

Sinteza silicijem dopiranog vaterita

Pavić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:000419>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Pavić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE I
INŽENJERSTVA MATERIJALA

Lucija Pavić

SINTEZA SILICIJEM DOPIRANOG VATERITA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof.dr.sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof.dr.sc. Hrvoje Ivanković

izv.prof.dr.sc. Nevenka Vrbos

izv.prof.dr.sc. Stjepan Milardović

Istraživanja ovog završnog rada provedena su u okviru istraživačkog projekta „Razvoj biokompatibilnih materijala na temelju hidroksiapatita za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva“, IP-2014-09-3752, financiranog od Hrvatske zaklade za znanost.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA.....	2
2.2. POLIMORFNE MODIFIKACIJE KALCIJEVA KARBONATA.....	3
2.2.1. Kalcit	3
2.2.2. Aragonit.....	5
2.2.3. Vaterit.....	7
2.3. SILICIJ KAO SUPSTITUENT	9
2.3.1. Silicijem dopirani vaterit	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.2. Sinteza silicijem dopiranog vaterita	12
3.3. Karakterizacija materijala.....	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka.....	14
4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom pripremljenih uzoraka	16
4.3. Mineraloški sastav uzoraka nakon toplinske obrade	17
4.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom toplinski obrađenih uzoraka	22
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA.....	26

SAŽETAK

Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno polje koje uključuje pripremu okosnica koje kemijski, strukturno i mehanički oponašaju prirodno koštano tkivo. Okosnice moraju biti biokompatibilne i bioaktivne uz zadovoljavajuća resorpcijska svojstva te predstavljaju alternativno rješenje za konvencionalne metode korištene u liječenju koštanih oštećenja i bolesti. Silicij se prirodno nalazi u ljudskom organizmu te potiče proliferaciju i diferencijaciju koštanih stanica te time pridonosi bržoj obnovi prirodnog koštanog tkiva.

U ovom radu pripremljeni su uzorci kalcijeva karbonata dopirani različitom količinom silicija, koji će u daljnjim istraživanjima biti korišten kao prekursor hidroksiapatitu, mineralnoj fazi prirodnog koštanog tkiva. Pripremljeni uzorci toplinski su obrađeni pri 600 °C. Uzorci su karakterizirani prije i nakon toplinske obrade pomoću rendgenske difrakcijske analize (XRD) i infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR). Dobiveni difraktogrami analizirani su Rietveldovom metodom utočnjavanja pomoću računalnog programa DIFFRAC. SUITE TOPAS V.5.0.

Potvrđeno je nastajanje trofaznog sustava kalcita, aragonita i vaterita, dok nakon toplinske obrade nastaje sustav kalcita i kalcijeva silikata.

Ključne riječi: biomaterijali, silicij, kalcijev karbonat, hidroksiapatit

SUMMARY

Synthesis of silicon doped vaterite

Bone tissue engineering is an interdisciplinary field where biomimetic scaffolds are used for bone regeneration. Biomimetic scaffolds chemically, structurally and mechanically imitate natural bone tissue. Scaffolds must be biocompatible and bioactive with suitable resorption properties. Biomimetic scaffolds represent an alternative solution for conventional methods that are used in the treatment of bone injuries and diseases. Silicon naturally exists in the human body and promotes proliferation and the differentiation of osteoblasts, thus it promotes regeneration of natural bone tissue.

In this research, samples of calcium carbonate are synthesised with a different amount of silicon dopant which will be used as a precursor of hydroxyapatite, a mineral phase of natural bone tissue. All as-prepared samples are heat-treated at 600 °C. Samples are characterized before and after heat treatment with X-ray diffraction analysis (XRD) and infrared spectroscopy with Fourier transformations (FTIR). The software DIFFRAC. SUITE TOPAS V.5.0., with the fundamental parameters approach, was employed for Rietveld refinements.

As-prepared samples are triphase systems of calcite, aragonite, and vaterite, while after heat treatment system is composed of calcite and calcium silicate.

Keywords: biomaterials, silicon, calcium carbonate, hydroxyapatite

1. UVOD

Bolesti koštanog tkiva kao što su artritis, osteoporoza, rahitis i koštana oštećenja sve su češća pojava u području medicine kao rezultat starenja ljudske populacije. Propadanje koštanog tkiva uzrokovano ozljedama i oboljenjima ugrožava kvalitetu života pa time raste potreba za okosnicama za obnovu koštanog tkiva [1]. Trenutni klinički postupci korišteni u svrhu liječenja koštanih oštećenja kao što su autologna i alogena presađivanja, popraćeni su infekcijama, kroničnim bolestima, imunološkim reakcijama i dodatnim operacijskim zahvatima. Područje inženjerstva koštanog tkiva usmjereno je na pripravu okosnica koje kemijski, strukturno i mehanički oponašaju prirodno koštano tkivo. Cilj okosnice je potaknuti rast i obnovu koštanog tkiva [2]. Takve okosnice građene su od biomaterijala čime se osigurava biokompatibilnost uz izostanak imunološkog odgovora organizma. Korišteni materijali moraju biti bioaktivni uz mogućnost bioresorpcije te posjedovati odgovarajuća mehanička svojstva kako bi služili kao potporanj okolnom tkivu tijekom obnove. Okosnica mora biti pripremljena tako da potiče stanični odgovor na molekulskom nivou čime se aktiviraju geni koji pomažu obnovi prirodnog koštanog tkiva [3]. Kako bi samoobnova tkiva bila moguća i uspješna svojstva biomaterijala moraju biti u skladu s mehaničkim i biološkim svojstvima prirodnog koštanog tkiva dok brzina razgradnje okosnice treba odgovarati brzini stvaranja novog koštanog tkiva [4, 5].

Prirodno koštano tkivo je kompozitni materijal građen od anorganskog (apatit) i organskog (kolagen) dijela [5]. Zbog sličnosti biološkom apatitu hidroksiapatit je zbog kemijske i strukturne sličnosti poželjna faza u biomaterijalima korištenim u inženjerstvu koštanog tkiva. Mineralna faza prirodnog koštanog tkiva sadrži brojne elemente u tragovima kao što su Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , koji pozitivno utječu na obnavljanje koštanog tkiva [6]. Silicij se prirodno nalazi u koštanom tkivu te je neophodan za njegov rast i obnovu. Dodatno, silicij ima pozitivan učinak na proliferaciju i diferencijaciju koštanih stanica. Ugradnjom silicija u strukturu hidroksiapatita moguće je poboljšati bioaktivnost materijala i povećati njegovu topljivost [7].

2. OPĆI DIO

2.1. INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA

Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno područje inženjerskih i biomedicinskih znanosti koje svoja istraživanja usmjerava na razvoj okosnica u svrhu obnove i unapređenja funkcije koštanog tkiva [2]. Prirodno koštano tkivo sastavljeno je od mineralizirane izvanstanične matrice i koštanih stanica (osteoblasta) [9]. Izvanstanična matrica je dio kosti na kojem su vezane stanice i njezina uloga je slanje signala potrebnih za rast, migraciju i diferencijaciju stanica [8]. Koštana okosnica je trodimenzionalna matrica koja služi kao predložak za stanice i omogućuje njihovu interakciju, proliferaciju i diferencijaciju te visokoporoznom strukturom omogućuje prodiranje koštanog tkiva s površine u dubinu okosnice [10].

Okosnice koje služe kao podloga za stvaranje koštanog tkiva nasaduju se stanicama izoliranim iz prirodnog tkiva (biopsija). Na mjesto ozljede ugrađuje se okosnica s nasadenim stanicama koja je prethodno izložena biofizičkim podražajima u bioreaktoru te se na taj način potiče rast novog koštanog tkiva ili se ugrađuje prethodno uzgojeno tkivo na okosnici. [9]. Tkivo se uzgaja na okosnici sa stanicama smještenima u bioreaktoru u kojem su osigurani uvjeti (hranjive tvari, kisik, faktori rasta i sl.) za rast i razvoj koštanog tkiva. Faktori rasta su signalizirajuće molekule koje mogu biti usađene u strukturu okosnice ili nanesene na njezinu površinu [11]. Nakon ugradnje okosnice, okosnica se razgrađuje brzinom jednakoj brzini rasta novog koštanog tkiva. Pripremljene okosnice moraju biti izrađene od biomaterijala koji strukturno i funkcionalno oponašaju izvanstaničnu matricu prirodne kosti. Okosnica ne smije izazivati toksične, alergijske i kancerogene reakcije u tijelu (biokompatibilnost). Dodatno, okosnica mora biti bioaktivna, to jest u dodiru sa živim tkivom na svojoj površini mora poticati specifičan biološki odgovor organizma što rezultira stvaranjem veze s tkivom. Kako bi se omogućila difuzija hranjivih tvari, metaboličkog otpada i kisika kroz cijeli volumen okosnice ona mora oponašati visokoporoznu strukturu prirodnog koštanog tkiva. Pore okosnice moraju biti međusobno povezane kako bi se omogućila migracija stanica i zadovoljavajuća vaskularizacija okosnice [9].

