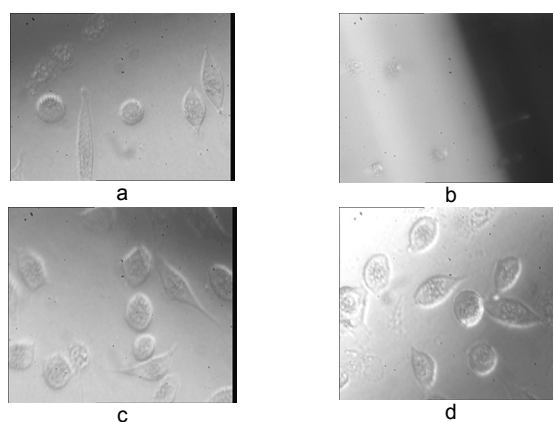


Fig. 5 - Morfologia fibroblastelor după aplicarea mostrelor: (a) control negativ; (b) control pozitiv; (c) extractul nediluat al probei; (d) extractul probei diluat 1/10 / Morphology of cultured fibroblasts under the test materials. (a) negative control; (b) positive control; (c) undiluted sample extract; (d) 1/10 diluted sample extract.

Tabelul 1

Rezultatele testului de difuzie în agar / Results of agar diffusion test						
Proba Sample	Control negativ Negativ control	Control pozitiv Positive control	Proba nediluată Undiluted sample	Proba diluată 1/2 Diluted sample 1/2	Proba diluată 1/5 Diluted sample 1/5	Proba diluată 1/10 Diluted sample 1/10
Indexul zonei Zone index	0	2	0	0	0	0
Indexul de liză Lysis index	1	3	1	1	1	1
Indexul de răspuns Response index	0/1	2/3	0/1	0/1	0/1	0/1
Rezultat Result	Non-citotoxic	Moderat citotoxic	Non-citotoxic	Non-citotoxic	Non-citotoxic	Non-citotoxic

Testele de biocompatibilitate au evidențiat faptul că produsul prezintă o bună biocompatibilitate, monostratul celular rămânând intact fără a prezenta celule lizate.

#### Notă

**Această lucrare a fost finanțată din Proiectul Nucleu Nr. 09350301/2009.**

#### REFERENCES

1. R.Z. LeGeros, Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monogr. Oral Sci. 1991, **15**, 1.
2. M.Jarcho, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, Clinical Orthopedics and related Research, June, 1981, 359.
3. M.Akira, I.Kohiki, Porous calcium phosphate ceramics for in vivo use', EP 2003, 1293220.
4. S. R. A. Santos, A. M. Rossi, L. R. Andrade and M. H. Prado da Silva, In Vitro Evaluation of Porous Biphasic Scaffolds, Key Engineering Materials 2007, **330-332**, 935.
5. A. Melinescu, M. Preda, L.E. Sima, S.M. Petrescu, and I. Teoreanu, In vitro testing of hydroxyapatite bioceramics, Romanian Journal of Materials, 2008, **38** (3), 233.
6. Rosanna Gonzalez-McQuire, and David W. Greene, Coating of Human Mesenchymal Cells in 3D Culture with Bioinorganic Nanoparticles Promotes Osteoblastic Differentiation and Gene Transfection, Advanced Materials, 2007, **19**, 2236.
7. M. Yamada, M. Shiota, Y. Yamashita, and S. Kasugai, Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alfa- and beta-tricalcium phosphate in block grafts, J. Biomed Mater Res. B Appl. Biomater, 2006 Nov. 14.
8. Je. De Oliveira, P.F. De Aquiar, A.M., Rossi, and G.A. Soares, Effect of process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for bone tissue scaffolds, Artif. Organd, 2003, **27**(5), 406.
9. P.N.De Aza, A.H.De Aza, and S.De Aza, Crystalline Bioceramic Materials, Bol.Soc.Esp.Ceram.V., 2005, **44**{3} 135.

Fibroblasts response to undiluted and diluted extracts was graded according to the SR EN ISO 109993 standards. No reactivity was observed with the tested product extracts: the confluent cell layer was left intact with absence of cell lysis (Figure 4, Table 1). The negative control obtained no reactivity as well. The positive control demonstrated a moderate reactivity (can see a greater number of cell lysates which do not incorporates neutral red vital dye).

#### 5. Discussions and conclusions

In this paper we developed  $\beta$ -TCP granules (unique phase) with dimensions in the range of 500-1000  $\mu\text{m}$  with irregular surfaces.

The most efficient dispersant used in this work for obtaining stable suspensions was sodium polyacrylic acid that enabled the preparation of a stable ceramic suspension containing 75 wt.% solid.

The  $\beta$ -TCP powder synthesized by precipitation, from salt solutions was highly flocculated when was dispersed in distilled water; the iso-electric point (IEP) was found at pH =7.6. It was determined that a 1 wt.% dispersing agents at a pH ~10 was sufficient for deflocculating of the  $\beta$ -TCP powder.

The biocompatibility tests showed that the product has a good biocompatibility, cell monolayer remaining intact without presenting lysis cell.

#### Acknowledgement

**This work was supported by Nucleu Project nr. 09350301/2009.**

\*\*\*\*\*

10. M.Akao, H.Aoki, K.Kato and A.Sato, Dense polycrystalline beta-tricalcium phosphate for prosthetic applications, J.Mater.Sci. 1982, **17**, 343.

11. G.Baroud, E.Cayer, and M.Bohner, Reological characterization of concentrated aqueous  $\beta$ -TCP suspensions: The effect of liquid-to-powder ratio, milling time, and additives, Acta Biomaterialia 2005, **1**, 357.

\*\*\*\*\*