

# Sinteza i izrada makroporozne bioaktivne keramike

---

Klanac, Patricija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:149:236305>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Patricija Klanac  
**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Patricija Klanac

**SINTEZA I IZRADA MAKROPOROZNE BIOAKTIVNE  
KERAMIKE**

**ZAVRŠNI RAD**

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vilko Mandić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. izv. prof. dr. sc. Vilko Mandić
2. izv. prof. dr. sc. Fabio Faraguna
3. doc. dr. sc. Petar Kassal

Zagreb, rujan 2023.

## **Zahvale**

*Zahvaljujem se mentoru, izv. prof. dr. sc. Vilku Mandiću, na odabranoj temi i ukazanoj prilici za izradu završnog rada.*

*Zahvale asistentu, Florenu Radovanović-Periću, mag. ing. chem. na pomoći, podršci i posvećenom vremenu tijekom izrade završnog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci, motivaciji i ohrabrenju koja je bila ukazana tijekom studiranja.*

## SAŽETAK

Istraživanje novih materijala koji će poboljšati standarde ljudskih života je dovelo do spoznaje različitih funkcija korištenja kalcijevih fosfata, posebice hidroksiapatita (HA) i  $\beta$ -trikalcijevog fosfata ( $\beta$ -TCP).  $\beta$ -TCP pripada sintetički dobivenim bioaktivnim i resorptivnim biomaterijalima. Poznat je po svojim osteokonduktivnim i osteoinduktivnim svojstvima. Oblik samog biomaterijala je važan za njegovu ugradnju *in vivo*. Tu se govori o poroznosti kojoj je svrha omogućavanje boljeg protoka krvi, staničnog razvoja i mehaničke čvrstoće novonastale kosti.

U ovom radu je istražen jedan od načina sinteze  $\beta$ -TCP-a: sinteza u čvrstom stanju (*engl. solid state synthesis*). Cilj rada bio je dobiti čisti i makroporozni  $\beta$ -TCP oblikovanog metodom impregnacije polimerne pjene. Dobivena bioaktivna keramika se identificirala rendgenskom difrakcijom i infracrvenom apsorpcijskom spektrometrijom s Fourierovom transformacijom te dodatno okarakterizirala pregledom na elektronskom mikroskopu. U oba dva slučaja su dobiveni zadovoljavajući rezultati porozne biokeramike sastavljene od  $\beta$ -TCP-a sa malim tragovima pirofosfata.

**Ključne riječi:** Biomaterijali, kalcijevi fosfati,  $\beta$ -trikalcijev fosfat, biokeramika

## SUMMARY

The research of new materials that will improve the standards of human life has led to the realization and finding usage of different functions of calcium phosphates, especially hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP).  $\beta$ -TCP belongs to synthetically obtained bioactive and resorptive biomaterials. It is known for its osteoconductive and osteoinductive properties. The shape of the biomaterial itself is important for its incorporation *in vivo*. Here we are talking about porosity, which purpose is to enable better blood flow, cellular development and mechanical strength of newly formed bone.

In this study, one of the methods of  $\beta$ -TCP synthesis was scrutinized: solid state synthesis. The aim of the work was to obtain pure and macroporous  $\beta$ -TCP formed by the polymer foam impregnation method. The obtained bioactive ceramics were identified by X-ray diffraction and infrared absorption spectrometry with Fourier transformation and additionally characterized by examination on an electron microscope. In both cases, satisfactory results were obtained for porous bioceramics composed of  $\beta$ -TCP with small traces of pyrophosphate.

**Key words:** Biomaterials, calcium phosphates,  $\beta$ -tricalcium phosphate, bioceramics

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. Kalcijevi fosfati .....	4
2.1.1. Podjela kalcijevih fosfata.....	5
2.1.2. Metode sinteze $\beta$ -TCP-a .....	11
2.2. Metode pripreve makroporozne keramike .....	13
2.3. Pretražna elektronska mikroskopija ( <i>engl. scanning electron microscopy, SEM</i> ).....	16
2.4. Difrakcija rendgenskih zraka ( <i>engl. X-ray diffraction, XRD</i> ) .....	17
2.5. Infracrvena apsorpcijska spektrometrija s Fourierovom transformacijom ( <i>engl. Fourier Transform Infrared Spectrometry, FTIR</i> ).....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	19
3.1. Svrha rada.....	19
3.2. Priprema praha .....	19
3.3. Priprava keramike .....	21
3.4. Karakterizacija .....	22
4. REZULTATI .....	24
4.1. Rendgenska difrakcija .....	24
4.2. ATR – FTIR spektri .....	25
4.3. Morfologija i topografija .....	26
5. RASPRAVA .....	28
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. LITERATURA .....	31

# 1. UVOD

Eksplozivnim rastom stanovništva raste i potražnja za biomaterijalima. To su farmakološke inertne tvari dizajnirane za implantaciju unutar živog sustava, odnosno moguću interakciju s biološkim sustavom. Oni potiču regeneraciju brojnih tkiva i služe kao potencijalna zamjena već disfunkcionalnih organa. Do razvoja takvih materijala je dovela sama potreba za poboljšanjem standarda ljudskih života, ali i potreba za smanjenjem opterećenja medicinskih sustava.

Biomaterijali se klasificiraju prema biokompatibilnosti na: bioinertne materijale koji daju minimalne neželjene reakcije u ljudskom tijelu (nehrđajući čelik, titanij, aluminij itd.), bioresorptivne materijale koji se s vremenom razgrade u tijelu i nadomjeste s novonastalim tkivom (trikalcijev fosfat ili kopolimeri polilaktične - poliglikolne kiseline) i na bioaktivne materijale koji stupaju u direktnu interakciju sa tkivom (npr. bioaktivna keramika, bioaktivna stakla, hidroksiapatit itd.). Ovisno o podrijetlu, biomaterijali se mogu kategorizirati na prirodne i sintetičke. Shodno tome, prirodni biomaterijali se dijele na one s proteinskom (kolagen, fibrin) i one s ugljikohidratnom bazom (celuloza, hitin) dok se sintetički biomaterijali dijele na polimere, metale, keramiku i kompozite gdje se kombiniraju minimalno dvije vrste materijala [1]. Postoji i podjela biomaterijala prema načinu njihova vezivanja za tkivo. Tada se govori o gotovo inertnim, poroznim, bioaktivnim i resorptivnim materijalima. Porozni biomaterijali osiguravaju međufaznu fiksaciju urastanjem tkiva u pore na površini ili kroz implantat te se takvo povezivanje naziva biološkom fiksacijom [2].

Njihova je primarna namjena korištenje u biomedicinskom inženjerstvu i u medicini, pogotovo na područjima ortopedske kirurgije ili traume, ali i u dentalnoj medicini. Prednost ovakvih materijala su njihova dostupnost, sterilnost, sigurnost, reproducibilnost, troškovna isplativost i gledajući širu sliku, to što pomažu kod smanjenja mortaliteta [3].

Bioaktivna makroporozna keramika pripada sintetički kreiranim bioaktivnim poroznim materijalima koji su namijenjeni direktnom vezivanju za kosti. Pritom se stvara okolina kompatibilna sa osteogenezom gdje dolazi do spontanog vezivanja i integracije između živog i neživog materijala, odnosno između kosti i bioaktivne keramike [2, 3]. Postoje razni oblici

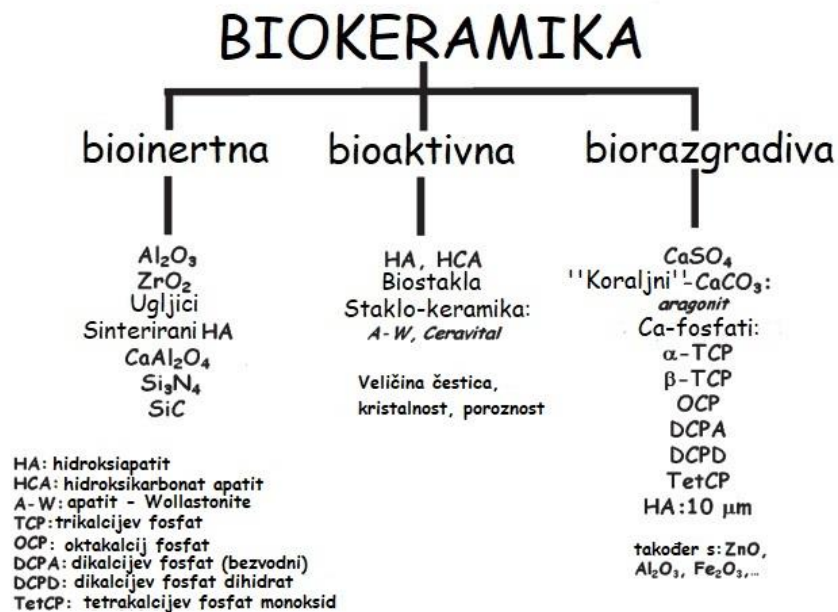


bioaktivne keramike poput različitih oksida (npr.  $ZrO_2$ ,  $Al_2O_3$ ), karbida (npr.  $SiC$ ), karbonata (npr.  $CaCO_3$ ), nitrida (npr.  $Si_3N_4$ ), sulfata (npr.  $CaSO_4$ ), ugljika, stakla i fosfata o kojima će se naknadno detaljnije pričati [4].

Različite bolesti i defekti pripadaju najčešće zastupljenim stanjima koje imaju negativni izravan utjecaj na kvalitetu života pojedinca, osobito kod starijih osoba. Moguće rješavanje ili smanjenje tih problema je dovelo do razvoja prethodno navedenih materijala. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja samih biomaterijala i njihove sinteze kako bi se poboljšala njihova biokompatibilnost, bioaktivnost i biorazgradivost [5].

## 2. OPĆI DIO

Keramika svojom strukturom oponaša strukturu prirodnog koštanog tkiva i zbog toga se smatra vrlo atraktivnim materijalom koji se koristi u ovom području [4]. Već prethodno rečeno, materijali dizajnirani da imaju interakciju sa živim tkivom zovu se biokeramika te je njihova podjela s obzirom na reaktivnost sa živim tkivom prikazana na slici 1. Karakteriziraju ih veća tlačna čvrstoća, izvanredna biološka inertnost, visoka točka taljenja, niska električna i toplinska vodljivost [6]. Međutim, bioaktivna keramika ima manju mehaničku čvrstoću, ali veći modul elastičnosti od kosti što rezultira prenošenju kompletnog tereta na implantat i tako dovodi do zaštite kosti od stresa i mogućeg oštećenja implantata. Naime, kost mora biti podvrgnuta odgovarajućem stresu kako bi ona ostala zdrava, suprotno dolazi do slabljenja i propadanja kosti [2]. Porozna biokeramika funkcionira kao "spremnik" za stanice ili molekule koje induciraju rast i samoregeneraciju tkiva. Kod porozne biokeramike, s porastom veličine pora drastično se smanjuje mehanička čvrstoća te se zbog toga koristi kao implantat na određenim dijelovima tijela na kojima nema prevelikog tereta, odnosno stresa na kosti. U tu svrhu se široko primjenjuje kalcijev fosfat zbog svoje izvrsne biokompatibilnosti [7].



