



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI



**ȘCOALA DOCTORALĂ
DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA MATERIALELOR**

REFERAT

al tezei de doctorat

Contribuții privind posibilitățile de obținere a materialelor compozite cu aplicații biomedicale

Doctorand:

Cătălina-Andreea Dascălu (Ene)

Conducător de doctorat:

Prof.dr.habil.ing. Florin Miculescu

Cuprins

Rezumat.....	1
PARTEA I.....	1
STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ÎN DOMENIU	1
Capitolul 1. Introducere	1
Capitolul 2. Stadiul actual al cercetărilor privind materialele compozite cu matrice polimerică și adaos de materiale ceramice, pentru aplicații medicale.....	2
2.1 Materiale polimerice utilizabile ca matrice a materialelor compozite	2
2.2 Materiale ceramice.....	4
2.3 Materiale compozite cu matrice de origine polimerică.....	6
2.4 Fabricația aditivă utilizată pentru obținerea dispozitivelor biomedicale	8
PARTEA a II-a.....	11
CERCETĂRI EXPERIMENTALE.....	11
Capitolul 3. Metodologia cercetării	11
3.1 Materiale folosite pentru obținerea celor trei tipuri de materiale compozite	11
3.2 Fluxul tehnologic de obținere a pulberii de hidroxiapatită	12
3.3 Metode de analiză și caracterizare a materialelor	12
Capitolul 4. Obținerea unor materiale compozite polimer-ceramică în formă de film cu matrice din acetat de celuloză ranforsată cu hidroxiapatită.....	12
4.1 Obținerea materialelor compozite în formă de film cu matrice din acetat de celuloză ranforsată cu hidroxiapatită.....	12
4.2 Rezultate și discuții privind caracterizarea materialelor compozite în formă de film cu matrice din acetat de celuloză ranforsată cu hidroxiapatită	13
Capitolul 5. Obținerea unor materiale compozite polimer-ceramică în formă core-shell cu matrice din acid polilactic/poliuretan termoplastice ranforsată cu particule de hidroxiapatită.....	16
5.1 Obținerea materialelor compozite în formă core-shell.....	16
5.2 Rezultate și discuții privind caracterizarea materialelor compozite în formă core-shell cu matrice de acid polilactic/poliuretan termoplastice ranforsată cu particule de hidroxiapatită.....	17
Capitolul 6. Obținerea unor materiale compozite în formă de filament cu matrice din acid polilactic ranforsată cu particule de hidroxiapatită.....	20
6.1 Obținerea materialelor compozite în formă de filament	20
6.2 Rezultate și discuții privind caracterizarea materialelor compozite în formă de filament cu matrice din acid polilactic ranforsată cu particule de hidroxiapatită	21
Capitolul 7. Concluzii și contribuții personale.....	26
7.1 Concluzii în urma rezultatelor experimentale.....	26
7.2 Contribuții originale.....	28

Rezumat

Această teză de doctorat cuprinde un studiu teoretic și o serie de cercetări experimentale efectuate în vederea dezvoltării unor soluții tehnologice pentru obținerea unor materiale compozite destinate fabricării de implanturi personalizate pentru susținerea și îmbunătățirea procesului de regenerare osoasă.

Obiectivele tezei au fost stabilite luându-se în considerare cerințele necesare pentru ca un produs să poată fi considerat adecvat pentru aplicații de reconstrucție osoasă precum asigurarea regenerării osoase prin mecanisme osteoconductive, asigurarea proprietăților mecanice comparative cu cele ale osului uman, respectiv bune proprietăți de biocompatibilitate.

În acest sens, în cadrul tezei de doctorat au fost propuse trei tipuri diferite de materiale compozite, cu o componentă comună, și anume hidroxiapatita obținută din os de origine bovină. Hidroxiapatita este un biomaterial cu performanțe clinice demonstrate și are avantaje precum costul redus și disponibilitatea vastă. De asemenea, materialele polimerice utilizate pentru obținerea matricelor unor materiale compozite sunt consacrate și utilizate cu succes pentru diverse aplicații în domeniul biomedical. Un alt scop important al acestei teze de doctorat a fost acela ca materialele obținute să poată fi folosite pentru fabricarea de implanturi personalizate, de aceea două din cele trei tipuri de materiale sunt destinate fabricației aditive. Cercetările experimentale realizate în această teză de doctorat au condus spre perspective optimiste în ceea ce privește utilizarea tuturor celor trei tipuri de materiale în domeniul biomedical cu succes.