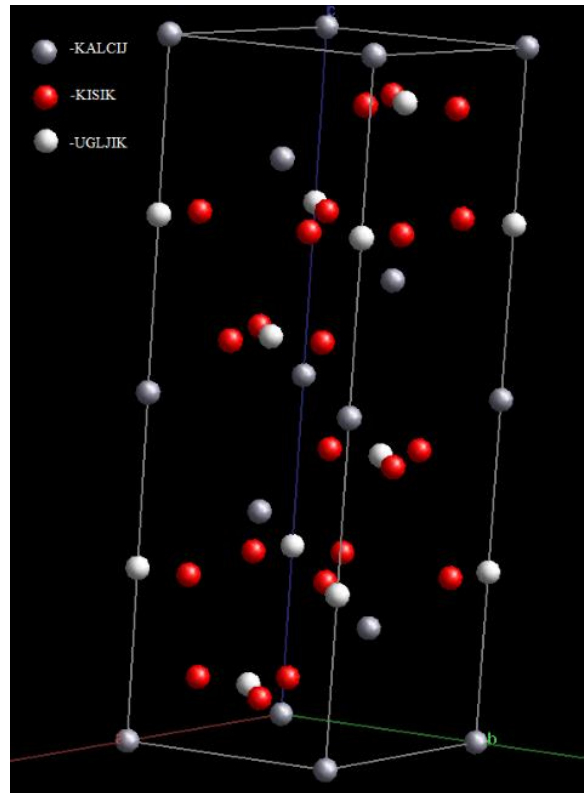
Prirodno koštano tkivo kompozitni je materijal sastavljen od biološkog apatita i kolagena te se razvoj okosnica temelji na pripremi okosnice sličnog anorgansko-organskog sastava. Kao anorganski materijali za pripremu okosnica najčešće se koriste kalcijevi fosfati, bioaktivno staklo i kalcijev karbonat [4]. Obata i suradnici razvili su kompozitni materijal sastavljen od silicijem dopiranog vaterita kao anorganske komponente i poli(mliječne) kiseline (PLA) kao polimerne komponente. Takav materijal objedinjuje bioaktivnost i osteokonduktivna svojstva anorganske komponente i biorazgradivost polimerne matrice uz zadovoljavajuća mehanička svojstva [12]. Kalcijev karbonat često je istraživana anorganska faza u području inženjerstva koštanog tkiva. Prisutan je u tri polimorfne modifikacije, kalcit, aragonit i vaterit, a razlika u fizikalnim i kemijskim svojstvima očituje se u svojstvima gotovih proizvoda [13].

Kako je prirodno mineralno tkivo sastavljenom većinom od karbonatnog hidroksiapatita s manjkom kalcijevih iona (engl. *carbonated calcium-deficient hydroxyapatite*), hidroksiapatit je poželjna anorganska faza u kompozitnim okosnicama [14]. Silicijem dopirani vaterit moguće je koristiti kao prekursor za sintezu hidroksiapatita dopiranog silicijevim ionima te na taj način sastav okosnice približiti onome prirodnog tkiva.

2.2. POLIMORFNE MODIFIKACIJE KALCIJEVA KARBONATA

2.2.1. Kalcit

Kalcit, poznatiji pod nazivom vapnenac, široko je rasprostranjen u prirodi u različitim oblicima mramora i krede. Ujedno je i najrasprostranjenija polimorfna modifikacija kalcijeva karbonata zbog termodinamičke stabilnosti u širokom rasponu temperatura i tlakova [15]. Kristali kalcita kristaliziraju u heksagonskom sustavu. Atomi kalcija nalaze se na vrhovima romboedra koji čini osnovu strukture. U središtu romboedra nalaze se atomi ugljika, a atomi kisika smješteni su jednoj ravnini pod kutem od 120° [16]. Parametri kristalne rešetke kalcita iznose $a = b = 4.990 \text{ \AA}$, $c = 17.061 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ i $\gamma = 120^\circ$ [17]. Na slici 1 prikazana je struktura kristalne rešetke kalcita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

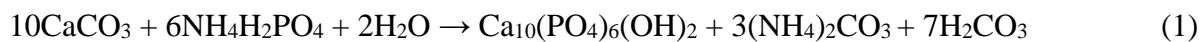


Slika 1. Struktura kristalne rešetke kalcita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

U prirodi kalcit nastaje procesom biomineralizacije. Biomineralizacija je proces stvaranja anorganskih kristalnih i amorfni materijala, a provode ga živi organizmi koji spadaju u skupine prokariota (bakterije i cijanobakterije) i eukariota (životinje, biljke, gljive). Bakterije mogu stvarati anorganske kristale unutar stanice ili izvan stanice. Kalcit je primjer kristala koji nastaje izvanstanično [18]. Zbog mogućnosti izravnog vezanja s prirodnim koštanim tkivom kalcit se smatra potencijalnim materijalom za izradu okosnica [19].

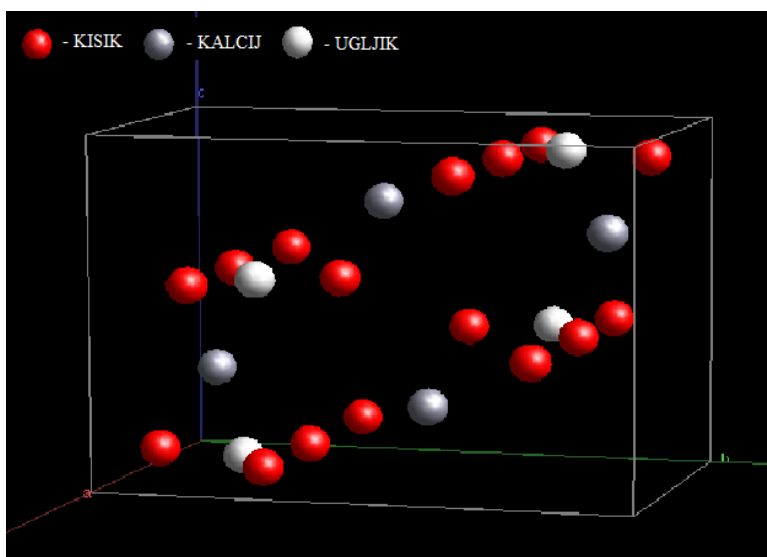
Kalcit za izradu okosnica može se dobiti iz biogenih izvora ili se može dobiti sintetskim putem. Chróścicka i suradnici sintetizirali su trodimenzionalnu okosnicu na temelju kalcita. Provedena *in vitro* istraživanja nasadivanjem stanica na pripremljenu okosnicu potvrđuju uspješnu proliferaciju stanica. Dodatno, *in vivo* istraživanja potvrđuju da okosnice na temelju kalcita potiču rast i razvoj koštanog tkiva [20]. Kalcit se često koristi kao prekursor Ca^{2+} iona za sintezu hidroksiapatita. U

reakciji kalcita s prekursorom fosfatnih iona u vodenom mediju dolazi do precipitacije hidroksiapatita prema reakciji (1) [21]:



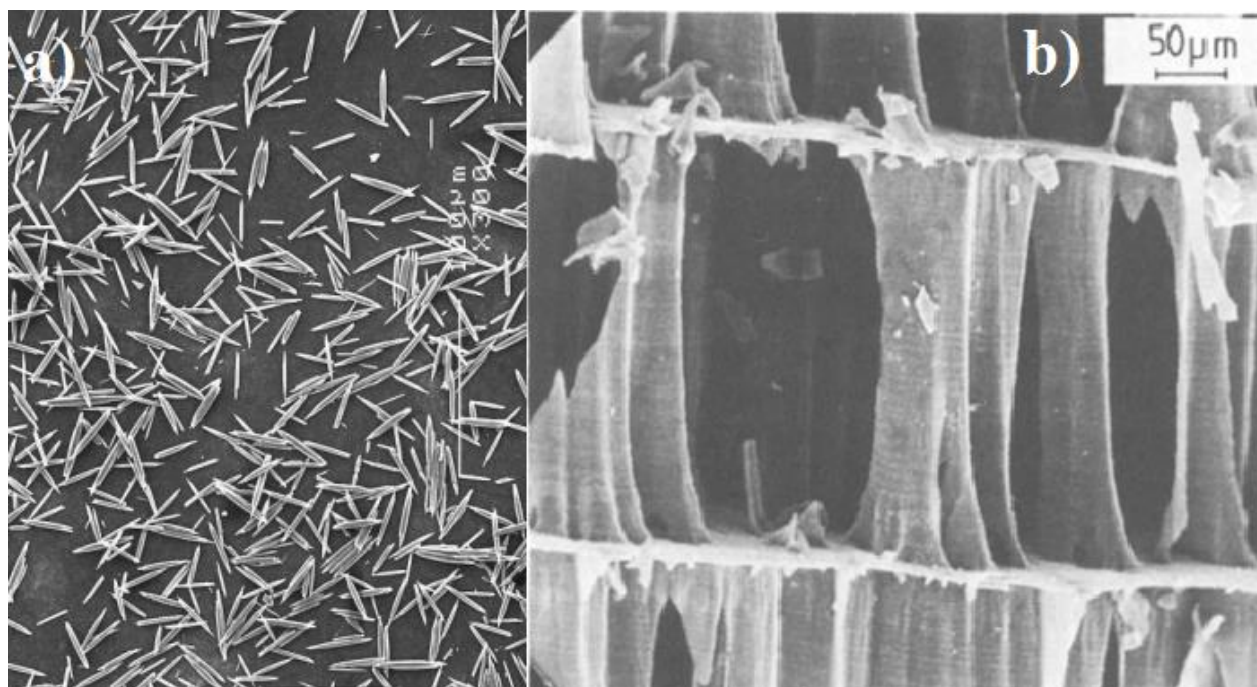
2.2.2. Aragonit

Aragonit je polimorfna modifikacija kalcijevog karbonata manje stabilna od kalcita, a stabilnija od vaterita [22]. Aragonit kristalizira u ortorompskom sustavu [16]. Prostorne skupine nalaze se na položajima *Pmcn*. Parametri kristalne rešetke iznose $a = 4,9598\text{\AA}$, $b = 7,9641\text{\AA}$ i $c = 5,7379\text{\AA}$, gdje su $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ [17]. Na slici 2 prikazana je struktura kristalne rešetke aragonita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.



Slika 2. Struktura kristalne rešetke aragonita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

Veličina i oblik kristala aragonita ovise o metodi sinteze i reakcijskim uvjetima kao što su temperatura, koncentracija reaktanata, dodatak aditiva, miješanje i vrijeme rasta kristala [22]. Kristali aragonita najčešće su igličastog oblika (Slika 3a). Sintezom aragonita iz vodene otopine kalcijeva klorida (CaCl_2) i natrijeva karbonata (Na_2CO_3) pri $32\text{ }^\circ\text{C}$ dolazi do precipitacije kristala u obliku cvijeta. Isti postupak sinteze, ali različite koncentracije prekursora i temperature, rezultira različitim oblicima kristala aragonita [23].



Slika 3. Mikrografija igličastih kristala aragonita (a) i struktura sipine kosti (b) [22, 24].