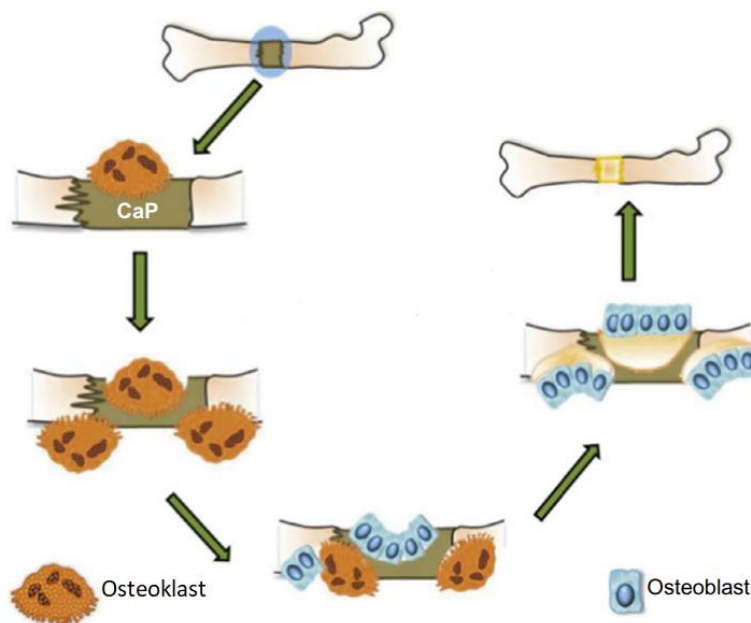
Slika 1. Podjela biokeramike prema reaktivnosti sa živim tkivom [4]

## 2.1. Kalcijevi fosfati

Glavna mineralna komponenta kosti je kombinacija amornog kalcijevog fosfata i hidroksiapatita (HA). Kalcijevi fosfati pripadaju klasi bioaktivnih materijala koji se široko koriste za rast i popravak koštanog tkiva. Posjeduju površinska svojstva koja podržavaju adheziju i proliferaciju osteoblasta (osteokondukcija) i stimuliraju stvaranje nove kosti (osteoindukcija). Međutim, nemaju sve vrste kalcijevih fosfata isti biološki učinak *in vivo*. Dok je većina osteokonduktivna, samo su određeni tipovi osteoinduktivni. Takve razlike u njihovim sposobnostima povezane su sa suptilnim razlikama u fizičkim i kemijskim svojstvima poput hrapavosti površine, topljivosti, omjera kalcija i fosfata (Ca/P) ili kristalnosti [8]. Većina biokeramike je biorazgradiva u fiziološkom okruženju, a stopa resorpcije, odnosno biorazgradnje ovisi o Ca/P omjeru – kako se omjer smanjuje, tako se povećava resorpcija [9].

### *Djelovanje osteoklasta i osteoblasta*

Na slici 2. prikazano je djelovanje osteoklasta na mjesto implantacije kalcijevog fosfata (CaP). Osteoklast kao velika pokretna koštana stanica može razgrađivati anorganski i organski koštani matriks [10]. Tako dolazi do resorpcije kalcijevog fosfata i stvaranja nove kosti pod utjecajem osteoblasta [9].



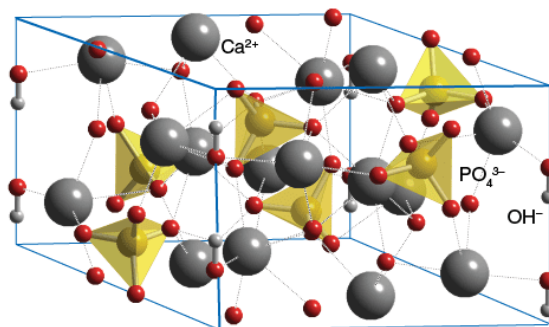
**Slika 2.** Slikovni prikaz resorpcije CaP i formiranja nove kosti [9]

### 2.1.1. Podjela kalcijevih fosfata

Najčešći oblici biokeramike pripadaju upravo kalcijevim fosfatima. To je naziv za grupu mineralnih spojeva koji sadrže kalcijev ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) zajedno s ionima ortofosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), metafosfata ili pirofosfata ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) uz povremene dodatke iona vodika ili hidroksida [11]. Ovisno o strukturi i omjeru Ca/P postoji više oblika kalcijevih fosfata:

#### a) Hidroksiapatit (HA)

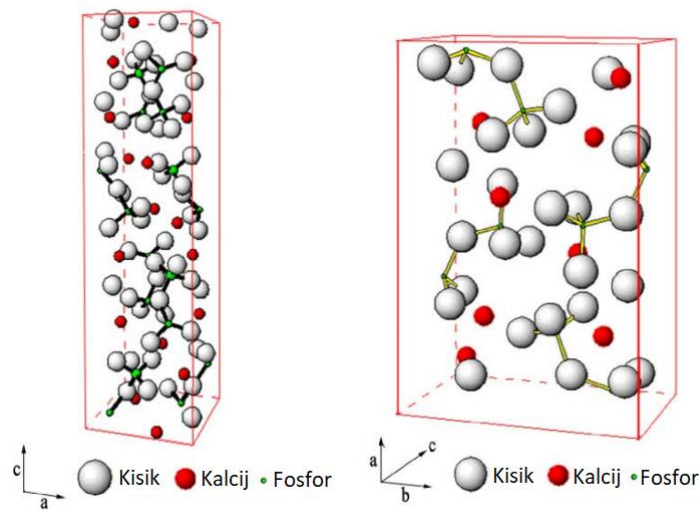
S odgovarajućom formulom ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), hidroksiapatit pripada najpoznatijem i najviše korištenom obliku biokeramike zbog svoje velike kemijske i strukturne sličnosti biološkom apatitu u kostima [12]. HA ima dva glavna kristalna oblika: apatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$  ( $\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{OH}$  ili kombinirano) i tzv. *b-withlockite*  $\text{Ca}_9(\text{MgFe})(\text{PO}_4)_6\text{PO}_3\text{OH}$  [14]. Njegova struktura odgovara heksagonskom kristalnom sustavu. Stehiometrijski hidroksiapatit ima omjer Ca/P 1.67 i smatra se osteokonduktivnim, ali ne i osteoinduktivnim. To svojstvo se može prilagoditi putem ionskih supstitucija [12, 13]. Oba oblika su kompatibilna s tkivom, s time da je struktura apatita sličnija strukturi kosti više od *b-withlockita*. Zbog svoje sposobnosti stvaranja izravnih kemijskih veza sa tvrdim, tj. koštanim tkivom, može se koristiti kao umjetna kost, implantat ili kao obloga za npr. bioinertne materijale [14]. Hidroksiapatit se može dobiti prirodnim putem preradom morskih koralja, kosti i školjaka ili sintetičkim putem iz kalcijevog pirofosfata, dinatrijevog hidrogenfosfata i dikalijevog hidrogenfosfata [15, 16].



**Slika 3.** Struktura hidroksiapatita [17]

b) Pirofosfat (CPP)

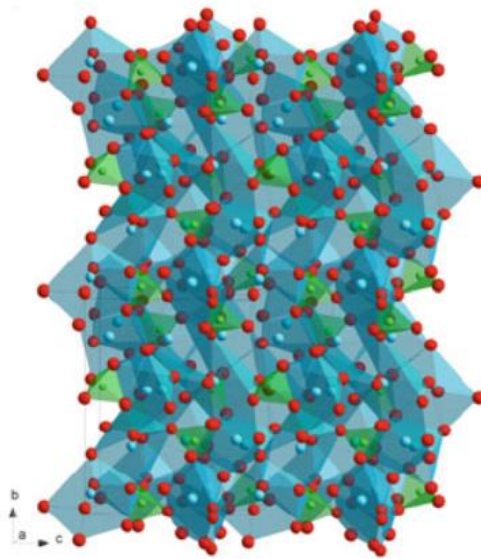
Kalcijev pirofosfat ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) je netopljiva kalcijeva sol koja sadrži pirofosfatni anion. Postoji u više oblika: bezvodni (DCP), dihidrat (DCPD,  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) i tetrahidrat ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ). Stabilni tetrahidrat ima i romboedarsku i monoklinsku strukturu, dihidrat ima triklinSKU i heksagonsku, a bezvodni oblik ima tri polimorfa -  $\alpha$ -,  $\beta$ - i metastabilni  $\gamma$ - oblik. Visokotemperaturni oblik  $\alpha$ - je monoklinski, a niskotemperaturni oblik  $\beta$ - je tetragonske strukture [18]. Omjer Ca/P je 1. Dikalcijev fosfat dihidrat je osteokonduktivni biomaterijal velikog potencijala kao bioresorptivni cement za regeneraciju kosti. Bezvodni oblik ne formira netopljivi hidroksiapatit *in vivo*, resorbira se brže nego dihidratni oblik te stimulira okomitu koštanu augmentaciju i regeneraciju koštanih defekata i kod životinja i kod ljudi. Također može postići veće količine regeneracije kosti nego materijali na bazi hidroksiapatita [19].



**Slika 4.** Kristalne strukture  $\alpha$ - (desno) i  $\beta$ - (lijevo) pirofosfata [20]

c) Tetrakalcij fosfat (TTCP)

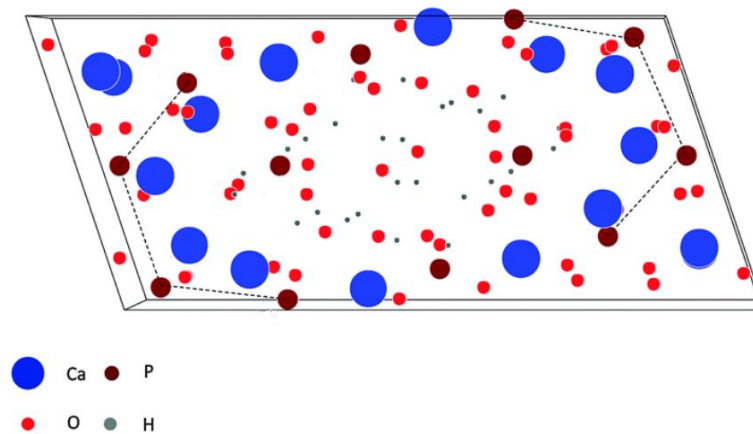
Monoklinski tetrakalcij fosfat  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  je jedini oblik kalcijevih fosfata s omjerom Ca/P većim nego 1.67 od HA i iznosi 2. TTCP se ne može sintetizirati u vodenom okruženju jer zbog kisikovog atoma u svojoj formuli, u lužnatom vodenom mediju stvara taloge koji sadržavaju hidroksilne ione. Zbog tog je razloga sinteza limitirana na sintezu u čvrstom stanju. Budući da je spoj metastabilan, sinteza čistog TTCP-a zahtijeva ubrzano hlađenje na sobnu temperaturu ili odustnost vlage kako bi se spriječilo razlaganje u hidroksiapatit, živo vapno (CaO), kalcijev karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) i  $\beta$ -trikalcijev fosfat. Među svim kalcijevim fosfatima, TTCP ima najveću topljivost pri  $\text{pH} < 4$  [21]. Biokompatibilan je i osteokonduktivan, ali usprkos svojoj velikoj topljivosti, slabo je biorazgradiv [22, 23].