Cuvinte-cheie: materiale compozite, hidroxiapatită, implanturi personalizate

PARTEA I

STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR ÎN DOMENIU

Capitolul 1. Introducere

Deteriorarea unei părți a unui organism sau chiar pierderea unui organ, afectează în primul rând funcționalitatea acestora, dar poate genera și tulburări de nivel social și psihologic unui individ. Astfel, prin combinarea cunoștințelor și nevoilor atât ale medicilor, cât și ale inginerilor, în ultimul timp biomaterialele au prezentat o dezvoltare exponențială. În general un „biomaterial” poate fi definit ca fiind un material de origine sintetică, destinat utilizării în strânsă legătură cu un organism viu, sau pentru a înlocui o parte a unui organism viu.

Biomaterialele au fost utilizate încă din antichitate, dar cercetările constante din acest domeniu, au făcut posibilă dezvoltarea acestora atât din punct de vedere al biocompatibilității, funcționalității, cât și al design-ului. Fiind un domeniu interdisciplinar, bazat pe răspunsul de la interfața dintre un sistem biologic și un material avansat, cercetările au la bază cunoștințe din trei arii diferite: știința și ingineria materialelor, biologie, și medicină.

Chiar dacă în unele situații, pentru a obține performanțe îmbunătățite este suficientă doar modificarea proprietăților de suprafață prin acoperiri cu diverse materiale, de cele mai multe ori un singur material nu poate prezenta o gamă largă de proprietăți. Din acest motiv, a fost necesară dezvoltarea unor sisteme complexe și anume materialele compozite.

În plus, dezvoltarea domeniului ingineriei a adus îmbunătățiri și domeniului biomaterialelor prin tehnicile de fabricație aditivă (AM) sau 3D printing, și prin modelarea spațială de înaltă rezoluție. Datorită acestor tehnici de fabricare, se preconizează faptul că biomaterialele vor prezenta o dezvoltare și mai spectaculoasă în următorii ani.

Materialele cu aplicabilitate în domeniul biomedical dezvoltate până în acest moment sunt foarte numeroase și cuprind practic toate clasele amintite mai sus. Indiferent de nivelul de performanță al biomaterialelor și dispozitivelor medicale care există la momentul actual, se pot identifica necesități noi. Astfel, ideea acestei teze de doctorat s-a axat pe identificarea unor nișe și pe dezvoltarea unor materiale compozite noi, cu aplicații preponderent în domeniul biomedical, fiind însă posibilă utilizarea și în alte domenii.

Cercetările derulate în cadrul tezei de doctorat au implicat folosirea în trei direcții a unor materiale polimerice, ca matrice pentru dezvoltarea unor materiale compozite cu diverse aplicații posibile.

Primul aspect abordat a constat în obținerea unor materiale compozite tip film, din acetat de celuloză ranforsată cu particule ceramice din hidroxiapatită (AC+HAp).

A doua etapă a presupus dezvoltarea unor filamente pentru printarea 3D, folosind ca miez două materiale polimerice uzuale în acest domeniu (acid polilactic - PLA și poliuretan termoplastice - TPU), în suprafața cărora au fost introduse la anumite temperaturi și presiuni particule ceramice din hidroxiapatită (PLA/TPU+HAp).

Ultima etapă a studiului s-a axat pe obținerea unor materiale compozite tip filament din PLA și hidroxiapatită (PLA+HAp). Acestea pot fi utilizate pentru printarea 3D a unor produse implantabile, de tip scaffold (schele).

Capitolul 2. Stadiul actual al cercetărilor privind materialele compozite cu matrice polimerică și adaos de materiale ceramice, pentru aplicații medicale

Principial, un material compozit este compus din două sau mai multe materiale diferite, cu o zonă de legătură între acestea, numita interfață. Materialul de bază (sau faza continuă) este numit matrice, iar materialul sau materialele care se adaugă pentru îmbunătățirea proprietăților se numesc armături sau ranforsări.

Din punct de vedere macroscopic, aceste materiale se diferențiază unele de altele, dar caracteristicile și performanțele obținute în urma combinării lor sunt diferite față de cele ale materialelor de bază și mult îmbunătățite.