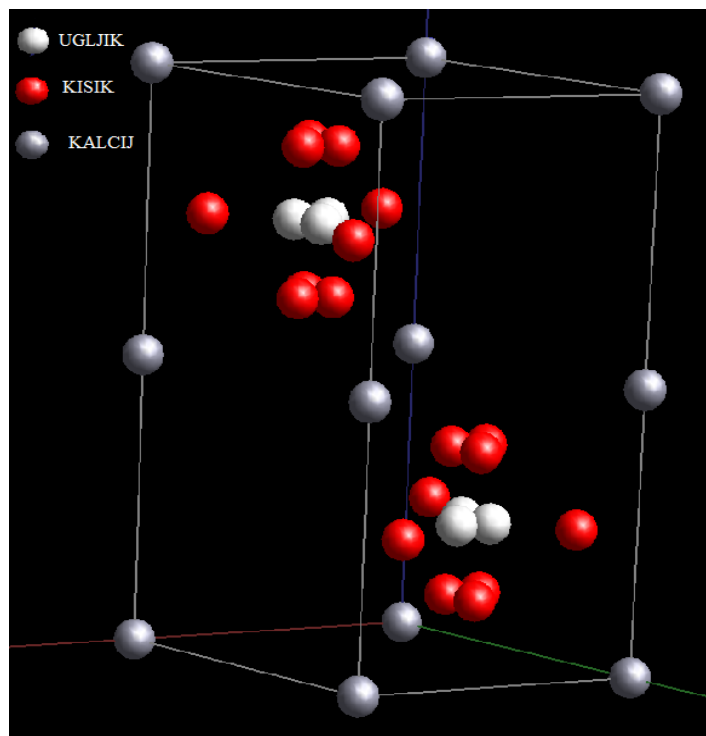
Aragonit se može koristiti kao biomedicinski materijal zbog mogućnosti adhezije s prirodnim koštanim tkivom i resorpcije *in vivo*. Matta i suradnici potvrdili su da se okosnica izrađena od aragonita može koristiti kao nosač matičnih stanica iz koštane srži jer potiče adheziju, proliferaciju i diferencijaciju stanica u osteoblaste [25]. Aragonit je gradivni materijal koralja, ljuske školjaka i sipine kosti te se kao takav koristi kao izvor Ca^{2+} iona za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva [26]. Prednost korištenja biogenih izvora aragonita je u elementima u tragovima koji čine dio aragonitne strukture kao što su Na^+ , Sr^{2+} i Mg^{2+} ioni i imaju ključnu ulogu u regeneraciji koštanog tkiva [21, 27]. Kamba i suradnici potvrdili su da nanokristali aragonita

izolirani iz školjaka potiču diferencijaciju osteoblasta gdje dolazi do povećanja sinteze proteina alkalne fosfataze (ALP, engl. *alkaline phosphatase*) [28]. Sipina kost građena je od aragonita čija je struktura stabilizirana Sr^{2+} ionima. Zbog svoje visokoporozne strukture (~ 90 %) koristi se u inženjerstvu koštanog tkiva u obliku aragonita ili kao prekursor hidroksiapatitu [29, 30].

Milovac i suradnici sintetizirali su hidroksiapatit iz sipine kosti hidrotermalnom metodom u reakciji s otopinom $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pri 200 °C tijekom 48 sati [29]. Ressler i suradnici aragonit iz sipine kosti toplinskom obradom preveli su u kalcit te ga koristili kao prekursor Ca^{2+} iona za sintezu kalcijevih fosfata metodom precipitacije u vodenom mediju [30]. Dobiven je višefazni sustav kalcijevih fosfata koji je supstituiran Na^+ , Sr^{2+} , Mg^{2+} i CO_3^{2-} ionima kao rezultat korištenja biogenog izvora. Tako pripremljeni materijal sličniji je prirodnom mineralnom tkivu te je bolje prihvaćen od ljudskog organizma nego li stehiometrijski hidroksiapatit [30]. Kao i sipina kost, ljuštore školjaka mogu se metodom precipitacije ili hidrotermalnom metodom prevesti u hidroksiapatit uz prisutnost prekursora PO_4^{3-} iona [31].

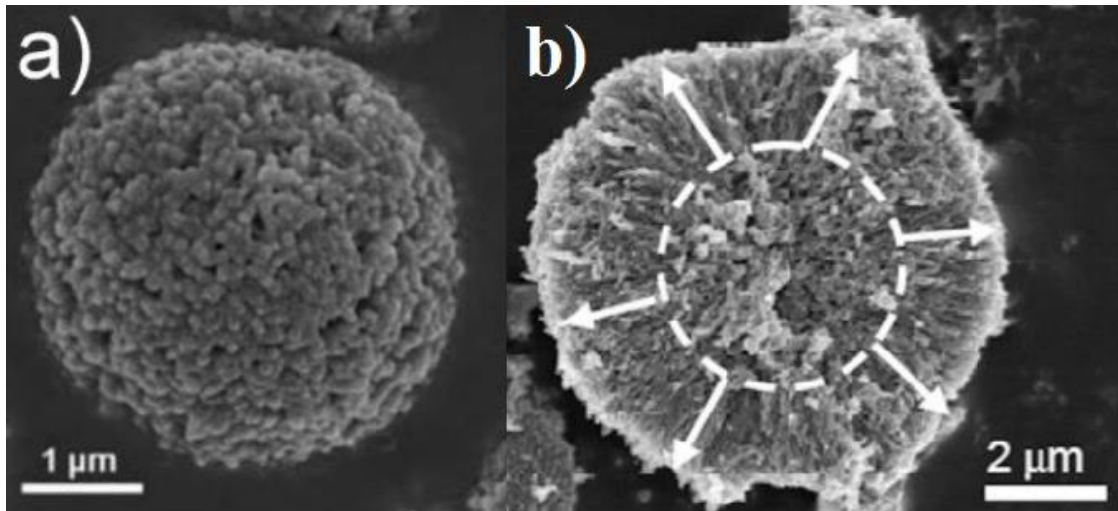
2.2.3. Vaterit

Vaterit je metastabilna polimorfna modifikacija kalcijeva karbonata. Manje je stabilan od kalcita i aragonita te posjeduje najveću topljivost. Vaterit izložen vodenom mediju prelazi u termodinamički stabilniji kalcit pri temperaturama nižim od 60 °C ili aragonit pri višim temperaturama. Kao metastabilna modifikacija vaterit se rijetko u prirodi nalazi u čistom stanju, a kristale vaterita je teško dobiti postupcima sinteze. Jedna od pretpostavki tvrdi da vaterit kristalizira u heksagonskom sustavu s parametrima kristalne rešetke $a = 4,13\text{Å}$, $c = 8,49\text{Å}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ i $\gamma = 120^\circ$ i prostornim skupinama na $P6_3/mmc$ [32]. Druga pretpostavka tvrdi da vaterit kristalizira u ortorompskom sustavu s parametrima kristalne rešetke $a = 4,13\text{Å}$, $b = 7,15\text{Å}$, $c = 8,48\text{Å}$ i $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, a sastoji se od 20 atoma sa prostornim skupinama smještenim na $Pbmn$. [17, 33]. Novija istraživanja ističu da struktura vaterita kristalizira u oba kristalna sustava [32]. Na slici 4 prikazana je struktura kristalne rešetke vaterita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.



Slika 4. Struktura kristalne rešetke vaterita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

Unatoč nestabilnoj strukturi, vaterit se u prirodi može pronaći na područjima mineralnih izvora. Tragovi vaterita pronađeni su u ribljim otolitima, slatkovodnim biserima, zacijeljenim ožiljcima na oklopima mekušaca, u žučnom i mokraćnom kamencu. U takvim okolnostima metalni ioni i organske tvari kao nečistoće u strukturi mogu stabilizirati vaterit i spriječiti prijelaz u kalcit i aragonit. Kristali vaterita porozne su strukture i sferičnog oblika promjera od 0,05 do 5 μ m (slika 5a). Presjek aglomerata kristala vaterita ukazuje na orijentirane kristale prema površini aglomerata (slika 5b) [32].



Slika 5. Mikrografija površine (a) i prijesjeka (b) kristala vaterita [32].

Kao kalcit i aragonit, vaterit se koristi u području inženjerstva koštanog tkiva kao materijal za izradu koštanih okosnica. Prema Trushini i suradnicima materijali na osnovi vaterita s poroznom mikrostrukturom i zadovoljavajućom specifičnom površinom mogu se koristiti kao spremnici faktora rasta koji potiču proliferaciju i diferencijaciju koštanih stanica [32]. Dodatno, vaterit se koristi kao prevlaka na biorazgradivim polimernim okosnicama u svrhu stvaranja sloja karbonatnog hidroksiapatita uranjanjem okosnice u simuliranu tjelesnu tekućinu. Otapanjem prevlake od vaterita simulirana tjelesna tekućina postaje zasićena Ca^{2+} ionima koji potiču stvaranje karbonatnog hidroksiapatita [34]. Nadalje, vaterit se kao i ostale polimorfne modifikacije kalcijeva karbonata može prevesti u hidroksiapatit uz prisutnost prekursora PO_4^{3-} iona.