*Slika 5.* Kristalna struktura tetrakalcij fosfata (TTCP) [24]

d) Oktakalcijev fosfat (OCP)

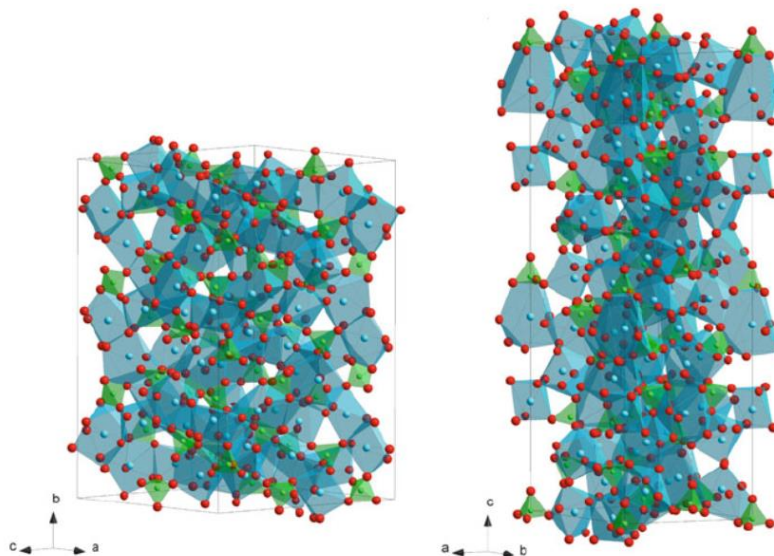
Hidroksiapatitu strukturno sličan oktakalcijev fosfat pentahidrat  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  mogući je prekursor koštanog kristala apatita. Nedavne studije ukazuju na njegovu potencijalnu ulogu kao zamjenskog materijala za kosti zbog visoko osteokonduktivnih i biorazgradivih karakteristika. Stehiometrijski sastav OCP-a ima molarni omjer Ca/P od 1.33. Njegova struktura pripada triklinskom kristalnom sustavu [25]. Iako oktakalcijev fosfat prikazuje dobra svojstva u smislu rasta kostiju, vrlo strogi zahtjevi za sintezu otežavaju masovnu proizvodnju. Koristi se u ortopediji i u dentalnoj medicini. Nalazi se u obliku različitih kompozita: želatina-OCP, kolagen-OCP, alginat-OCP i kompozit s hijarulonskom kiselinom. Kompoziti pokazuju visoku osteokondukciju, biorazgradivost i poboljšanu regeneraciju kostiju u usporedbi sa čistim OCP-om [26].



**Slika 6.** Prikaz jedinične ćelije oktakalcijevog fosfata u smjeru (001) [27]

### e) Ortofosfati

Izuzev kalcijevog pirofosfata, većina prethodno navedenih fosfata pripada skupini ortofosfata (tablica 1.) jer sadrže ortofosfatnu  $\text{PO}_4^{3-}$  skupinu. Kalcijevih ortofosfata ima u izobilju i u prirodi i u živim organizmima. MCPM je i najkiseliji i najviše topiv spoj u vodi od svih navedenih. Pri temperaturama većim od  $100^\circ\text{C}$  otpušta vodu i prelazi u bezvodni oblik (MCPA). Doduše, čisti MCPM nije biokompatibilan s kostima pa se u medicini koristi samo kao jedan od sastojaka kalcij-orofosfatnih cemenata. Njegov bezvodni oblik također nije biokompatibilan i uopće se ne koristi u medicini. Trikalcij fosfat (TCP) postoji u dva oblika:  $\alpha$ - i  $\beta$ -. Iako su istog kemijskog sastava, razlikuju se po strukturi i po topljivosti pri čemu je  $\alpha$ - oblik monoklinske strukture i otapa se brže i  $\beta$ - koji je romboedarske kristalne strukture i ujedno stabilniji pri sobnoj temperaturi. Kako molarni omjer Ca/P pada tako se povećava brzina otapanja i prema tome se TCP brže resorbira od HA.  $\beta$ -TCP se dobiva reakcijama u čvrstom stanju pri visokim temperaturama iznad  $800^\circ\text{C}$  dok na temperaturama iznad  $1125^\circ\text{C}$  prelazi u  $\alpha$ - oblik [28]. Zbog bolje reaktivnosti u vodenim sustavima,  $\alpha$ -TCP hidrolizira do mješavine drugih kalcijevih fosfata.  $\beta$ -TCP se zbog svoje izvrsne osteokondukcije i biokompatibilnosti uglavnom koristi za pripremu biorazgradive keramike u obliku gustih i makroporoznih granula i blokova dok se  $\alpha$ -TCP pretežno koristi kao fini prah u pripremi kalcijevih fosfatnih cemenata [29, 30].



**Slika 7.** Kristalne strukture  $\alpha$ - (lijevo) i  $\beta$ - (desno) trikalcijevog fosfata [24]



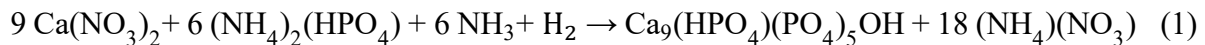
**Tablica 1.** Prikaz glavnih svojstava postojećih kalcijevih ortofosfata, njihovih formula i Ca/P omjera [28].

Naziv	Formula	Ca/P omjer	Topljivost pri 25°C u mol/L - log K <sub>s</sub>	Topljivost pri 37°C u mol/L - log K <sub>s</sub>	Raspon pH stabilnosti u vodenim otopinama pri 25°C
Monokalcijev fosfat monohidrat (MCPM)	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O	0.5	1.14	Nema podataka	0.0 – 2.0
Bezvodni monokalcijev fosfat (MCPA)	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.5	1.14	Nema podataka	Stabilan na >100°C
Dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD)	CaHPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	1.0	6.59	6.63	2.0 – 6.0
Bezvodni dikalcijev fosfat (DCPA)	CaHPO <sub>4</sub>	1.0	6.90	7.02	Stabilan na >100°C
Oktakalcijev fosfat (OCP)	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	1.33	96.6	95.9	5.5 7.0
α – trikalcijev fosfat (α – TCP)	α – Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.5	25.5	25.5	Ne može se istaložiti iz vodene otopine
β – trikalcijev fosfat (β – TCP)	β – Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.5	28.9	29.5	Ne može se istaložiti iz vodene otopine
Amorfni kalcijev fosfat (ACP)	Ca <sub>x</sub> H <sub>y</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>z</sub> * nH <sub>2</sub> O, n = 3–4.5; 15–20% H <sub>2</sub> O	1.2 – 2.2	Ne može se precizno izmjeriti	Ne može se precizno izmjeriti	~ 5 – 12
Hidroksiapatit s manjim udjelom kalcija (CDHA)	Ca <sub>10-x</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6-x</sub> (OH) <sub>2-x</sub> (0 < x < 1)	1.5 – 1.67	~ 85.1	~ 85.1	6.5 – 9.5
Hidroksiapatit (HA)	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	1.67	116.8	117.2	9.5 – 12
Fluorapatit (FA)	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> F <sub>2</sub>	1.67	120.0	119.2	7 – 12
Tetrakalcijev fosfat (TTCP)	Ca <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O	2.0	38 - 44	37 – 42	Ne može se istaložiti iz vodene otopine

### 2.1.2. Metode sinteze $\beta$ -TCP-a

#### 1) Mokra precipitacija (engl. wet precipitation) i termalna konverzija

Jedna od metoda sinteza  $\beta$ -TCP-a je tzv. termalna konverzija kojom se amorfni kalcijev fosfat (ACP) ili hidroksiapatit s manjim udjelom kalcija (CDHA) podvrgavaju temperaturama iznad 650-750°C. Materijali koji se koriste za vodeno taloženje (engl. *aqueous precipitation*) ACP-a i CDHA su kalcijev nitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), kalcijev hidroksid ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), amonijev hidrogen fosfat ( $(\text{NH}_4)_2(\text{HPO}_4)$ ) i fosforna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Kada se koriste kalcijev nitrat i amonijev hidrogen fosfat potrebno je održavati pH vrijednost stalnim, dodavanjem amonijaka tijekom reakcije taloženja:



Konačna toplinska transformacija dobivenog CDHA u  $\beta$ -TCP je:



$\beta$ -TCP, dobiven ACP ili CDHA pretvorbom više je homogen nego onaj dobiven sintezom u čvrstom stanju. Također, omogućava ugradnju elementnih nečistoća poput magnezija ili cinka u svrhu poboljšanja bioloških, mehaničkih, fizikalnih ili kemijskih svojstava [30].

#### 2) Plamen-sprej sinteza (engl. flame-spray synthesis)

Kalcijev fosfat priprema se pirolizom, odnosno plamenim raspršivanjem pomoću kalcijevog oksida ( $\text{CaO}$ ) otopljenog u 2-etilheksanskoj kiselini i tributil fosfata koji služe kao prekursori. Kroz cijeli proces, koncentracija prekursora se održava konstantnom pomoću ksilena ( $\text{C}_8\text{H}_{10}$ ). Tekuća smjesa se kapilarom uvodi u plamen metan/kisik. Kisik se koristi za dispreziju smjese koja izlazi iz kapilare. Nastale čestice se skupljaju na staklasto-vlaknastom filteru. Provodi se termička obrada pri određenoj temperaturi nakon čega slijedi hlađenje na zraku pri sobnim uvjetima. Dobiva se pravilna struktura sa povezanim mikroporama što pogoduje resorpciji, osteokondukciji i osteoindukciji *in vivo*. Pripremljeni kalcijev fosfat se sastoji od amorfnih nanočestica koje ukazuju da se brzim hlađenjem nakon sinteze, materijal ne može kristalizirati. Za razliku od kalcijevih fosfata pripremljenih mokrim metodama sinteze, ovdje se zamjećuje da pad mase dobivenog produkta ne prelazi 3 % [31].

### 3) *Organska sinteza (engl. organic synthesis)*

Kalcijev dietoksid ( $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ ) se vrlo brzo dodaje u snažno miješanu ortofosfatnu kiselinu ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) i nastaje želatinozni talog kalcijevog fosfata. Zatim se smjesa miješa na željenoj temperaturi i centrifugira. Otopina supernatanta se ukloni, a preostala krutina se osuši pod vakuumom na sobnoj temperaturi. Ovisno o omjeru reaktanta, nastaju drugačiji oblici kalcijevih fosfata među kojima je i trikalcijev fosfat. Ovakva vrsta sinteze omogućava pripremu spojeva visoke čistoće i omogućuje njihov točniji sastav. Organometalni kalcijev dietoksid ima prednost što je izvor kalcija, a uz to oslobađa i konjugiranu bazu  $\text{EtO}^-$  i neutralizira kiselost fosforne kiseline. Samim time, nije potrebno dodatno koristiti baze poput  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  ili  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Druga prednost je što nastaje samo jedan nusprodukt, a to je etanol. Budući da je dielektrična konstanta etanola dosta manja od vode, etanol slabije solvatira, tj. otapa ione nego voda. Posljedica toga je snažno smanjenje topljivosti kalcijevih fosfata, ali korištenje etanola dovodi do veće reaktivnosti spojeva [32].