Din punct de vedere istoric, materialele compozite create de om sunt utilizate încă din antichitate, dar există și elemente din natură care pot fi considerate compozite, de exemplu lemnul. Și din punct de vedere al medicinei și ingineriei, unul dintre cele mai cunoscute și interesante materiale compozite naturale este chiar osul. Analizând natura, oamenii au învățat că se pot combina doi compuși total diferiți pentru a obține un material nou cu proprietăți îmbunătățite și semnificativ mai bune decât cele ale componentelor constitutive în sine. Astfel, domeniul ingineriei și științei materialelor se află într-o continuă dezvoltare, axată pe cercetarea și obținerea de noi biomateriale compozite.

În ceea ce privește aplicațiile biomedicale, materialele compozite reprezintă una dintre cele mai bune opțiuni pentru tratarea sau înlocuirea anumitor părți sau organe ale unui organism viu. Practic, utilizarea acestora poate fi nelimitată, deoarece proprietățile fizice, chimice și chiar mecanice ale acestora le pot face adecvate pentru orice tip de aplicație.

Aliajele metalice, polimerii, ceramicele, dar și materialele compozite utilizate în aplicații biomedicale, sunt în general obținute pe cale sintetică. Cercetările din ultimul timp din domeniul biomaterialelor pun accentul pe dezvoltarea de materiale biosintetice (sau bioartificiale), și anume acele materiale compozite care prezintă cel puțin un component de origine naturală, crescându-se astfel gradul de biocompatibilitate și respectiv de vindecare a zonei afectate, sau de acceptare de către organismul uman.

2.1 Materiale polimerice utilizabile ca matrice a materialelor compozite

Materialele polimerice prezintă proprietăți precum densitate scăzută, greutate moleculară crescută, nontoxicitate, bună biocompatibilitate, sterilizare ușoară, respectiv bune proprietăți mecanice, ceea ce le face potrivite pentru utilizarea ca biomateriale. Aplicabilitatea acestora în domeniul medical este vastă, pornind de la diferite tipuri de proteze și implanturi, articulații, cimenturi osoase, organe artificiale, membrane și alte componente ale organelor artificiale, scaffold-uri (schele) pentru regenerarea anumitor țesuturi, instrumente de eliberare controlată a medicamentelor, pentru confecționarea instrumentelor chirurgicale, etc.

În funcție de modul de obținere, polimerii pot fi:

- i. sintetici - obținuți în urma unor reacții chimice între monomeri;
- ii. naturali - proteine, polizaharide, polihidrocarburi, acizi nucleici;
- iii. artificiali - obținuți în urma modificărilor polimerilor naturali.

2.1.1 Polimeri sintetici pentru aplicații în domeniul biomedical

În domeniul biomedical este utilizată o varietate foarte mare de materiale polimerice sintetice, atât ca dispozitive biomedicale implantabile, cât și ca acoperiri în cazul dispozitivelor fabricate din materiale metalice.

Cei mai utilizați polimeri în domeniul biomedical, sunt biopolimerii termoplastici, cei termorigizi fiind întâlniți mai rar. Aceștia sunt de origine sintetică și sunt inerti față de organismul uman, fiind astfel potriviți pentru aplicațiile descrise anterior. Printre cei mai utilizați polimeri în domeniul medical sunt:

- *nailonul* și *polipropilena (PP)* sunt polimerii utilizați ca materiale de sutură.
- *tereftalatul de polietilenă (PET)* pentru grefarea vaselor cu diametre mari
- *politetrafluoroetilena (PTFE)* pentru grefarea ligamentului parodontal
- *PMMA* pentru cimentarea în cazul înlocuirii diverselor articulații, pentru rinoplastie și cranioplastie, sau pentru confecționarea lentilelor intraoculare
- *PVC* pentru tuburi și punji pentru transportul și depozitarea sângelui, membrane antibacteriene
- *poliacrilamida (PAM)* pentru diagnosticare medicală
- *polivinil acoolul (PVA)* pentru sisteme de administrare de medicamente
- *polimerii bioresorbabili* sunt materiale care se degradează fără efecte toxice asupra organismului, fiind eliminați în mod natural și fără a fi nevoie de intervenții chirurgicale ulterioare
- *acidul polilactic (PLA)* are aplicabilitate în chirurgia ortopedică, stomatologie și ortodonție, oftalmologie, sau în livrarea și eliberarea controlată de medicamente.
- *acidul poliglicolic (PGA)* este utilizat ca material de sutură chirurgicală
- *hidrogelurile* sunt utilizate în cazul inimilor artificiale sau lentilelor de contact

2.1.2 Polimeri naturali pentru aplicații în domeniul biomedical

Polimerii naturali au ca precursori sisteme biologice precum microorganisme, plante și alge sau animale. În ceea ce privește domeniul biomedical, aplicațiile polimerilor naturali sunt în general pentru regenerarea țesuturilor osoase, nervi, mușchi, cartilaj, piele sau organe precum pancreas și ficat.