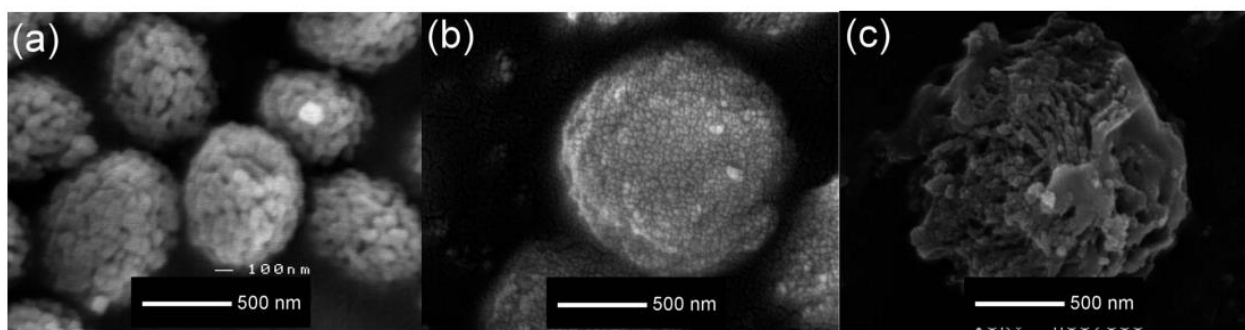
2.3. SILICIJ KAO SUPSTITUENT

Ispitivanje uloge silicija kao esencijalne tvari u tragovima započelo je 70-ih godina prošlog stoljeća, a osnove tih istraživanja počivaju na ulozi silicija u metaboličkim procesima u razvoju i mineralizaciji koštanog tkiva. Gubitak biološki dostupnog silicija uzrokuje poremećaje u proliferaciji stanica prilikom rasta novog koštanog tkiva i poremećaj funkcije osteoblasta što rezultira osteoporozom i osteopenijom [7]. Silicij prisutan u koštanom tkivu potiče stvaranje

novih krvnih žila (angiogeneza). Nadalje, silicij sudjeluje u procesu okoštavanja odnosno stvaranja novog koštanog tkiva uslijed stimulirajućeg učinka na stanične aktivnosti kao što su proliferacija, mineralizacija i diferencijacija matičnih stanica [6]. Ugradnjom silicija u strukturu hidroksiapatita postiže se bolja bioaktivnost te visoka aktivnost površine koja se može objasniti stvaranjem Si-OH veza na površini materijala [35].

2.3.1. Silicijem dopirani vaterit

Biokeramičke materijale dopirane silicijem korištene u području inženjerstva koštanog tkiva karakterizira bioaktivnost i sposobnost resorpcije pri čemu se otpuštaju ioni silicija i kalcija. Otpušteni ioni potiču stvaranje novog koštanog tkiva i kalcifikaciju [36]. Yamada i suradnici te Nakamura i suradnici pripremili su silicijem dopiran vaterit reakcijom kalcijeva hidroksida (Ca(OH)_2) i metanola (CH_3OH) u struji ugljikova dioksida (CO_2) pri stalnom miješanju, a kao izvor silicija koristili su (aminopropil)trietoksisilan [36, 37]. Nakon sušenja pri $110\text{ }^\circ\text{C}$ 12 sati, rendgenskom difrakcijskom analizom i pretražnim elektronskim mikroskopom potvrđena je sinteza sferičnih aglomerata vaterita veličine $0,7 - 1,5\text{ }\mu\text{m}$ [37]. Na slici 6 prikazane su čestice vaterita dopiranog s 0 (a), 2,6 (b) i 4,9 (c) % silicijevih iona.



Slika 6. Mikrografije sferične čestice vaterita (a) i silicijem dopiranog vaterita (b i c) [38].

FTIR analizom vaterita dopiranog silicijevim ionima uočavaju se vrpce karakteristične za Si-CH₂ i asimetrično istezanje Si-O-Si veze koje pripadaju sloju umreženog (aminopropil)trietoksisilana na površini materijala. Silicijem dopirani vaterit otapa se sporije u odnosu na nedopirani vaterit. Mehanizam otapanja temelji se na tome da se prvo otpuštaju molekule umreženog (aminopropil)trietoksisilana i amornog kalcijevog karbonata, a potom vaterita. Prema tome, smatra se da amorfni kalcijev karbonat i molekule umreženog (aminopropil)trietoksisilana čine vanjski dio čestice vaterita dopiranog silicijem, a vaterit je stabilan dok se većina vanjskog sloja ne otopi [37]. U području inženjerstva koštanog tkiva silicijem dopiran vaterit koristi se kao izvor silicijevih i kalcijevih iona. Hibridni materijal sastavljen od poli(mliječne) kiseline i silicijem dopiranog vaterita kontroliranim otpuštanjem iona kalcija i silicija potiče proliferaciju i diferencijaciju mišjih stanica fibroblasta [38].

Cilj ovog rada je pripremiti silicijem supstituiran vaterit koji će se u daljnjim istraživanjima koristiti za sintezu hidroksiapatita metodom precipitacije u vodenom mediju.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za pripravu silicijem dopiranog vaterita korišteni su:

- Kalcij hidroksid, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, (LACH-NER d.o.o., Češka)
- Metanol, CH_3OH , (GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska)
- (3-aminopropil)trietoksisilana, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ($\geq 98\%$), (Sigma-Aldrich, SAD)
- Ugljikov dioksid, CO_2 , (UTP d.o.o., Hrvatska)
- Silicij (Si, NIST, SAD)

3.2. Sinteza silicijem dopiranog vaterita

Kalcijev karbonat pripremljen je u 250 cm^3 otopine metanola uz dodatak 18,75 g kalcijeva hidroksida u struji CO_2 protoka $2,0\text{ dm}^3\text{min}^{-1}$ tijekom 15 minuta. Silicijem dopiran kalcijev karbonat pripremljen je na prethodno opisan način uz dodatak 7,5 (Si1) i 15 cm^3 (Si2) 3-(aminopropil)trietoksisilana. Uvjeti sinteze korišteni u ovom radu odabrani su prema istraživačkom radu Yamade i suradnika [36]. Nadalje, uzorci su sušeni pri $110\text{ }^\circ\text{C}$ 12 sati. Sušeni uzorci su toplinski obrađeni na $600\text{ }^\circ\text{C}$ 4 sata.

3.3. Karakterizacija materijala

Dobiveni uzorci karakterizirani su sljedećim metodama:

- *Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)*

Mineraloški sastav sintetiziranih i toplinski obrađenih uzoraka određen je XRD analizom pomoću difraktometra Shimadzu XRD-6000 s CuK_α ($1,5406\text{ \AA}$) zračenjem pri 40 kV i 30 mA, u mjernom području kuteva 20° – 60° brzinom snimanja $0,02^\circ/3\text{ s}$. Kako bi se omogućilo određivanje udjela amornog kalcijevog karbonata, u uzorke pripremljenih kalcijevih karbonata umiješano je 5,0 wt% silicija, koji je korišten kao standard.

- *Rietveldova metoda utočnjavanja*

Pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0. određen je udio amornog kalcijevog karbonata i pripremljenih kristalnih faza koristeći strukturni model kalcita preuzet iz istraživanja Maslen i suradnika [39], aragonita preuzet iz istraživanja Caspi i suradnika [40], vaterita preuzet iz istraživanja Le Baila i suradnika [41] i kalcijeva silikata preuzet iz istraživanja Tsurumi i suradnika [42].

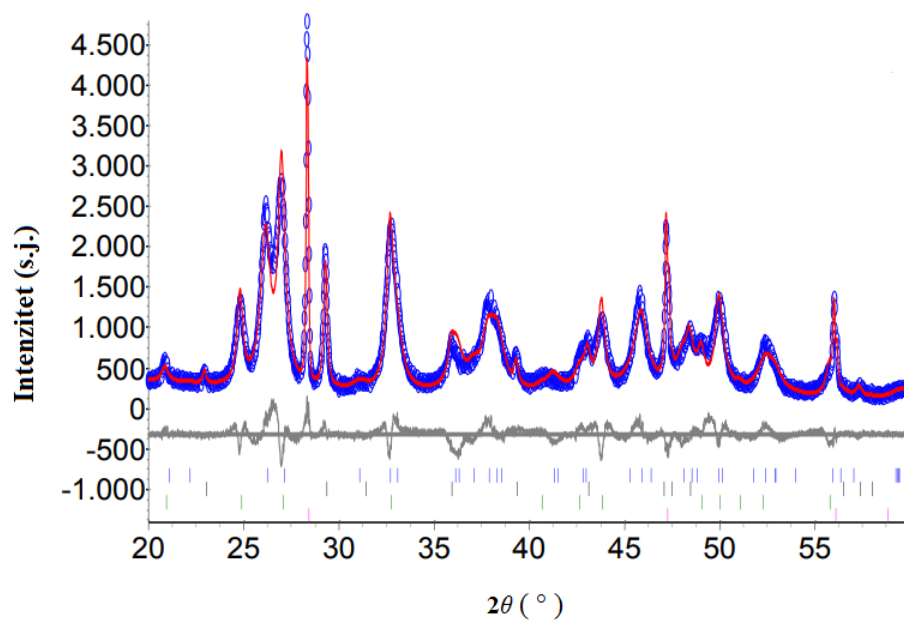
- *Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovom transformacijom (FTIR)*

FTIR spektri dobivenih praškastih uzoraka snimljeni su ATR-FTIR Brucker Vertex 70 spektrometrom s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani 32 puta u apsorpcijskom režimu i rasponu mjernog područja od 4000 do 400 cm^{-1} .