### 4) *Hidrotermalna sinteza (engl. hydrothermal synthesis)*

Amorfni kalcijev fosfat (ACP) različitih Ca/P omjera (1.25 – 1.55) se dodaje u otopinu neke karboksilne kiseline (metanska, etanska, propanska, butanska ili pentanska). Suspenzija se ultrazvučno miješa i zagrijava u autoklavu. Na kraju se produkt od suspenzije odvaja filtriranjem. Nastanak određenih produkata ovisi o korištenoj kiselini pa će tako kod svih kiselina nastati hidroksiapatit, ali samo kod metanske kiseline mješavina  $\text{HA} + \beta\text{-TCP}$ . Također je važno obratiti pozornost na koncentraciju kiseline, tlak i temperaturu u autoklavu te vrijeme zagrijavanja. Ovom metodom se dobio oblik  $\beta\text{-TCP}$ -a sa smanjenim udjelom kalcija.

Na hidrotermalnu sintezu se gleda kao jednu od moguće češće korištenih metoda upravo zato jer troši manje energije [33].

### 5) *Sol-gel sinteza*

U sol-gel procesu trimetil fosfit ( $((\text{CH}_3\text{O})_3\text{P})$ ) i kalcijev nitrat tetrahidrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) različitih Ca/P omjera otope se u apsolutnom etanolu. Prije toga se određena količina vode doda u otopinu trimetil fosfita, smjesa se ubrzano miješa te se doda kalcijev nitrat tetrahidrat. Miješanje se kratko nastavi, nakon čega se ostavi da miruje na sobnoj temperaturi. Konačna smjesa se nastavi zagrijavati nekoliko dana u vodenoj kupelji sve dok se ne dobije suhi gel bijele boje.

Jednostavan način rada, malo korištenih strojeva i niska cijena osiguravaju dobivanje velike količine različitih oblika kalcijevog fosfata (HA,  $\beta$ -TCP, višefazni-BCP) za daljnju primjenu u inženjerstvu tkiva, koštanih cementa ili implantata [34].

#### 6) *Sinteza u čvrstom stanju (engl. solid state synthesis)*

Općenito,  $\beta$ -TCP se može pripremiti reakcijom u čvrstom stanju koristeći spojeve koji su bogati kalcijem (npr. kalcijev karbonat, kalcijev hidroksid i hidroksiapatit) sa spojevima bogatim fosfatom (npr. dikalcij hidrogenfosfat (DCPA), dikalcij hidrogenfosfat dihidrat (DCPD), kalcijev pirofosfat ili amonijev hidrogenfosfat (( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>( $\text{HPO}_4$ ))) u omjeru Ca/P 1.5. Kako bi se dobio čisti  $\beta$ -TCP potrebno je vrlo temeljito miješanje da bi smjesa bila što više homogena [31]. Prvo se pomiješaju prekursori u omjeru Ca/P od 1.5, dodatno se usitne u tarioniku te se stave miješati u mehanokemijskom mlinu na određeni vremenski period. Naknadno se smjesa prebaci u platinski lončić i stavi u peć na  $\sim 900$  °C kroz određeno vrijeme [35].

## 2.2. Metode priprave makroporozne keramike

Zbog resorptivne prirode  $\beta$ -TBC-a, sve više se pridaje pažnja mikro-, a posebice makroporoznoj strukturi biokeramike jer ona omogućava bolju biološku fiksaciju. Prisutnost međusobno povezanih makropora ( $> 100$   $\mu\text{m}$  u promjeru) dodatno ubrzava proces resorpcije [30]. Dizajn porozne strukture mora sadržavati više od 60% međusobno povezanih pora koje imaju veličinu od 150  $\mu\text{m}$  do 400  $\mu\text{m}$  i najmanje 20% pora čija je veličina manja od 20  $\mu\text{m}$ . Pore manje od 1  $\mu\text{m}$  su prikladne za interakciju s proteinima i uglavnom su odgovorne za bioaktivnost, a one između 1  $\mu\text{m}$  i 20  $\mu\text{m}$  su važne za stanični razvoj. Štoviše, pore veličina između 100  $\mu\text{m}$  i 1000  $\mu\text{m}$  imaju važnu ulogu u rastu stanica i kosti jer su pore ove veličine neophodne za prijenos krvi i imaju prevladavajući utjecaj na mehaničku čvrstoću materijala. Bioresorpcija materijala bi trebala biti vremenski usklađena sa stvaranjem nove kosti. Materijal se treba resorbirati ili degradirati vrlo kratko nakon što je nova kost već formirana. Zbog tog razloga je vrlo važno kontrolirano proizvesti makroporoznu strukturu  $\beta$ -TBC-a koja će omogućiti oksigenaciju kostiju i angiogenezu te su u tu svrhu predloženi brojni pristupi [36]. Neki od njih su: emulzifikacija (*engl. emulsification*), pjenjenje (*engl. foaming*), oblikovanje ledom (*engl. ice-templating*), impregnacija polimerne pjene (*engl. polymer foam impregnation*), impregnacija kalupa polimernim kuglicama (*engl. polymer-*

*bead mold impregnation*), 3D print impregnacijskih kalupa (engl. *3D printed mold impregnation*), stereolitografija (engl. *stereolithography*) i robotska ekstruzija materijala (engl. *robocasting*) [30].

Emulzifikacija se temelji na mješavinama cementnih pasta kalcijevih fosfata i ulja, tzv. emulzije kalcijevog fosfata (CPE). CPE se mogu koristiti za izradu okruglih granula ili poroznih blokova od injektirane paste. Veličina pora se može modificirati promjenom koncentracije emulgatora ili udjela ulja [37].

Kalcijev fosfat cement se sastoji od tekućine i praha koji se miješaju kako bi se formirala plastična pasta. Ona se s vremenom stvrdnjava i postaje kruta i čvrsta.

Kod pjenjenja su potrebna dva koraka s kojima će se postići makroporozna struktura. Na prvom koraku se cement dodaje već zapjenjenoj tekućoj fazi laganim miješanjem do homogenizacije. S vremenom će se smjesa stvrdnuti, stvarajući strukturu hidroksiapatita sa smanjenim udjelom kalcija (CDHA) koja zapravo održava tu makroporoznost stvorenu u početnoj pjeni. Takav stvoreni hidroksiapatit se u drugom koraku sinterira na visokim temperaturama ( $900^{\circ}\text{C} - 1100^{\circ}\text{C}$ ) gdje se dobiva konačna  $\beta$ -TCP faza. Ovakva metoda se pokazala učinkovitom, ponovljivom i jeftinom. Sposobnost paste da se oblikuje i injektira, omogućuje pripremu materijala različitih geometrijskih oblika [38].

Oblikovanje ledom ili zamrzavanje je vrlo svestrana metoda i jednostavna za pripremu anizotropnih uzoraka sa poravnatim porama. Još jedna prednost ove metode uključuje i mogućnost podešavanja poroznosti i strukturne veličine uzorka. Poroznost je u izravnoj vezi sa sadržajem vode u suspenziji. Mljeveni prah  $\beta$ -TCP-a se dodaje u otopinu koja sadrži vezivo, disperzant i deioniziranu vodu. Suspenzije se pripreme ultrazvučnim miješanjem i naknadnim hlađenjem na 247 K. Takve suspenzije se prebace u uređaj u kojem se dodatno hlade. Dolazi do rasta kristala leda u obliku međusobno paralelnih ploča koje pritom odbijaju čestice  $\beta$ -TCP-a. Kristali leda naguraju  $\beta$ -TCP čestice i to dovodi do njihovog obogaćivanja između kristala leda. Nakon stvrdnjavanja, postiže se strukturirani i smrznuti uzorak. Led se potom uklanja liofilizacijom, a dobiveni uzorak se podliježe zagrijavanju na  $400^{\circ}\text{C} - 500^{\circ}\text{C}$  kako bi se uklonili preostali ostaci veziva i disperzanta. Naknadno, temperatura se poveća na  $1100^{\circ}\text{C}$  i stabilna struktura  $\beta$ -TCP-a se dobije nakon 2 sata sinteriranja [39].

Kod metode impregnacije polimerne pjene, porozan  $\beta$ -TCP je pripremljen sinteriranjem smjese  $\alpha$ -TCP-a kojom je obložena poliuretanska (PU) pjena, odnosno spužva. Komadići poliuretanske spužve su izrezani iz velike PU ploče i adekvatno očišćeni. Kašasta smjesa pripremljena je miješanjem  $\alpha$ -TCP-a, veziva (polivinil alkohol - PVA), amonij polimetakrilne kiseline ( $\text{NH}_4\text{PMAA}$ ) i destilirane vode. PU spužve se zatim uranjaju u tu smjesu i suše na zraku na sobnoj temperaturi. Potom se zagrijavaju u peći kako bi se uklonila spužva tako da ostane samo porozna struktura  $\beta$ -TCP-a [40].

U metodi impregnacije kalupa polimernim kuglicama, kuglice od parafina ili polimetilmetakrilata (PMMA) su kemijski fiksirane zajedno i služe kao kalup za proizvodnju uzorka u obliku bloka. Praznine između polimernih kuglica se ispunjavaju vodenom suspenzijom kalcijevog fosfata. Nakon sušenja uzorka u kalupu, provodi se postupak uklanjanja veziva na niskoj temperaturi što omogućuje eliminaciju PMMA kuglica te se tako stvara i sama makroporoznost unutar keramike [41].

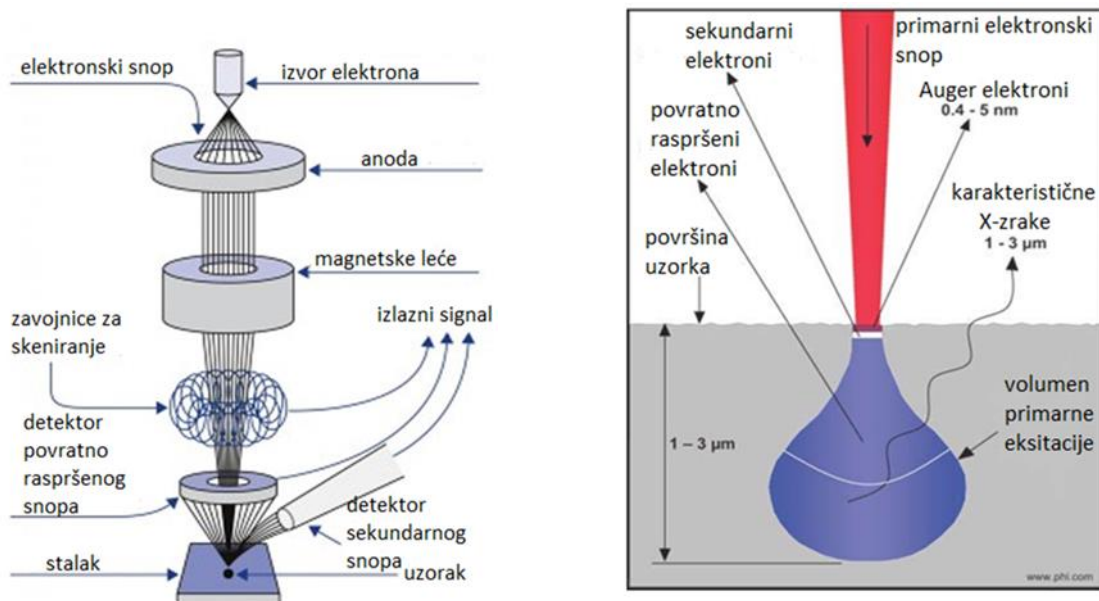
U 3D printanju impregnacijskih kalupa, 3D polimerni kalup se prvo "printa" te se koristi kao kalup za tzv. *slip-casting*. To je metoda oblikovanja keramike izlijevanjem smjese u kalupe kako bi poprimili sam oblik korištenog kalupa [42].