Principalele grupe de polimeri naturali sunt:

- i. proteinele - colagen, gelatină, fibronectină, fibrină, elastină, fibroine;
- ii. polizaharide - chitină, chitosan, acid hialuronic, celuloză bacteriană, algi-nați;
- iii. poliesteri derivați naturali sau polihidroxicanoați (PHA).

Printre cei mai utilizați polimeri în domeniul medical sunt:

- *colagenul* utilizat pentru îmbunătățirea proprietăților, precum rezistența mecanică
- *gelatina* pentru sistemele de eliberare controlată de medicamente, pentru culturi celulare, capsule de medicamente și preparate cu vitamine
- *fibronectina* pentru adeziunea celulară, vindecarea rănilor și reepitelizare.
- *fibrina*, cu rol vital în homeostazie
- *elastina* utilizată în ingineria țesuturilor dermice sau vasele de sânge
- *fibroina* de mătăse utilizată în cazul țesutului osos și adipos, cartilajelor, ligamentelor sau vaselor de sânge

- *chitosanul* utilizată în ingineria țesuturilor sub formă de hidrogeluri și schele poroase
- *acidul hialuronic* utilizat în aplicații în ingineria țesuturilor, în medicină și cosmetică
- *celuloza* pentru aplicațiile în ingineria țesuturilor
- *chitina* pentru sisteme eliberare controlată de medicamente, mucoadeziune, îmbunătățire a permeabilității
- *alginatul* utilizat în ingineria țesutului osos

Atât polimerii sintetici, cât și cei naturali, prezintă avantaje și dezavantaje. Astfel, ingineria tisulară se bazează pe obținerea de produse cu proprietăți superioare, rezultate din combinarea celor două tipuri de polimeri.

2.2 Materiale ceramice

Biomaterialele ceramice sunt utilizate pe scară largă pentru fabricarea dispozitivelor biomedicale, datorită faptului că pot fi prelucrate într-o multitudine de forme, prezintă caracteristici mecanice bune, precum rezistența la compresiune, porozitate variabilă, biocompatibilitate ridicată, bune proprietăți de osteoinducție și o bună bioactivitate. Domeniile medicale de interes pentru aceste tipuri de materiale sunt stomatologia, chirurgia orală și maxilo-facială și ortopedia.

Un material bioactiv este acel material care, atunci când intră în contact cu un mediu fiziologic, permite și facilitează refacerea țesuturilor deteriorate, conducând astfel la apariția unei interfețe de legătură puternice între țesutul osos și proteză. Cele mai importante materiale bioceramice bioactive sunt cele pe bază de fosfați de calciu (componente ale structurii țesutului osos) și sticlele bioactive.

În funcție de scopul aplicației medicale pentru care sunt utilizate, bioceramicele se clasifică astfel:

- i. bioinerte - precum alumina și zirconia;
- ii. biodegradabile sau bioresorbabile - precum fosfatul tricalcic;
- iii. bioactive - fosfatul de calciu – hidroxiapatita (cel mai important).

Un material de substituție osoasă trebuie să prezinte, pe lângă o bună biocompatibilitate, și alte proprietăți superioare, precum osteoconductivitate, osteoinductivitate, bioactivitate și bioresorbabilitate.

2.2.1 Hidroxiapatita

Țesuturile dure, oasele și dinții organismelor vii sunt materiale compozite naturale, formate dintr-o componentă anorganică nanocristalină cu structură de apatit (apatita biologică) și o componentă organică din clasa fosfaților de calciu. Un material din categoria *apatitelor* reprezintă un grup de compuși cu structuri asemănătoare, dar cu compoziții diferite.

Dintre apatitele biologice, hidroxiapatita reprezintă 65% din structura osoasă, fiind componenta predominantă a acesteia, restul fiind reprezentat de structuri de origine organică, precum colagenul și apa.