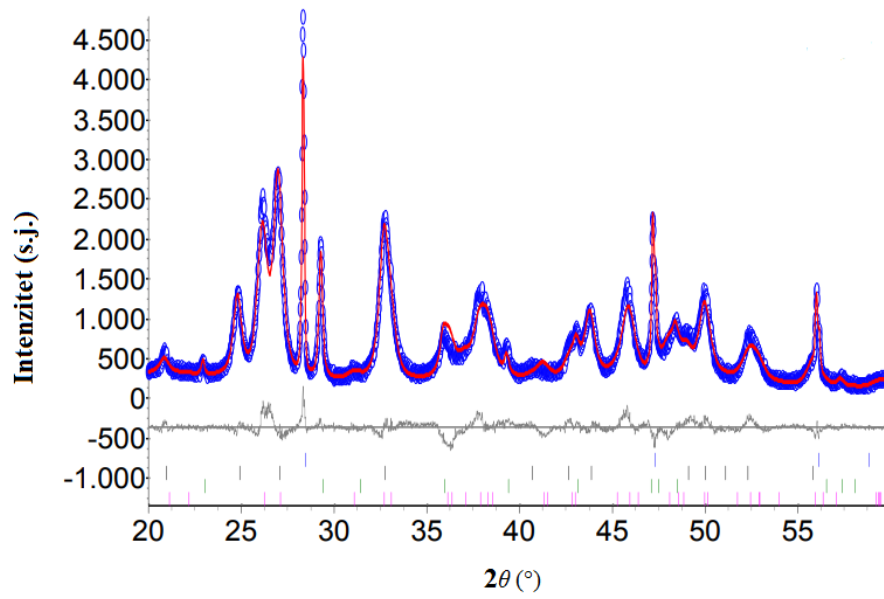
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka

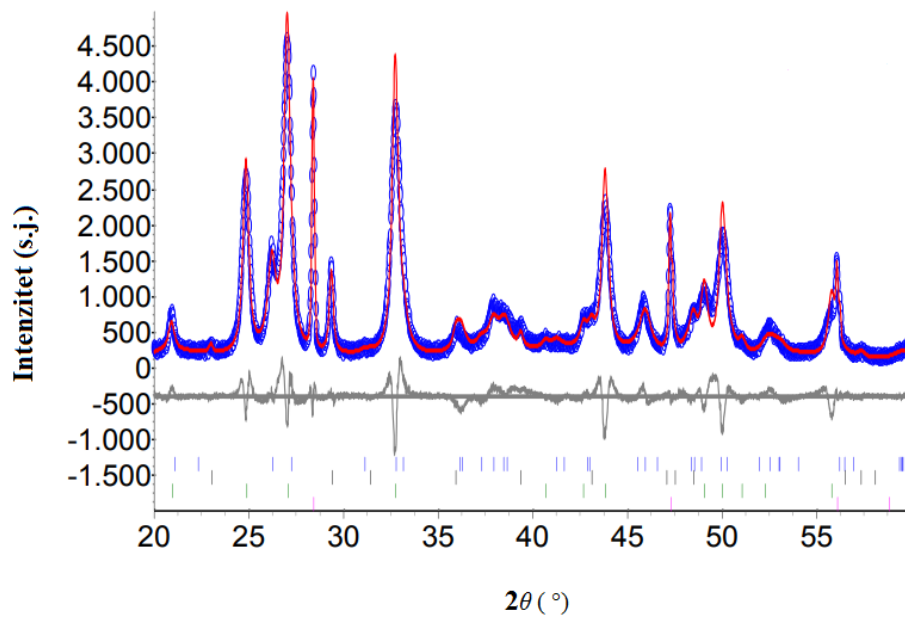
Difraktogrami pripremljenih kalcijevih karbonata (Slika 7-9) pokazuju karakteristične pikove za tri polimorfne modifikacije kalcijeva karbonata: aragonit (ICDD 41-1475), vaterit (ICDD 33-0268) i kalcit (ICDD 47-1763). Kao standard korišten je silicij (ICDD 27-1402). Snimljeni difraktogrami prikazani su crveno, a računski plavo. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ($R_{wp} < 10\%$, $R_{exp} < 3\%$). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma kalcita, aragonita, vaterita i silicija (standard) prikazani su na dnu slike.



Slika 7. Rietveldova analiza difraktograma nedopiranog CaCO₃.



Slika 8. Rietveldova analiza difraktograma CaCO_3 dopiranog silicijem ($\text{CaCO}_3\text{-Si1}$).



Slika 9. Rietveldova analiza difraktograma CaCO_3 dopiranog silicijem ($\text{CaCO}_3\text{-Si2}$).

Daljnjom obradom podataka pomoću Rietveldove metode utočnjavanja uz dodatak 5,0 wt% silicija kao standarda ustanovljeno je da uz različite udjele aragonita, kalcita i vaterita dolazi do precipitacije značajnog udjela amornog kalcijevog karbonata (tablica 1). Porastom udjela silicija kao dopanta dolazi do smanjenja udjela aragonita, raste udio vaterita te ne dolazi do pravilne promjene udjela amornog kalcijevog karbonata. Korišteni uvjeti sinteze u ovom radu odabrani su prema istraživačkom radu Yamade i suradnika, koji su pripremili jednu koncentraciju silicijem dopiranog vaterita, gdje dolazi do precipitacije niskog udjela kalcita. Nadalje, u istraživanju Yamade i suradnika ne dolazi do precipitacije aragonita, dok u ovom istraživanju on čini većinsku fazu u uzorcima CaCO_3 i $\text{CaCO}_3\text{-Si1}$ [36].

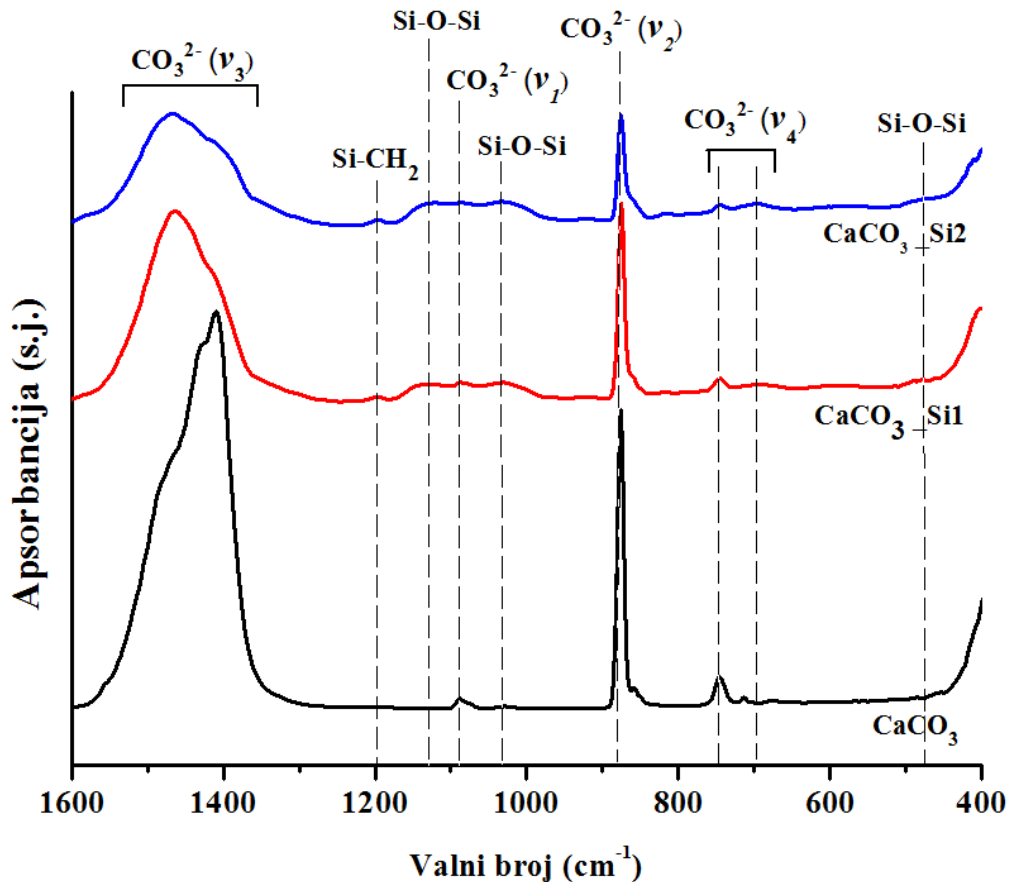
Tablica 1. Kvantitativan fazni sastav izračunat pomoću Rietveldove metode utočnjavanja difraktograma pripremljenih uzoraka.

Uzorak	Aragonit (wt%)	Kalcit (wt%)	Vaterit (wt %)	Amorfna faza (wt%)
CaCO_3	50,37	5,07	22,08	22,48
$\text{CaCO}_3\text{-Si1}$	41,97	5.14	27.40	25,49
$\text{CaCO}_3\text{-Si2}$	27,86	4,27	54,56	13,31

4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom pripremljenih uzoraka

Na slici 10 prikazani su FTIR spektri nedopiranog uzorka (CaCO_3) i uzoraka dopiranih silicijem ($\text{CaCO}_3\text{-Si1}$; $\text{CaCO}_3\text{-Si2}$). FTIR spektar za uzorak CaCO_3 pokazuje karakteristične vrpce za karbonatnu skupinu u području od 1580 do 1295 cm^{-1} (ν_3 , asimetrično savijanje C–O veze), na 1088 cm^{-1} (ν_1 , simetrično istezanje C–O veze), 879 cm^{-1} (ν_2 , savijanje C–O veze), 744 cm^{-1} i 713 cm^{-1} (ν_4). Dopirani uzorci pokazuju postojanje karakterističnih vrpca za karbonatnu skupinu (CO_3^{2-}) na istim valnim brojevima kao i za uzorak CaCO_3 . Međutim, dolazi do smanjenja intenziteta karakterističnih vrpca za karbonatnu skupinu što može biti rezultat dodatka (3-aminopropil)trietoksisilana. FTIR spektri uzoraka $\text{CaCO}_3\text{-Si1}$ i $\text{CaCO}_3\text{-Si2}$ posjeduju vrpce karakteristične za vezu Si–CH₂ pri 1196 cm^{-1} i vrpce karakteristične za Si–O–Si vezu pri 472,

1033 i 1128 cm^{-1} . Dobiveni rezultati upućuju da dolazi do taloženja (3-aminopropil)trietoksisilana na površini pripremljenih kalcijevih karbonata [36, 37, 43].