Stereolitografija (SLA) skupa sa metodom 3D printanja su najsvestranije metode jer postoji gotovo potpuna geometrijska sloboda. U stereolitografiji,  $\beta$ -TCP smjesa na bazi monomera polimerizira se sloj po sloj. Ovakva metoda se zasniva na fotopolimerizaciji, tj. laser emitira ultraljubičastu svjetlost i osvjetljava sloj tekućega polimera zadanog oblika presjeka, koji se skrućuje iznad podloge. Takav se postupak ponavlja sve dok se ne postigne zadovoljavajući oblik [43]. Prednosti ovakve tehnike su brojne, a neke od njih su: visoka kvaliteta površine, visoka razlučivost detalja, visoka točnost, moguće je postići hrapavost površine itd. Prisutni su i nedostaci poput potrebe za uklanjanjem nepolimerizirane smjese iz pora, printanje je moguće samo u X-Y ravnini, a troškovi materijala i održavanja su visoki [43].

Kod robotske ekstruzije materijala, materijal nalik na pastu se u obliku niti istiskuje iz male mlaznice dok se ona pomiče po radnoj površini te se proizvod tako gradi ispisivanjem potrebnog oblika sloj po sloj. Pore se formiraju između ekstrudiranih niti. Metoda je brza i svestrana, ali je prostorna rezolucija obično veća od 100  $\mu\text{m}$ . Također, pore imaju koveksnu zakrivljenost što se smatra štetnim za formiranje kosti [30].

### 2.3. Pretražna elektronska mikroskopija (engl. scanning electron microscopy, SEM)

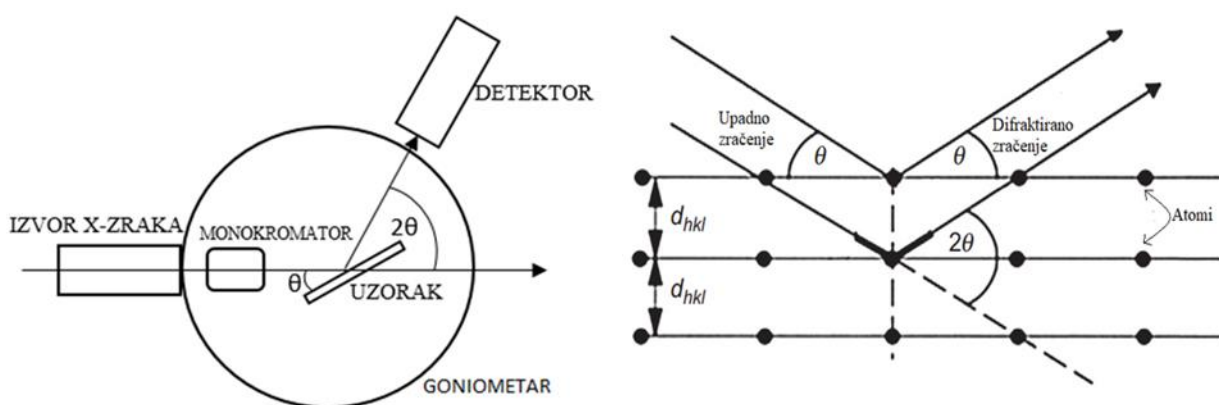
Ova brza, jednostavna za korištenje i nedestruktivna metoda radi prema principu usmjeravanja snopa elektrona iz katodne cijevi prema anodi kroz magnetske leće i konačno na površinu uzorka (slika 7. lijevo). Interakcija elektronskog snopa sa uzorkom rezultira mogućom pojavom tri fenomena: emisija sekundarnih elektrona (SE), povratno raspršeni elektroni (BSE) i difraktirani povratno raspršeni elektroni (EBSD). Elektroni prodiru u uzorak u obliku suze (slika 8. desno) čija dimenzija je određena energijom i kutom upada ulaznog snopa i atomskim masama elemenata od kojih je sačinjen uzorak. Sekundarni elektroni se emitiraju uslijed sudara površine uzorka sa snopom elektrona energije u iznosu od nekoliko desetaka eV (<50 eV) dok povratno raspršeni elektroni imaju veći raspon energije. SE su najkorisniji za prikaz morfologije i topografije uzorka dok BSE daju kontrast u višefaznim sustavima. Slike dobivene povratno raspršenim elektronima su manje rezolucije od slika dobivenih sekundarnim elektronima upravo zato jer je interakcija dublje unutar uzorka. EBSD tehnika se koristi za proučavanje kristalografske strukture materijala uz korištenje posebnog detektora [44, 45].



Slika 8. Shema SEM uređaja (lijevo) i prikaz interakcije elektronskog snopa s uzorkom (desno) [44]

## 2.4. Difrakcija rendgenskih zraka (engl. X-ray diffraction, XRD)

Nedestruktivna je metoda kojom se mogu dobiti kvalitativne i kvantitativne informacije o kristaličnom uzorku. Radi na principu difrakcije rendgenskih zraka prema Braggovom zakonu (slika 9. desno), a to je posljedica međudjelovanja rendgenskih zraka i elektronskog omotača atoma. Rendgenske zrake dolaze do uzorka koji se rotira goniometrom (slika 9. lijevo) čime se mijenja upadni kut zračenja  $\theta$  (difrakcijski kut). Upadni snop rendgenskog zračenja s lijeva se reflektira na skupinu ravnina pri čemu je kut refleksije jednak upadnom kutu zračenja [46].



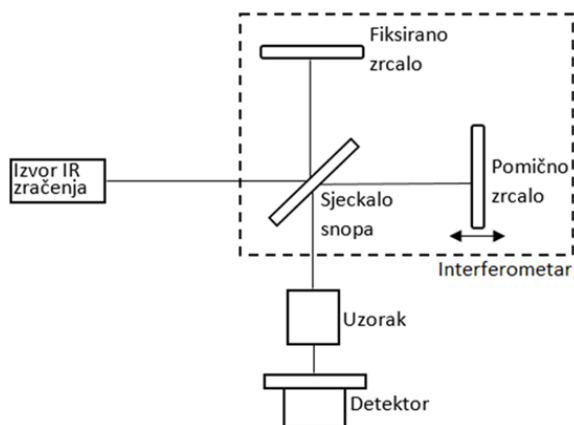
Slika 9. Shema difraktometra (lijevo) i slikovni prikaz Braggovog zakona (desno) [47]

## 2.5. Infracrvena apsorpcijska spektrometrija s Fourierovom transformacijom (engl. Fourier Transform Infrared Spectrometry, FTIR)

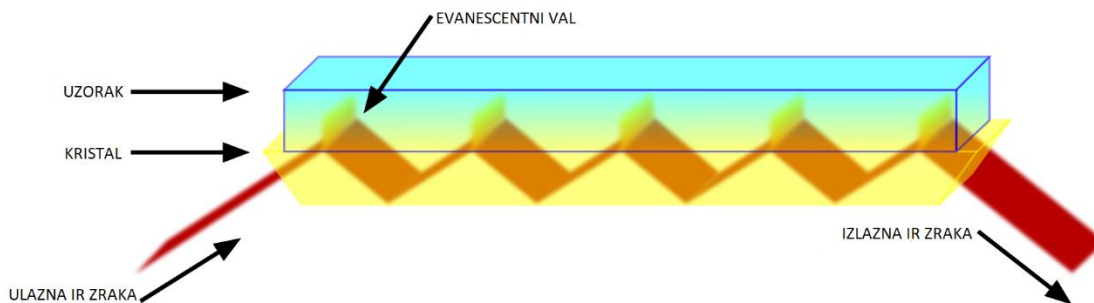
Infracrvena (IR) apsorpcijska spektrometrija se primjenjuje za identifikaciju svih spojeva, izuzev homonuklearnih molekula ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $Cl_2$ ,  $H_2$ , itd.). Osim toga, IR spektrometrija je nedestruktivna i jedna od najsvestranijih metoda analize gdje nisu potrebne posebne pripreme uzorka. Uvođenje Fourierove transformacije je pridonijelo bržoj analizi (unutar sekunde) i velikoj osjetljivosti [48]. Zraka infracrvenog zračenja prolazi kroz interferometar (slika 10.) koji se sastoji od sjeckala snopa za naizmjenično propuštanje zračenja i zrcala od kojeg je jedno pomično. Kako se zrcalo pomiče, tako se svaka valna duljina svjetlosti u snopu povremeno blokira i propušta. Različite valne duljine moduliraju se različitim brzinama, tako da u svakom trenutku i/ili položaju zrcala, zraka koja izlazi iz interferometra ima drugačiji spektar. Na kraju, zraka IR zračenja dolazi do uzorka koji apsorbira određene, odnosno specifične valne duljine baš za taj uzorak. Zatim



detektor mjeri signal interferograma [49]. Uz FTIR tehniku je moguće korištenje i tzv. ATR tehnike koja omogućava izravnu analizu uzoraka u krutom ili tekućem stanju bez daljnje pripreme. U ovoj metodi, uzorak se mora približiti optičkom elementu gdje se svjetlost u potpunosti reflektira iznutra što rezultira **evanescentnim** valom koji se širi u uzorak (slika 11.) [50, 51].



*Slika 10.* Shema FTIR uređaja



*Slika 11.* Prikaz interakcije IR svjetlosti sa uzorkom i kristalom [51]

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1.Svrha rada

Dobivanje makro- i mikro- porozne keramike čistog  $\beta$ -TCP-a putem sinteze u čvrstom stanju (engl. *solid state synthesis*) metodom impregnacije polimerne pjene (engl. *polymer foam impregnation*).

### 3.2.Priprema praha

Za istraživanje se koriste prekursori kalcijev karbonat ( $\text{CaCO}_3$ , 99.9 %, Sigma Aldrich) i kalcijev hidrogenfosfat ( $\text{CaHPO}_4$ , 99.98 %, Alfa Aesar) u omjeru Ca/P = 1.5. Kao disperzant, korišten je amonijev polimetakrilat (APMA, Sigma Aldrich), a kao vezivo korišten je polivinilalkohol visoke molarne mase (PVA, 99+ %,  $M_w = 89\ 000 - 98\ 000$ , Sigma Aldrich).