Din punct de vedere biologic, țesutul osos este un țesut conjunctiv destinat susținerii tuturor celorlalte structuri ale corpului, rolul său fiind structural. Din punct de vedere structural, osul este un material compozit, format dintr-o matrice organică de fibre de colagen care se leagă chimic de faza anorganică sau minerală, formată din cristale aciculare de HAp.

Proprietăți precum, biocompatibilitatea ridicată, bioactivitatea, osteoconductivitatea și toxicitatea foarte scăzută fac din HAp un excelent înlocuitor și promotor de țesut osos.

2.2.2 Metode de obținere a hidroxiapatitei

În acest moment există foarte multe studii privind obținerea HAp. Metodele de obținere din precursori sintetici sunt:

- i. metode uscate - în stare solidă și mecano-chimică;
- ii. metode umede - chimice de precipitare, de hidroliză, hidrotermale, emulsie, sol-gel și sonochimice;
- iii. tratamente la temperaturi înalte - combustie și piroliză.

Prin intermediul *metodelor de sinteză uscate în stare solidă*, se obțin pulberi de HAp cu forme neregulate, granulație mare (nu se obțin dimensiuni de ordinul nanometrilor) și un grad de puritate scăzut, datorită faptului că materia primă utilizată are un preț scăzut, și deci o calitate mai slabă.

Metoda de sinteză uscată mecano-chimică este utilizată în scopul obținerii unor pulberi de HAp cu o structură bine definită în comparație cu metoda prezentată anterior. Este o metodă relativ simplă și reproductibilă, dacă sunt urmărite cu atenție anumite elemente de lucru precum tipul reactivilor, mediul de măcinare, viteza de rotație și durata etapelor de lucru.

Metoda umedă de sinteză prin *precipitare chimică* reprezintă una dintre cele mai ușoare tehnici de obținere a pulberii de HAp pe cale umedă, deoarece la un pH de 4.2 și la temperatură ambiantală aceasta este stabilă și nu se dizolvă în soluții apoase.

Prin intermediul *hidrolizei*, se pot obține nanoparticule de HAp din cele două faze ale compusului CaP, și anume fosfatul dicalcic dihidrat (DCPD) și fosfatul tricalcic (TCP).

În ceea ce privește metoda *hidrotermală*, parametri de lucru definitorii sunt temperatura și presiunea ridicată. Datorită acestor parametri, pulberea de HAp obținută este de înaltă puritate și prezintă un raport Ca/P corespunzător.

Metoda emulsiei se folosește atunci când se dorește controlul morfologiei și obținerea unor particule de mici dimensiuni, fără aglomerări de particule. Această metodă este destul de simplă, iar reactivii utilizați în acest caz sunt acidul ortofosforic și nitratul de calciu, datorită costurilor scăzute de achiziție și a disponibilității pe piață.

Metoda sol-gel se bazează pe amestecarea la nivel molecular și temperaturi scăzute a produșilor de reacție, în vederea obținerii unor pulberi fine și omogene de HAp.

Principiul pe care se bazează metodele *sonochimice* este acela că reacțiile chimice sunt activate de unde de ultrasunete foarte puternice, obținându-se astfel o HAp cu proprietăți mecanice îmbunătățite.

Metoda combustiei se bazează pe o reacție Redox puternic exotermă și autosușținută, dintre un oxidant și un produs organic în fază lichidă, rezultând o pulbere foarte fină, formată din aglomerări de particule de mici dimensiuni.

Piroliza sau metoda „spray piroliza”, reprezintă un procedeu simplu și rapid, prin care se obțin pulberi de HAp formate din particule stoichiometrice, omogene și cristaline.

2.2.3 Resurse naturale pentru obținerea hidroxiapatitei

Atunci când sunt utilizate ca precursori resursele de origine naturală, ceea ce se obține este cunoscută sub denumirea de „hidroxiapatită naturală”. Acest tip de hidroxiapatită se obține din resurse biologice, sau deșeuri organice cum sunt: oase de mamifere, oase și solzi de pește, surse acvatice sau marine, coji de ouă sau scoici, surse vegetale sau minerale precum calcarul.

Din punct de vedere stoichiometric, raportul molar Ca/P care favorizează și susține osteogeneza este de 1.67. HAp obținută din precursori naturali este în general nestoichiometrică, având atât deficit de Ca, cât și de P.