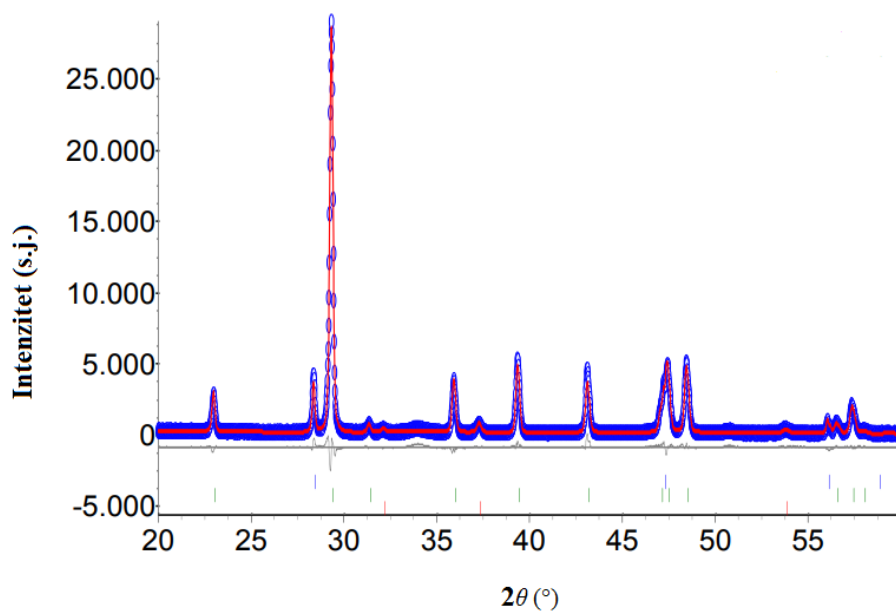


Slika 10. FTIR spektri pripremljenih uzoraka.

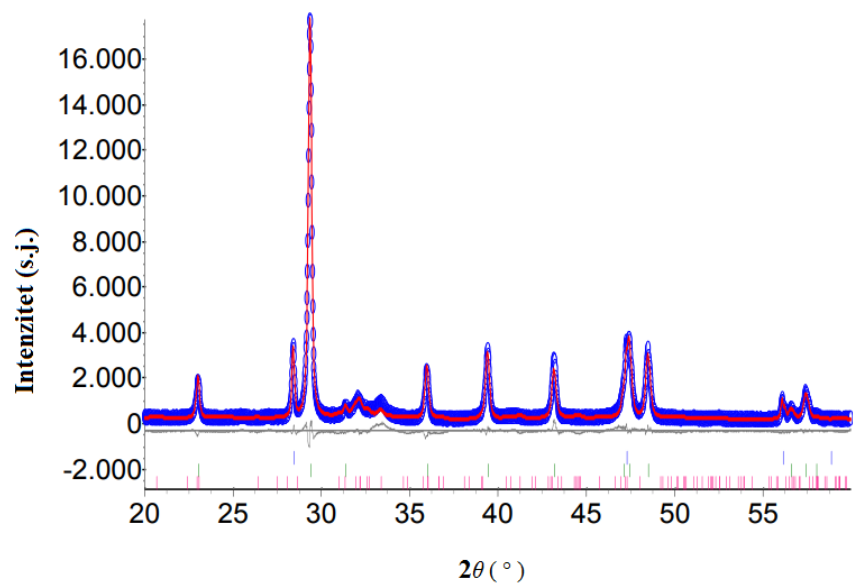
4.3. Mineraloški sastav uzoraka nakon toplinske obrade

Difraktogrami toplinski obrađenih uzoraka (Slika 11-13) pokazuju karakteristične pikove za kalcit (ICDD 47-1763) i kalcijev silikat (larnit, β - Ca_2SiO_4 , ICDD 9-351). Kao standard korišten je silicij (ICDD 27-1402). Nakon toplinske obrade uzoraka pri 600 °C dolazi do nastajanja isključivo kalcita kao polimorfne modifikacije uz izostanak aragonita i vaterita. Prema Yamadi i suradnicima do transformacije aragonita i vaterita u kalcit dolazi pri 460–490 °C [36]. Svi uzorci

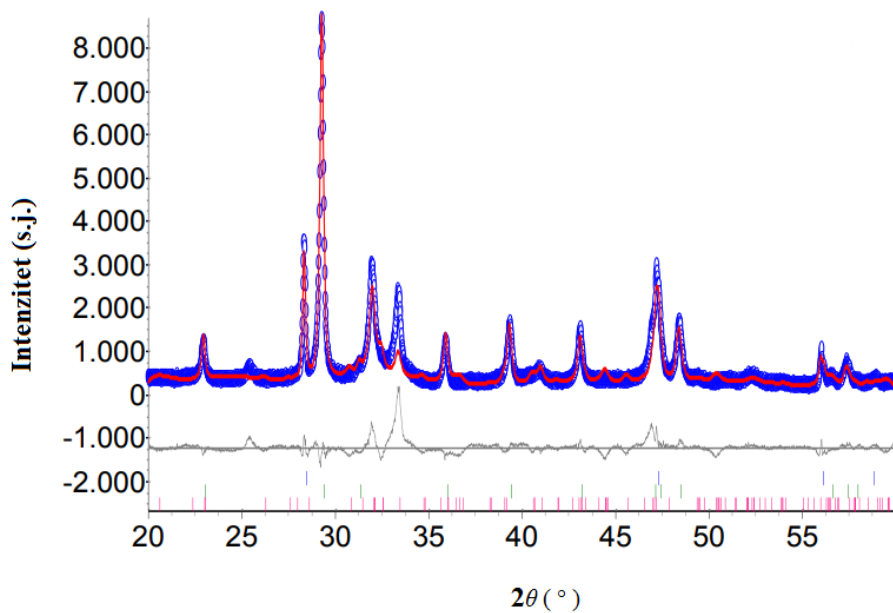
nakon toplinske obrade pokazuju povećanje intenziteta pikova što ukazuje na povećanje kristalnosti. Snimljeni difraktogrami prikazani su crveno, a računski plavo. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ($R_{wp} < 10\%$, $R_{exp} < 3\%$). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma kalcita, Ca_2SiO_4 i silicija (standard) prikazani su na dnu slike.



Slika 11. Rietveldova analiza difraktograma nedopiranog $CaCO_3$ nakon toplinske obrade.



Slika 12. Rietveldova analiza difraktograma CaCO_3 dopiranog silicijem ($\text{CaCO}_3\text{-Si1}$) nakon toplinske obrade.



Slika 13. Rietveldova analiza difraktograma CaCO_3 dopiranog silicijem ($\text{CaCO}_3\text{-Si2}$) nakon toplinske obrade.

Daljnjom obradom podataka pomoću Rietveldove metode utočnjavanja uz dodatak 5,0 wt% silicija kao standarda ustanovljeno je da uz kalcit i kalcijev silikat (Ca_2SiO_4) dolazi do nastajanja značajnog udjela amorfne faze čiji udio raste povećanjem dodanog (3-aminopropil)trietoksisilana prije toplinske obrade (tablica 2). Nakon toplinske obrade uzorka CaCO_3 dolazi do raspada dijela kalcijeva karbonata na ugljikov dioksid i kalcijev oksid prema reakciji (2):

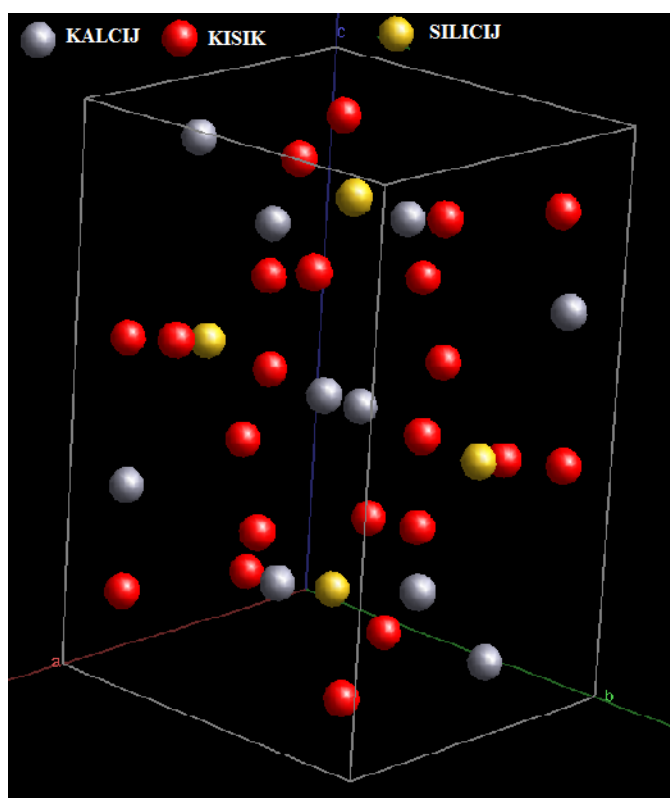


Toplinski raspad kalcijeva karbonata počinje na temperaturi od 700 °C, a potpuni raspad događa se pri temperaturi od 800 °C [44]. U ovom radu uzorci su toplinski obrađeni pri 600 °C te se može zaključiti kako je uzorak CaCO_3 nestabilan i dolazi do raspada pri nižim temperaturama. Toplinskom obradom uzoraka $\text{CaCO}_3\text{-Si1}$ i $\text{CaCO}_3\text{-Si2}$ ne dolazi do raspada kalcijeva karbonata na CaO te se može pretpostaviti da je to rezultat prisutnosti SiO_4^{4-} tetraedra.

Tablica 2. Kvantitativan fazni sastav izračunat pomoću Rietveldove metode utočnjavanja difraktograma pripremljenih toplinski obrađenih uzoraka.