Prvi korak u provođenju eksperimenta je vaganje na analitičkoj vagi prethodno izračunatih masa prekursora tako da ukupna masa smjese iznosi 10 grama. Izračunata masa  $\text{CaCO}_3$  iznosi 2.6471 g, a masa  $\text{CaHPO}_4$  7.3529 g. Uzme se dvostruka odvaga kako bi se dobilo više smjese jer će se u jednom trenutku smjesa razdvojiti radi usporedbe sastava zbog malih preinaka prilikom same pripreme. Smjesa se stavlja u planetarni mlin radi provedbe mehanokemijske sinteze u čvrstom stanju bez prisutnosti otapala. U planetarnom mlinu (slika 12. lijevo) se posuda s reaktantima rotira oko centralne i vlastite osi, pri čemu nastaje centrifugalna sila koja oponaša gravitaciju. Stoga je važno na mlinu namjestiti protutežu jednakoj masi uzorka skupa sa posudom u kojoj se nalazi, kako se mlin nebi micao sa svojeg mjesta. Koristi se korundna posuda i korundne kuglice od 20mm (slika 12. desno). Prvi korak homogenizacije uključuje miješanje u trajanju od 20 minuta pri  $300\ \text{min}^{-1}$ . Nakon čega se odvoji polovica smjese koja predstavlja uzorak 1 (tablica 2.). U drugom koraku homogenizacije se preostala smjesa, koja će predstavljati uzorak 2, unutar mlina dodatno miješa 10 minuta, ali ovaj put pri brzini od  $450\ \text{min}^{-1}$ .

Pripravljene uzorci se zagrijavaju u visokotemperaturnoj peći *Nabertherm* (slika 13.) na  $900\ ^\circ\text{C}$  u trajanju od 1h. Grijanje je linearno u koraku  $10\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ . Važno je napomenuti i proces kalciniranja, odnosno otpuštanja  $\text{CO}_2$  iz smjese pri  $700\ ^\circ\text{C}$ .



*Slika 12.* Prikaz planetarnog mlina *Pulverizette* (lijevo), posude i kuglica za miješanje (desno)



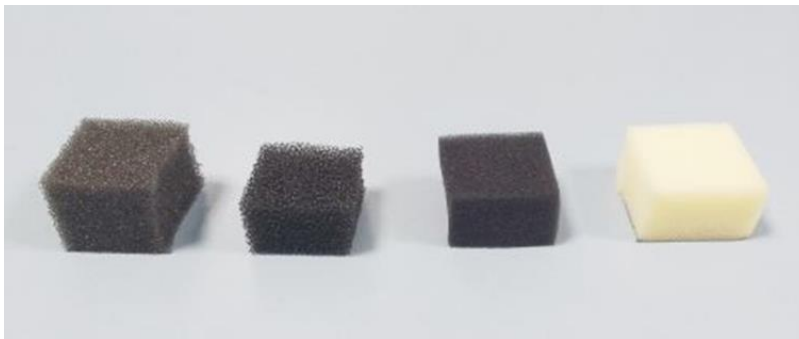
*Slika 13.* Visokotemperaturna peć *Nabertherm*

*Tablica 2.* Usporedba pripreme uzorka

	Uzorak 1	Uzorak 2
Masa /g	10	10
Miješanje o/min.	300 (trajanje 20 min.)	300 (trajanje 20 min.) + 450 (trajanje 10 min.)
Termička obrada	isti postupak	isti postupak

### 3.3. Priprava keramike

Uzorke je potrebno pripremiti da budu konzistencije poput guste paste. Za to su potrebni: prethodno pripremljeni prah (5 grama), disperzant amonij polimetakrilat, destilirana voda i vezivo PVA (polivinilalkohol). U korundnom tarioniku se pomiješaju prekursori na način da se prah polagano i postepeno dodaje u vodenu otopinu disperzanta kako bi disperzant mogao pravilno suzbiti flokulaciju praha. Po završetku dodatka praha, dodaje se 0.2499 g veziva te se sve temeljito promiješa tučkom. Nakon što je formirana naočigled homogena suspenzija, spužve žrtvene faze (PU - poliuretana) poroznosti 30 i 80 pora po inču (*engl. PPI*) natapaju se u pasti kako bi se obložile stijenke kanala koji sačinjavaju pore spužve. Kako bi se riješilo viška suspenzije, spužve se propuhuju tehničkim dušikom. Nakon oblaganja stijenki spužve sa suspenzijom, slijedi sušenje od 48 sata na zraku te spužva poprima dovoljnu čvrstoću za rukovanje pomoću veziva iz suspenzije. Zatim slijedi uklanjanje žrtvene faze, koje se izvodi u peći sporim izgaranjem poliuretana od 30°C do 600 °C brzinom zagrijavanja 1 °C/min kako bi poliuretan izgorio bez burnih reakcija i narušio makrostrukturu predloška. Nakon izgaranja, slijedi daljnje grijanje pri 1100 °C na 30 minuta te sinteriranje na istoj temperaturi u trajanju od 8 sati. Isti postupak se ponavlja i za drugi pripremljeni uzorak paste.



**Slika 14.** Uzorci poliuretanske spužve

**Tablica 3.** Broj uzoraka i uvjeti pripreme suspenzije

	Pasta 1	Pasta 2
Uzorak praha	1	2
Spužva A / PPI	30	30
Spužva B / PPI	80	80
Disperzant / mL	0.5	0.5
Destilirana voda / mL	~4.2	~2.25

### 3.4. Karakterizacija

Nakon pripreme praha, uzorci 1 i 2 se analiziraju putem *Bruker Vertex 70* ATR-FTIR-a (slika 15.) i XRD instrumenta (slika 16.). Nisu potrebne posebne pripreme uzoraka. FTIR analiza provodi se u apsorpcijskom načinu rada gdje se skupljaju 64 snimke rezolucije  $2\text{ cm}^{-1}$  u rasponu valnih brojeva od  $500$  do  $4\,000\text{ cm}^{-1}$ . Difrakcija na prahu provodi se na uređaju *Shimadzu 6 000* (slika 16.) u  $2\theta$  rasponu od  $2$ - $80^\circ$  sa korakom od  $0.02^\circ$  te vremenom zadržavanja od  $0.6\text{ s}$  pri zračenju od  $8.04\text{ keV}$  (energija  $\text{CuK}\alpha$  zračenja).



*Slika 15.* ATR-FTIR instrument *Bruker Vertex 70* sa Platinum ATR



*Slika 16.* XRD instrument LabX XRD *Shimadzu 6 000*

Pretražnim elektronskim mikroskopom *Tescan Vega 3* (slika 17.) su se analizirali mali dijelovi pripremljenih uzoraka makroporozne keramike iz tablice 3. Prije same analize potrebno je neparivanje zlatom u trajanju od  $60$  sekundi gdje se pod djelovanjem argonske plazme koja

sublimira zlatnu metu na uzorke, nanosi tanki sloj zlata koji omogućuje bolju električnu provodnost.

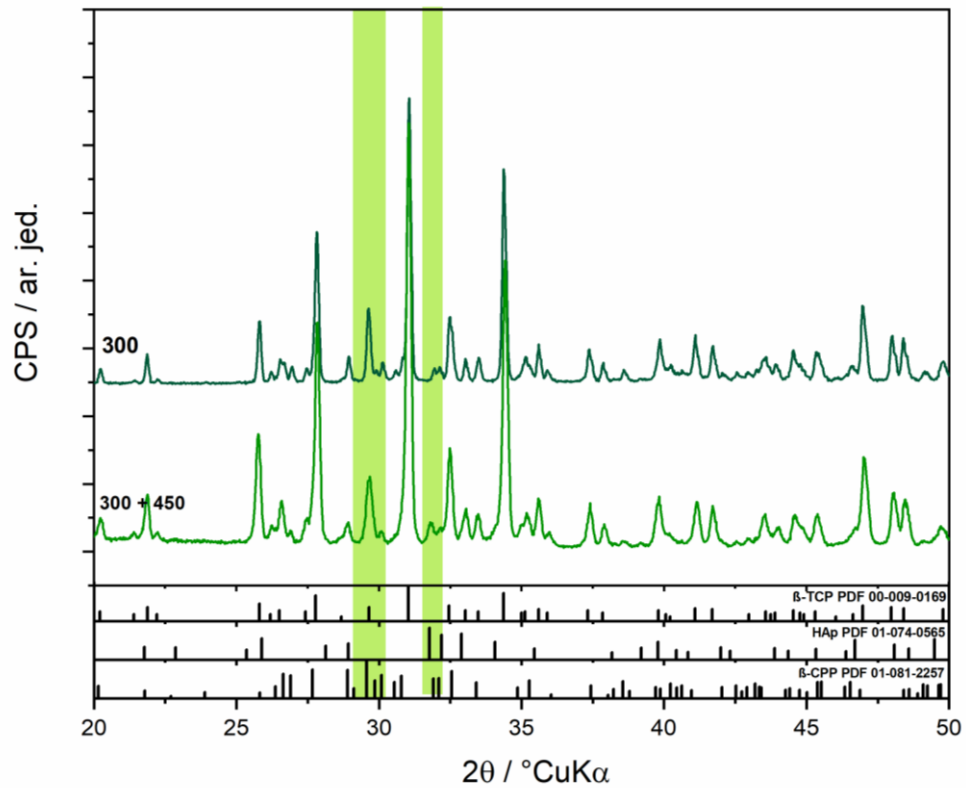


*Slika 17. SEM instrument Tescan Vega 3*

## 4. REZULTATI

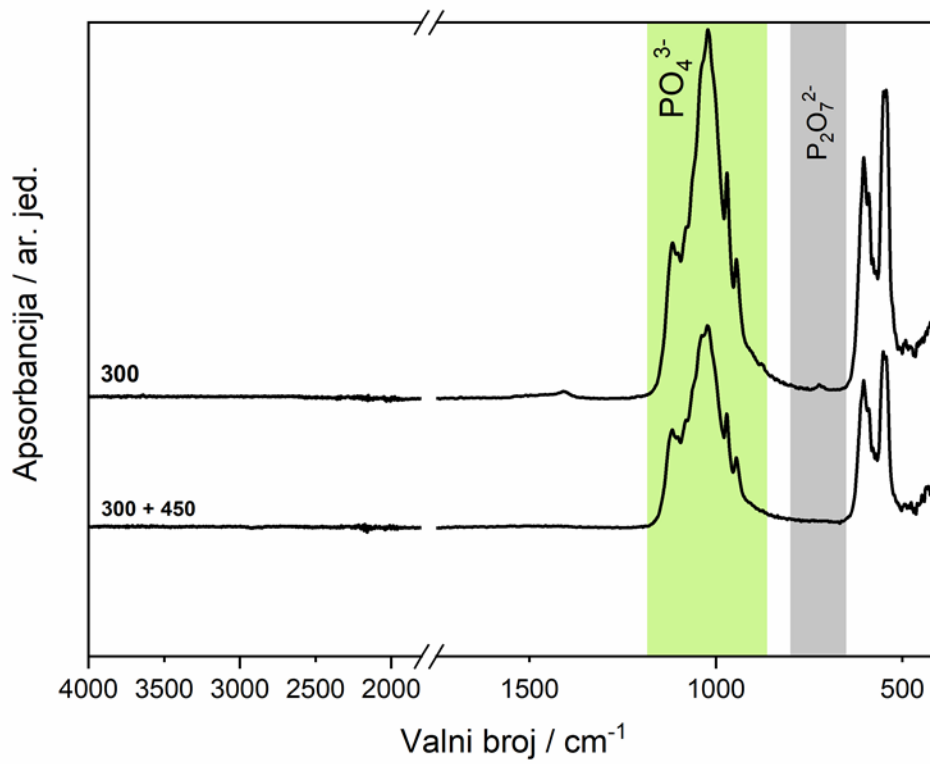
Kod XRD i FTIR-a analiziraju se prahovi zagrijanih uzoraka na 900 °C sat vremena.

### 4.1. Rendgenska difrakcija



*Slika 18.* Difraktogram uzoraka 1 (300) i 2 (300+450)

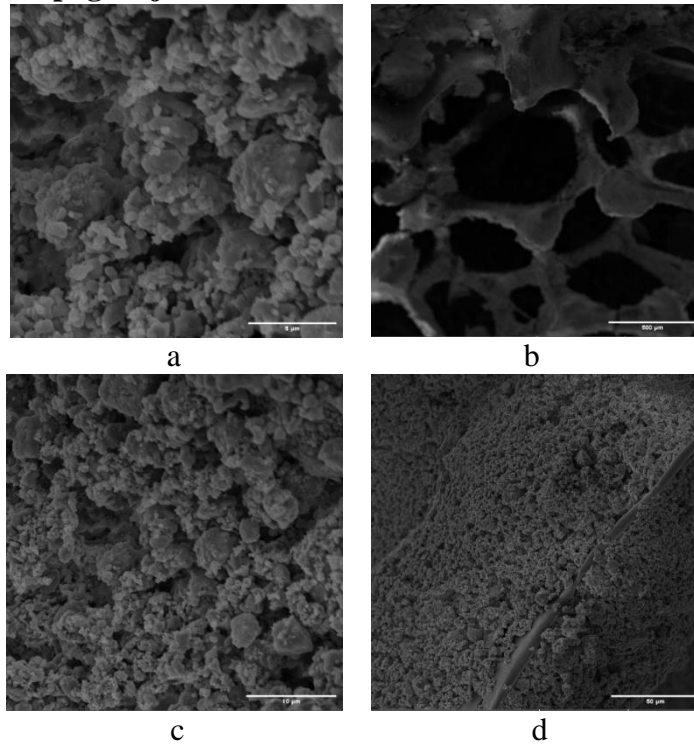
#### 4.2. ATR – FTIR spektri



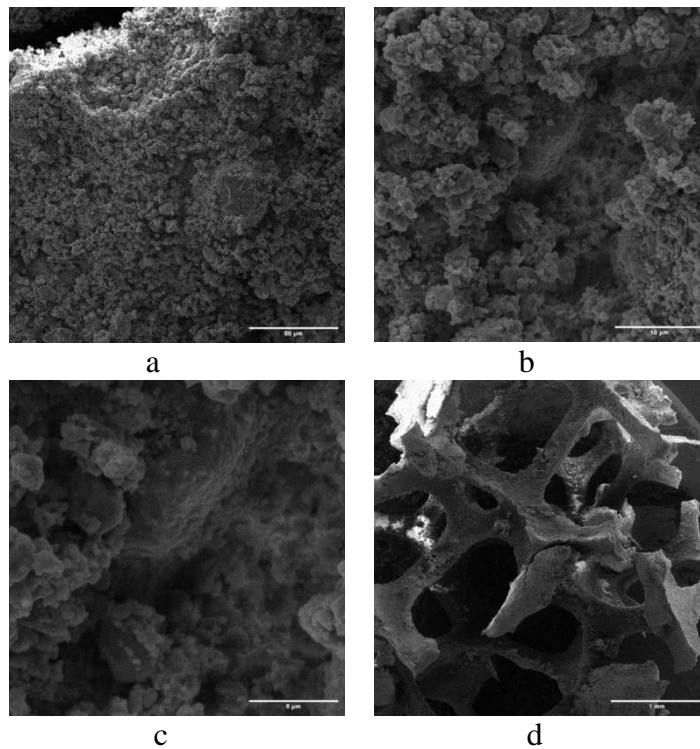
*Slika 19.* Spektri FTIR uzoraka 1 (300) i 2 (300+450)



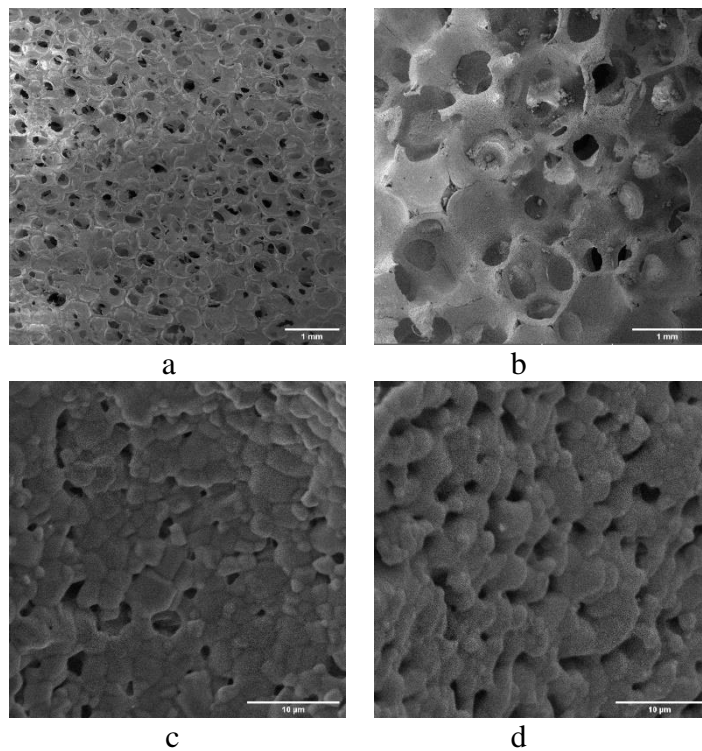
### 4.3. Morfologija i topografija



**Slika 20.** Mikrografije uzoraka impregniranih spužvi poroznosti 80 PPI pri uvećanjima: a) 10 000x, b) 100x, c) 5 000x i d) 1 000x



**Slika 21.** Mikrografije uzoraka impregnirane spužve poroznosti 30 PPI raznih uvećanja: a) 1 000x, b) 5 000x, c) 10 000x i d) široko polje (eng. *wide field*).



**Slika 22.** Mikrografije uzoraka nakon sinteriranja i izgaranja žrtvene faze pri raznim uvećanjima:  
a) 80 PPI 10x, b) 30 PPI 10x, c) 80 PPI 5 000x i d) 30 PPI 5 000x

## 5. RASPRAVA

Provedena je sinteza  $\beta$ -TCP-a u čvrstom stanju iz kalcijevog karbonata i kalcijevog hidrogenfosfata uz poneke izmjene u pripremi prahova. Prikazani su usporedni rezultati uzorka 1 i 2 na difraktogramima i FTIR spektrima. Također su prikazani i rezultati pripremljenih zelenih tijela različitih veličina pora (pasta 1 i 2 sa spužvama A i B) te konačne makroporozne keramike na mikrografijama snimljenima na SEM-u.

Na *slici 18*. prikazan je difraktogram uzoraka 1 i 2 (tablica 2.). Na x-osi nalaze se vrijednosti  $2\theta$ , gdje pri određenim kutovima naglo raste intenzitet koji je prikazan na y-osi. Povećanje intenziteta odgovara konstruktivnoj interferenciji te se iz toga može zaključiti o kojoj se kristalnoj fazi radi. Oba uzorka prikazuju  $\beta$ -TCP kao glavnu fazu sa manjim zaostatkom pirofosfata ( $\beta$ -CPP) u tragovima. Općenito se referentna kartica za  $\beta$ -TCP najbolje poklapa sa dobivenim signalima, a pogotovo u području  $\sim 31.2^\circ$  gdje se uočava vrlo intenzivan signal koji nije prisutan na niti jednoj drugoj kartici. Uspoređivanjem priloženih kartica, pri  $2\theta$  rasponu  $29 - 30^\circ$  i  $31 - 32^\circ$  se vide karakteristični difrakcijski maksimumi za pirofosfat. Također se može uočiti i veći intenzitet pikova kod uzorka 2 (300 + 450).

Na *slici 19*. prikazan je ATR – FTIR spektar za uzorke prahova 1 i 2 (tablica 2.) u rasponu od 500 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Kod oba uzorka se zamjećuje specifični signal za ortofosfatni ion između 900 i 1120  $\text{cm}^{-1}$  te kod uzorka 1 za pirofosfati ion na  $\sim 750 \text{ cm}^{-1}$ . FTIR analizom se također i potvrđuje izostanak hidroksiapatitne faze jer se ne vidi karakteristični signal za – OH skupinu oko 3500  $\text{cm}^{-1}$  [52].

Usporedbom ove dvije analize se može potvrditi da se sintetizirao čisti  $\beta$ -TCP. XRD je prepoznao da se pirofosfatni ion nalazi u oba dva uzorka dok FTIR to nije pokazao. Hidroksiapatitna faza se ne zamjećuje ni XRD ni FTIR analizom.

Pirofosfatne i hidroksiapatitne faze različitog su Ca/P omjera od ortofosfatnih i nastaju u sintezama u čvrstom stanju isključivo zbog nehomogenosti prekursorske mješavine. Iz tog razloga, potrebno je bilo istražiti utjecaj procesa homogenizacije, odnosno mljevenja prekursorske smjese kalcijeva karbonata i kalcijeva hidrogenfosfata kako bi tijekom reakcije na temperaturi od 900  $^\circ\text{C}$ , lokalna stehiometrija reaktanata bila zadovoljena za stvaranje ortofosfatnih kristalnih faza. Iz

dobivenih difraktograma i FTIR spektara, može se zaključiti kako je uzorak pripremljen sa dva koraka mljevenja (300 + 450) dao zadovoljavajuću prekursorsku mješavinu s obzirom na konačni sastav nakon sinteze praha.

Na *slici 20*. prikazane su mikrografije kalcij fosfatnom pastom impregniranih poliuretanskih spužvi poroznosti 80 PPI. Vidljivi su manji i veći kristali na slikama **20a**, **20c** i **20d** te njihovo prijanjanje na spužvu pomoću veziva PVA. Na slici **20b** vidljiv je oblik makropora te se može procijeniti da je promjer pora u rasponu od 100 do 300  $\mu\text{m}$ . Isto tako, materijal naočigled izgleda vrlo grubo.

Na *slici 21*. prikazane su mikrografije kalcij fosfatnom pastom impregniranih poliuretanskih spužvi poroznosti 30 PPI. Na slikama **21a**, **21b** i **21c** vidi se široka raspodjela veličina aglomerata koji pomoću veziva prijanjaju uz spužvu. Slika **21d** prikazuje sustav u širokom polju te se iz nje može procijeniti kako je promjer pora u materijalu ugrubo 1 mm. Ovi uzorci vrlo su zahtjevni za SEM analizu. Naime, teško je pripremiti prikladan, odnosno cjelovit dio uzorka kada se uzme u obzir veličina makropora u odnosu na veličinu pripreme uzorka za SEM analizu.

*Slika 22.* prikazuje mikrografije sinteriranih spužvi nakon izgaranja žrtvene faze (poliuretanske spužve). Na slikama **22a** i **22b** može se primijetiti kako materijal naočigled ima puno manju hrapavost površine, što je posljedica srastanja čestica usred procesa sinteriranja na 1100 °C te kako su kanali spužve replicirali odnosno zadržali umreženu monolitnu strukturu. Pri većim povećanjima, na slikama **22c** i **22d**, vidi se srastanje čestica kao posljedica sinteriranja, gdje ostaju vrlo male pore u području veličina 1-5  $\mu\text{m}$ . Takva gusta povezanost čestica ukazuje na povećanje tlačne čvrstoće uzorka.