Uzorak	Kalcit (wt%)	Ca_2SiO_4 (wt%)	Amorfna faza (wt%)	CaO (wt%)
CaCO_3	70,13	-	27,92	1,96
$\text{CaCO}_3\text{-Si1}$	58,38	9,02	32,60	-
$\text{CaCO}_3\text{-Si2}$	30,86	20,29	48,85	-

Ca_2SiO_4 je nastao kao posljedica zadržavanja organske faze na površini uzorka prije toplinske obrade. Toplinskom obradom organska faza se uklanja, a na površini zaostaju SiO_4^{4-} tetraedri koji reagiraju s kalcijem. Porastom udjela silicija u uzorcima udio kalcita se smanjuje, a udio Ca_2SiO_4 faze povećava. Prisutnost silicija utječe na nastajanje amorfne faze nakon toplinske obrade, gdje se dio silicija smješta u Ca_2SiO_4 , a dio u amorfni kalcijev karbonat. Na slici 14 prikazana je struktura kristalne rešetke larnita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

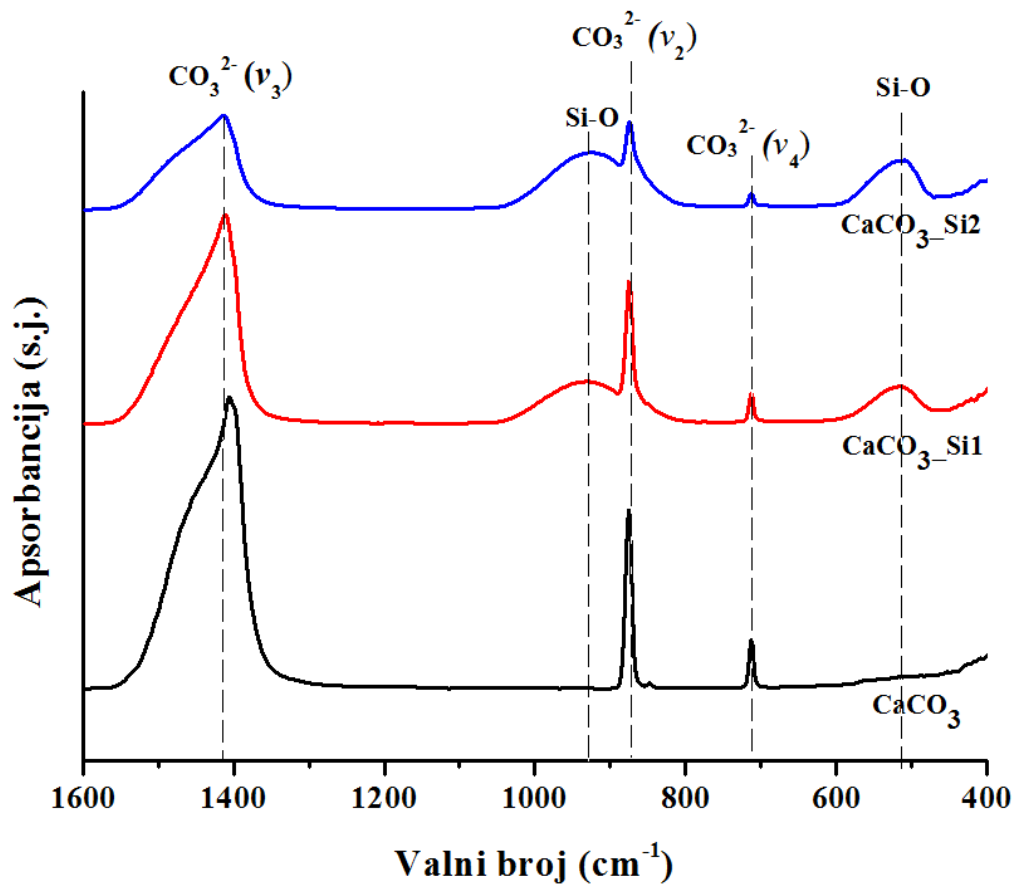


Slika 14. Struktura kristalne rešetke larnita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

Biokeramika na temelju silikata često je korišten materijal u inženjerstvu koštanog tkiva zbog boljih mehaničkih svojstava u odnosu na hidroksiapatit i trikalcijev fosfat. Dodatno, zbog mogućnosti stvaranja Si-OH veza na površini materijala potiče kristalizaciju apatita na njegovoj površini [45]. Mnoga istraživanja usmjerena su na istraživanja CaSiO_3 i bioaktivnog stakla, dok je Ca_2SiO_4 rijetko istraživana za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. Istraživanja su pokazala da Ca_2SiO_4 posjeduje dobru bioaktivnost i biokompatibilnost te je moguće kako će daljnja istraživanja biti usmjerena na njegovu primjenu u regeneraciji koštanog tkiva. Choudhary i suradnici pripremili su kompozitni materijal na temelju biopolimera kitozana i Ca_2SiO_4 kao anorganske faze. Nakon 5 dana namakanja u simulirajućem biološkom mediju došlo je do nastajanja hidroksiapatita na površini materijala [45].

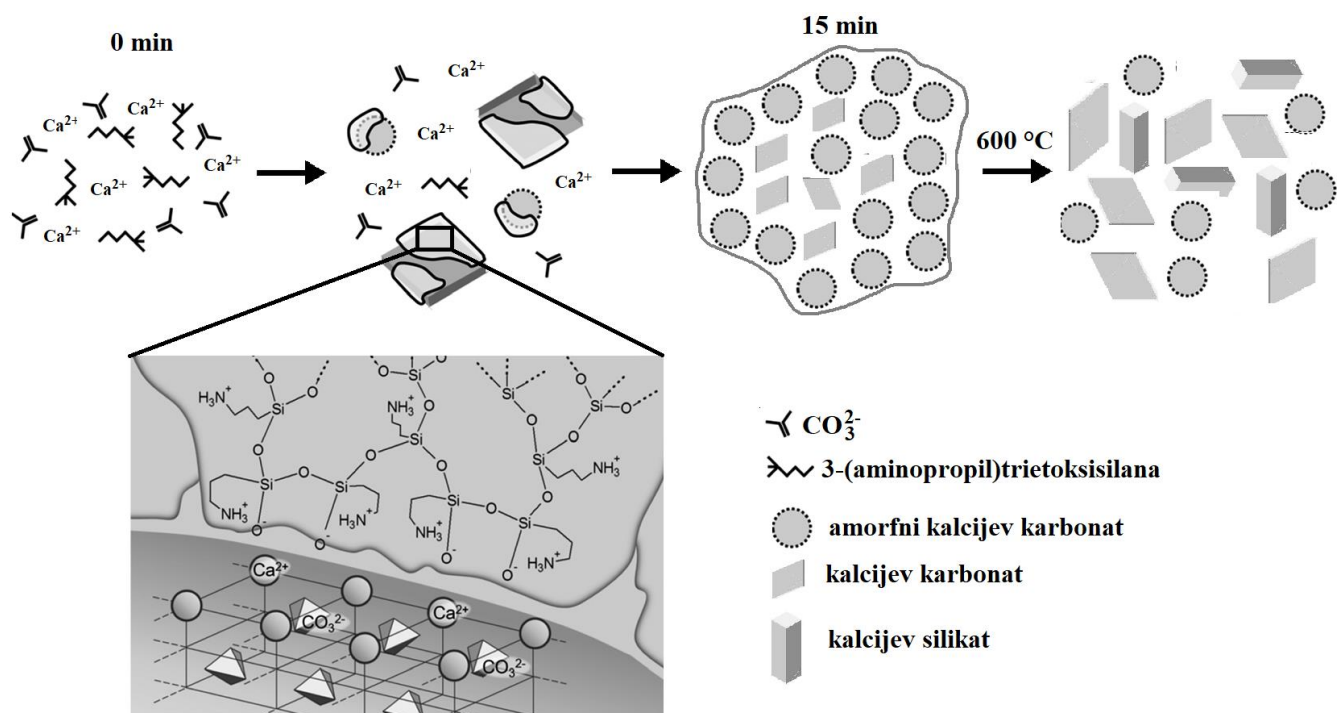
4.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom toplinski obrađenih uzoraka

Na slici 15 prikazani su FTIR spektri uzorka CaCO_3 , $\text{CaCO}_3\text{-Si1}$ i $\text{CaCO}_3\text{-Si2}$ toplinski obrađenih na $600\text{ }^\circ\text{C}$. FTIR spektar pripremljenih uzoraka prikazuje karakteristične vrpce za CO_3^{2-} skupinu u području od 1580 do 1295 cm^{-1} , 879 cm^{-1} i 713 cm^{-1} . Uzorci $\text{CaCO}_3\text{-Si1}$ i $\text{CaCO}_3\text{-Si2}$ prikazuju karakteristične apsorpcijske vrpce za Si-O veze na 922 cm^{-1} i 514 cm^{-1} . [36, 37, 43]. Dodatno, Choudhary i suradnici vrpce na 922 cm^{-1} prepisuju Si-O-Ca vezama koje pripadaju Ca_2SiO_4 fazi [45]. Uzorci dopirani silicijem pokazuju apsorpcijske vrpce nižeg intenziteta za CO_3^{2-} skupinu, a mogući razlog tomu je prisutnost SiO_4^{4-} tetraedara.



Slika 15. FTIR spektri toplinski obrađenih uzoraka.

Prema dobivenim rezultatima na slici 16 shematski je prikazana sinteza dvofaznog sustava kalcita i Ca_2SiO_4 iz $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i (3-aminopropil)trietoksisilana u otopini metanola i struji CO_2 . (3-aminopropil)trietoksisilan adsorbira se na rastuće jezgre kalcijeva karbonata, ometa prijenos iona te dovodi do trenutne stabilizacije amorfne faze. Istovremeno, dolazi do adsorpcije (3-aminopropil)trietoksisilana na površini nastalih kristala kalcijeva karbonata, stvarajući mrežu koju potvrđuje prisutnost Si–O–Si veza na FTIR spektru prije toplinske obrade. Nakon provođenja reakcije 15 minuta dolazi do stvaranja amornog kalcijevog karbonata i kristalne faze sve tri polimorfne modifikacije kalcijeva karbonata okružene s umreženim (3-aminopropil)trietoksisilanom. Toplinskom obradom tako pripremljenih uzoraka dolazi do uklanjanja organske faze i zaostajanja SiO_4^{4-} tetraedara, koji u reakciji s Ca^{2+} ionima tvore kalcijev silikat [37].



Slika 16. Koraci u sintezi dvofaznog sustava kalcita i kalcijeva silikata.

5. ZAKLJUČAK

Pripravljene su trofazni uzorci vaterita, kalcita i aragonita dopirani silicijevim ionima. Uzorci su toplinski obrađeni pri 600 °C. Dobiveni uzorci karakterizirani su instrumentalnim metodama rendgenske difrakcijske analize i FTIR spektroskopije, dok su dobiveni difraktogrami daljnje istraživani Rietveldovom metodom pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

Rezultati potvrđuju nastajanje vaterita, kalcita i aragonita uz taloženje prekursora na površini materijala. Toplinskom obradom uzoraka dolazi do transformacije aragonita i vaterita u kalcit te nastajanja nove faze Ca_2SiO_4 .