## 6. ZAKLJUČAK

Provođenjem sinteze u čvrstom stanju iz kalcijevog karbonata i kalcijevog hidrogenfosfata, dobiven je poprilično čisti  $\beta$ -TCP uz tragove pirofosfata. Rezultati su dobiveni metodom rendgenske difrakcije i infracrvene apsorpcijske spektrometrije s Fourierovom transformacijom. Metodom impregnacije polimerne pjene, zadržao se porozni oblik korištenih poliuretanskih spužvi. Završno dobivena keramika ima pore veličine 1 – 5  $\mu\text{m}$  što bi trebalo omogućiti poboljšanu bioaktivnost. Budući da je uzet mali dio uzorka za karakterizaciju preko SEM-a, ne može se reći da su veličine pora jednake kroz cijelu njegovu strukturu. Sinteriranje je važan termički postupak u obradi keramike jer određuje zaostalu poroznost, a samim time i mehanička svojstva pa se tako u ovom eksperimentu uočava kako je proces sinteriranja zapravo uzrokovao srastanje čestica što upućuje na povećanje tlačne čvrstoće uzorka.

## 7. LITERATURA

- [1] K. Shanmugam, R. Sahadevan, Bioceramics—An introductory overview, Anna University, Chennai, India, str. 1-3
- [2] Wanpeng Cao, Larry L. Hench, Bioactive materials, Department of Materials Science and Engineering, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA, str. 494
- [3] K. Shanmugam, R. Sahadevan, Bioceramics—An introductory overview, Anna University, Chennai, India, str. 15
- [4] Antonio J. Salinas, Pedro Esbrit, María Vallet-Regí, Biomaterials science, A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair, 2013., str. 44
- [5] Hyun-Min Kim, Bioactive Ceramics: Challenges and Perspectives, Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto-shi 606-8501, Japan, S49
- [6] K. Shanmugam, R. Sahadevan, Bioceramics—An introductory overview, Anna University, Chennai, India, str. 10
- [7] K. Shanmugam, R. Sahadevan, Bioceramics—An introductory overview, Anna University, Chennai, India, str. 25-26
- [8] Satyavrata Samavedi, Abby R. Whittington, Aaron S. Goldstein, Acta Biomaterialia **9**, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, 2013., str. 8037
- [9] K. Shanmugam, R. Sahadevan, Bioceramics—An introductory overview, Anna University, Chennai, India, str. 32-33
- [10] <http://struna.ihjj.hr/naziv/osteoklast/16567/>
- [11] <https://bs.wikipedia.org/wiki/Kalcij-fosfat>
- [12] Satyavrata Samavedi, Abby R. Whittington, Aaron S. Goldstein, Acta Biomaterialia **9**, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, 2013., str. 8039
- [13] J. F. Osborn, H. Newesely, Biomaterials 1980., **Vol 1** April, The material science of calcium phosphate ceramics, str. 109
- [14] Lia Stanciu, Susana Diaz-Amaya, Introductory Biomaterials: An Overview of Key Concepts, str. 63-64

- [15] Amit Kumar Nayak, Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview, str. 903
- [16] Mohamed Saiful Firdaus Hussin, Hasan Zuhudi Abdullah, Maizlinda Izwana Idris, Mohd Arizam Abdul Wahap, Extraction of natural hydroxyapatite for biomedical applications—A review, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9445296/>
- [17] <https://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/>
- [18] [https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium\\_pyrophosphate](https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_pyrophosphate)
- [19] Faleh Tamimi, Damien Le Nihouannen, Hazem Eimar, Zeeshan Sheikh, Svetlana Komarova, Jake Barralet, The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: Brushite vs. monetite – *Acta biomaterialia* **8**, 2012., str. 3161-3169
- [20] Jian-Jiang Bian, Dong-Wan Kim, Kug-Sun Hong, Phase transformation and sintering behavior of  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , School of Material Sciences & Engineering, Seoul National University, *Materials Letters* **58**, 2004., str. 348
- [21] C. Moseke, U. Gbureck, Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications – *Acta Biomaterialia* **6**, 2010, Department for Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Pleicherwall 2, D-97070 Würzburg, Germany, str. 3815–3823
- [22] M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, Dr Robert Mathys Foundation, Bischmattstr. 12, CH-2544 Bettlach, str. 4-5
- [23] Y. Yoshimine, A. Akamine, M. Mukai, K. Maeda, M. Matsukura, Y. Kimura and T. Makishima, Biocompatibility of tetracalcium phosphate cement when used as a bone substitute, *Biomaterials*, **14(6)**, str. 403–406
- [24] T. Goto and H. Katsui, *Interface Oral Health Science 2014.*, Chapter 9, Chemical Vapor Deposition of Ca–P–O Film Coating, str. 107-108
- [25] Suzuki, O., Octacalcium phosphate: Osteoconductivity and crystal chemistry - *Acta Biomaterialia* **6(9)**, 2010., str. 3379–3387
- [26] [https://en.wikipedia.org/wiki/Octacalcium\\_phosphate](https://en.wikipedia.org/wiki/Octacalcium_phosphate)
- [27] Pompe, W., Worch, H., Habraken, W. J. E. M., Simon, P., Kniep, R., Ehrlich, H., & Paufler, P., Octacalcium phosphate – a metastable mineral phase controls the evolution of scaffold forming proteins. *Journal of Materials Chemistry B*, **3(26)**, 2015, str. 5319
- [28] Dorozhkin, S. V., Calcium orthophosphates, *Journal of Materials Science*, **42(4)**, 2007., str. 1061-1069

- [29] R.G. Carrodeguas, S. De Aza,  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, *Acta Biomaterialia*, 2011., str. 3536
- [30] Marc Bohner, Bastien Le Gars Santoni, Nicola Dobelin,  $\beta$ -Tricalcium Phosphate for Bone Substitution: Synthesis and Properties, *Acta Biomaterialia*, 2020.
- [31] Stefan Loher, Wendelin J. Stark, Marek Maciejewski, Alfons Baiker, Sotiris E. Pratsinis, Dennis Reichardt, Fabrice Maspero, Frank Krumeich, Detlef Günther, Fluoro-apatite and Calcium Phosphate Nanoparticles by Flame Synthesis, *Chem. Mater.* 2005, **17**, str. 36-42
- [32] Pierre Layrolle, Albert Lebugle, Characterization and Reactivity of Nanosized Calcium Phosphates Prepared in Anhydrous Ethanol, *Chem. Mater.* 1994., **6**, str. 1996-2004
- [33] Takeshi Toyama, Kouichi Nakashima and Tamotsu Yasue, Hydrothermal Synthesis of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate from Amorphous Calcium Phosphate, *Journal of the Ceramic Society of Japan* **110** [8], 2002., str. 716-721
- [34] Jingdi Chen, Yingjun Wang, Xiaofeng Chen, Li Ren, Chen Lai, Wen He, Qiqing Zhang, A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders, *Materials Letters*, **65(12)**, 2011., str. 1923–1926
- [35] Daniel Moreno, Fabio Vargas, Jeisson Ruiz, María Esperanza López, Solid-state synthesis of alpha tricalcium phosphate for cements used in biomedical applications, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2019., str. 1861
- [36] Zhang, Y., Kong, D., & Feng, X. Fabrication and properties of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics prepared using a double slip-casting method using slips with different viscosities. *Ceramics International*, **38(4)**, 2012., str. 2991–2996
- [37] Bohner M., Calcium Phosphate Emulsions: Possible Applications. *Key Engineering Materials*, 2001., str. 765–768
- [38] E.B. Montufar, C. Gil, T. Traykova, M.P. Ginebra, J. Planell, Foamed beta-Tricalcium Phosphate Scaffolds, *Key Engineering Materials Vols 361-363*, 2008., str. 323-326
- [39] Stefan Flauder, Uwe Gbureck, Frank A. Müller, Structure and mechanical properties of  $\beta$ -TCP scaffolds prepared by ice-templating with preset ice front velocities, *Acta Biomaterialia* **10(12)**, 2014., str. 5148-5155
- [40] Miao, X., Lim, W.-K., Huang, X., Chen, Y., Preparation and characterization of interpenetrating phased TCP/HA/PLGA composites, *Materials Letters*, **59(29-30)**, 2005., str. 4000–4005



- [41] M. Descamps, T. Duhoo, F. Monchau, J. Lu, P. Hardouin, J.C. Hornez, A. Leriche, Manufacture of macroporous  $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics, *Journal of the European Ceramic Society* **28**, 2008., str. 149–157
- [42] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=69979>
- [43] Mladen Šercer, Damir Godec, Ana Pilipović, Miodrag Katalenić, Aditivna proizvodnja s polimerima, *Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu*, str. 169-171
- [44] doc. dr. sc. Anamarija Rogina, *Struktura i svojstva materijala, predavanje 9 - Karakterizacija anorganskih materijala –mikroskopske tehnike (nastavak)*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale, 2023.
- [45] K. D. Vernon-Parry, *Scanning Electron Microscopy: an introduction*, Centre for Electronic Materials, UMIST, III-Vs Review, **Vol. 13(4)**, str. 40–44.
- [46] dr. sc. Jelena Macan, *Interna skripta za studente, Struktura i svojstva anorganskih nemetalnih materijala*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2006., str. 1-10
- [47] Epp J., *X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, 2016., str. 85
- [48] Bacsik Z., Mink J., Keresztury G., *FTIR Spectroscopy of the Atmosphere. I. Principles and Methods. Applied Spectroscopy Reviews*, **39(3)**, 2004., str. 298
- [49] [https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier-transform\\_infrared\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier-transform_infrared_spectroscopy)
- [50] Jože Grdadolnik, *ATR-FTIR spectroscopy: its advantages and limitations*, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia, *Acta Chim. Slov.*, 2002., **49**, str. 632
- [51] [https://en.wikipedia.org/wiki/Attenuated\\_total\\_reflectance](https://en.wikipedia.org/wiki/Attenuated_total_reflectance)
- [52] Berzina-Cimdina L., Borodajenko N., *Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Riga Technical University, Institute of General Chemical Engineering, Latvia, 2012., str. 127 - 130

## ŽIVOTOPIS

Zovem se Patricija Klanac. [REDACTED] Pohađala sam Osnovnu školu dr. Ante Starčevića u Zagrebu od 2006. do 2014. godine. Nakon završene osnovne škole, upisujem se u srednju školu "Gornjogradska gimnazija" u trajanju od 2014. do 2018. godine. Tijekom školovanja sam sudjelovala u brojnim izvan nastavnim aktivnostima poput različitih sportskih natjecanja. Također sam sudjelovala i na županijskom natjecanju iz latinskoga jezika kao i na međunarodnom ispitu latinskog jezika 2015. godine gdje sam i stekla certifikat za znanje klasičnoga jezika. 2018. godine upisujem Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Kemija i inženjerstvo materijala. Na tom smjeru sam bila do 2020. godine nakon čega je uslijedio prebačaj na smjer Primijenjena kemija na kojem sam i ostala. Odradila sam i obaveznu stručnu praksu 2023. godine na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu na Zavodu za kemiju materijala u laboratoriju za funkcionalne materijale.