Dobiveni materijali nakon toplinske obrade koristit će se u daljnjim istraživanjima za pripremu karbonatnog hidroksiapatita i visokoporoznih materijala za moguću primjenu u inženjerstvu tkiva.

6. LITERATURA

- [1] Felicity, R.A.J.R., Oreffo, O.C.R, Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **292** (2002) 1-7.
- [2] Amini, A.R., Laurencin, T.C, Nukavarapu, S.P., Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, **40** (2012) 363-408.
- [3] Moguš-Milanković, A., Tri generacije biomaterijala, *Kemija u industriji*, **54** (2005) 131-134.
- [4] Stevens, M.M., Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials today*, **11** (2008) 18-25
- [5] Schröder, R., Pohlit, H., Schüler, T., Panthöfer, M., Unger, E.R., Freyc, H., Tremel, W., Transformation of vaterite nanoparticles to hydroxycarbonate apatite in a hydrogel scaffold: relevance to bone formation, *Journal of Materials Chemistry B*, **3** (2015) 7079-7089.
- [6] Bianco, A., Cacciotti, I., Lombardi, M., Montanaro, L., Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sinterability, *Materials Research Bulletin*, **44** (2009) 345-354.
- [7] Fielding, G., Bose, S., SiO₂ and ZnO Dopants in 3D Printed TCP Scaffolds Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in vivo, *Acta Biomaterialia*, **9** (2013) 9137-9148.
- [8] Bissell, M.J., Kenny, P.A., Radisky, D.C., Microenvironmental Regulators of Tissue Structure and Function Also Regulate Tumor Induction and Progression: The Role of Extracellular Matrix and Its Degrading Enzymes, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **70** (2005) 343-356.
- [9] Ivanković, M., Bauer, L., Ressler, A., Rogina, A., Antunović, M., Ivanković, H., Priprava 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva, *Kemija u industriji*, **68** (2019) 437-447.
- [10] Xiaohua, L., Ma, P.X., Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, **32** (2004) 477-486.

[11] Chen, Q., Roether, J.A., Boccaccini, A.R., (2008) Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. U: Ashammakhi, N., Reis, Chiellini R., Chiellini, F.; ur; Topics in Tissue Engineering, Vol. 4.

[12] Obata, A., Ozasa, H., Kasuga, T., Jones, J.R., Cotton wool-like poly(lactic acid)/vaterite composite scaffolds releasing soluble silica for bone tissue engineering, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **24** (2013) 1649–1658.

[13] Ghafar, S.L.M.A., Hussein, M.Z., Zakaria, Z.A.B., Synthesis and Characterization of Cockle Shell-Based Calcium Carbonate Aragonite Polymorph Nanoparticles with Surface Functionalization, Hindawi Journal of Nanoparticles, **2017** (2017) 12.

[14] Barrère, F., van Blitterswijk, C.A., de Groot, K., Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics, International Journal of Nanomedicine, **1** (2006) 317-332.

[15] <https://www.britannica.com/science/calcite> (pristup, 2.lipnja 2014)

[16] Filipović, I., Lipaović, S., (1995) Elementi 2. (IIA) skupine. Zemnoalkalijski metali: Kalcij. U: Bešenić, D., ur., *Opća i anorganska kemija II. Dio*. IX. Izdanje. Zagreb: Školska knjiga, 887-903.

[17] de Leeuw, N.H., Parker, S.C., Surface Structure and Morphology of Calcium Carbonate Polymorphs Calcite, Aragonite, and Vaterite: An Atomistic Approach, The Journal of Physical Chemistry B, **102** (1998) 2914-2922.

[18] Naoto, Y., Higashimura, E., Saeki, Y., Catalytic Biomineralization of Fluorescent Calcite by the Thermophilic Bacterium *Geobacillus thermoglucosidasius*, Applied and environmental microbiology, **76** (2010) 7322-7327.

[19] Dizaj, S.M., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.H., Adibkia, K., Lotfipour, F., Calcium Carbonate Nanoparticles; Potential in Bone and Tooth Disorders, Pharmaceutical Sciences, **20** (2015) 175-182.

- [20] Chróścicka, A., Jaegermann, Z., Wójtowicz, J., Ratajska, A., Sadło, J., Wychowański P., Hoser, G., Michałowski, S., Przybylski, J., Lewandowska-Szumieł, M., Synthetic Calcite as a Scaffold for Osteoinductive Bone Substitutes, *Annals of Biomedical Engineering*, **44** (2016) 2145-2157.
- [21] Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomaterialia*, **9** (2013) 7591-7621.
- [22] Wang, L., Sondi, I., Matijević, E., Preparation of Uniform Needle-Like Aragonite Particles by Homogeneous Precipitation, *Journal of Colloid and Interface Science*, **218** (1999) 545-553.
- [23] Chakrabarty, D., Mahapatra, S., Aragonite crystals with unconventional morphologies, *Journal of materials chemistry*, **9** (1999) 2953-2957.
- [24] Birchall, J.D., Thomas, N.L., On the architecture and function of cuttlefish bone, *Journal of materials science*, **18** (1983) 2081-2086.
- [25] Matta, C., Szűcs-Somogyia, C., Konb, E., Robinsond, D., Neufelde, T., Altschulere, N., Bertaf, A., Hangodyf, L., Verébg, Z., Zákány, R., Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is enhanced by an aragonite scaffold, *Differentiation*, **107** (2019) 24-34.
- [26] Feng, Q., (2011), Principles of Calcium-Based Biomineralization: Calcium-Based Biominerals in Aquatic Organisms. U: Müller, W.E.G , ur. *Molecular Biomineralization: Aquatic Organisms Forming Extraordinary Materials*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer, 143-150.
- [27] Akram, M., Ahmed, R., Shakir, I., Ibrahim, W.A.W., Hussain, R., Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources, *Journal of Materials Science*, **49** (2014) 1461-1475.

- [28] Kamba, A.S., Bakar Zakaria, Z.A., Osteoblasts Growth Behaviour on Bio-Based Calcium Carbonate Aragonite Nanocrystal, *BioMed Research International*, **2014** (2014) 215097.
- [29] Milovac, D., Weigand, I., Kovacčić, M., Ivanković, M., Ivanković, H., Highly porous hydroxyapatite derived from cuttlefish bone as TiO₂ catalyst support, *Processing and Application of Ceramics*, **12** (2018) 136-142.
- [30] Ressler, A., Cvetnić, M., Antunović, M., Marijanović, I., Ivanković, M., Ivanković, H., Strontium Substituted Biomimetic Calcium Phosphate System Derived From Cuttlefish Bone, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **108** (2020) 1697-1709.
- [31] Lemos, A.F., Rocha, J.H.G., Quaresma, S.S.F., Kannan, S., Oktar, F.N., Agathopoulos, S., Ferreira, J.M.F., Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally from nacreous material, *Journal of the European Ceramic Society*, **26** (2006) 3639-3646.
- [32] Trushina, D.B., Bukreeva, T.V., Kovalchuk, M.V., Antipina, M.N., CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications, *Materials Science & Engineering: C*, **45** (2014) 644-658.
- [33] Medeiros, S.K., Albuquerque, E.L., Maia, F.F.Jr., Caetano, E.W.S., Freire, V.N., First-principles calculations of structural, electronic, and optical absorption properties of CaCO₃ Vaterite, *Chemical Physics Letters*, **435** (2007) 59-64.
- [34] Maeda, H., Maquet, V., Kasuga, T., Chen, Q.Z., Roether, J.A., Boccaccini, A.R., Vaterite deposition on biodegradable polymer foam scaffolds for inducing bone-like hydroxycarbonate apatite coatings, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18** (2007) 2269-2273.
- [35] Gibson, I.R., Best, S.M., Bonfield, W., Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite, *Journal of Biomedical Materials Research*, **44** (1999) 422-428.

- [36] Yamada, S., Ota, Y., Nakamura, J., Sakka, Y., Kasuga, T., Preparation of siloxane-containing vaterite doped with magnesium, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, **122** (2014) 1010-1015.
- [37] Nakamura, J., Poologasundarampillai, G., Jonesb, J.R., Kasuga, T., Tracking the formation of vaterite particles containing aminopropyl-functionalized silsesquioxane and their structure for bone regenerative medicine, *Journal of Materials Chemistry B*, **1** (2013) 4446-4454.
- [38] Obata, A., Tokuda, S., Kasuga, T., Enhanced *in vitro* cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites, *Acta Biomaterialia*, **5**(1) (2009) 57-62.
- [39] Maslen, E.N., Streltosov, V.A., Streltsova, N.R., X-ray study of the electron density in calcite, CaCO₃, *Journal Acta Crystallographica*, **B49** (1933) 636-641.
- [40] Caspi, E.N., Pokroy, B., Lee, P.L., Quintana, J.P., Zolotoyabko, E., On the structure of aragonite, *Journal Acta Crystallographica*, **B61** (2005) 129-132.
- [41] Le Bail, A., Ouhenia, S., Chateigner, D., Microtwinning hypothesis for a more ordered vaterite model, *Powder Diffraction*, **26** (2011) 16-21.
- [42] Tsurumi, T., Hirano, Y., Kato, H., Kamiya, T., Daimon, M., Crystal structure and hydration of belite, *Ceramic Transactions*, **40** (1994) 19-25.
- [43] Ren, F.Z., Leng, Y., Carbonated apatite, Type-A or Type-B?, *Key Engineering Materials* **493-494** (2012) 293-297.
- [44] Karunadasa, K.S.P., Manorate, C.H., Pitawala, H.M.T.G.A., Rajapakse, R.M.G., Thermal decomposition of calcium carbonate (calcite polymorph) as examined by in-situ high-temperature X-ray powder diffraction, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **134** (2019) 21-28.

[45] Choudhary, R., Koppala, S., Srivastava, A., Sasikumar, S., *In-vitro* bioactivity of nanocrystalline and bulk larnite/chitosan composites: comparative study, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **74** (2015) 631-640.