Precursorii de origine animală sunt raportați în literatura de specialitate ca fiind oase de mamifere, în general oase de bovine, și mai rar oase de cal sau porc. Pentru obținerea HAp se utilizează în general partea corticală a femurului, datorită asemănării din punct de vedere morfologic și structural cu oasele umane.

Cel mai mare inconvenient al acestor resurse îl reprezintă riscul de contaminare, de aceea un pre-tratament al materiei prime este necesar și indispensabil. Astfel, oasele animale sunt supuse unui pre-tratament care implică: spălarea, îndepărtarea murdăriei, îndepărtarea grăsimilor, a măduvei osoase și a țesuturilor moi.

Oasele și solzii de pește reprezintă o sursă bogată de precursori pentru obținerea HAp, datorită conținutului crescut de calciu, carbonați și fosfați. Ca și în cazul oaselor de mamifere, și în acest caz este necesar un pre-tratament în vederea eliminării materiei organice, fierberea fiind utilizată frecvent.

Resursele acvatice, mai precis *coralii* sunt utilizați datorită structurii pe care aceștia o prezintă (asemănătoare cu cea a unui os spongios). Astfel prin tratarea termică substanțele organice sunt îndepărtate, iar microstructura poroasă specifică coralului este menținută.

Cojile de ou și scoicile prezintă interes datorită conținutului mare de carbonat de calciu (CaCO_3), aproximativ 94%, care poate fi transformat în HAp prin diverse procedee.

În ceea ce privește *sursele vegetale*, atât plantele, cât și algele pot reprezenta potențiali precursori pentru sinteza HAp. În acest caz, studiile s-au axat pe anumite părți ale plantelor, precum: frunze, flori, tulpină sau lemn; pe deșeuri din plante precum cojile de fructe și legume sau deșeuri din industria de prelucrare a fructelor, și de asemenea pe alge.

Sursele minerale naturale, precum calcarul, sunt de asemenea utilizate în obținerea HAp, datorită abundenței cu care se găsește, dar și a faptului că acesta se formează din precipitarea scheletelor animale, cochiliilor și a algelor, fiind astfel o sursă bogată de CaCO_3 .

2.3 Materiale compozite cu matrice de origine polimerică

Un material compozit este format din două sau mai multe faze, dintre care una este continuă și este denumită matrice sau faza de bază, iar cea de-a doua sau celelalte faze sunt discontinue și sunt denumite umplutură/umpluturi sau faza/fazele de armare sau ranforsare. Aceste faze prezintă proprietăți morfologice și compoziționale diferite, dar împreună conferă noului material format, cel compozit, proprietăți superioare, independente de cele ale materialelor din care s-a format.

Clasificarea materialelor compozite, se face în funcție de:

- materialul matricei: cu matrice metalică, polimerică, ceramică sau organică;
- materialul de ranforsare: cu adaos de particule sau fibre

2.3.1 Metode de obținere a materialelor compozite tip film cu matrice de origine polimerică

Materialele compozite tip film sunt obținute sunt obținute cel mai adesea prin tehnici de inversie de fază. Acestea presupun trecerea controlată a materialului de origine polimerică din stare lichidă în stare solidă. Acest fenomen are loc atunci când polimerul în stare lichidă este imersat într-un lichid inert față de acesta.

Metodele de obținere a filmelor cu matrice de origine polimerică se diferențiază între ele în funcție de mecanismul de desolvatare, astfel:

- i. separarea de faze indusă termic (TIPS);
- ii. separarea de fază indusă de vapori (VIPS) - precipitarea din faza de vapori;
- iii. separarea fazelor indusă de evaporarea solventului (SEIPS) - turnarea în aer a unui polimer în stare lichidă;
- iv. separarea de fază indusă de nonsolvent (NIPS) - precipitarea prin imersie.

2.3.2 Metode de obținere a materialelor compozite masive cu matrice de origine polimerică

Materialele compozite masive se pot obține prin intermediul mai multor tehnici precum:

- i. turnare prin compresie;
- ii. turnare prin injecție;
- iii. turnare prin transfer de rășină;
- iv. întindere manuală;
- v. întindere prin pulverizare;
- vi. pultruzie;
- vii. turnare cu sac de vid;
- viii. turnare cu pungi sub presiune;
- ix. turnare în autoclave;
- x. înfășurare cu filament;
- xi. infuzie cu peliculă de rășină.

2.3.3 Aplicații ale materialelor compozite în domeniul biomedical

Materialele compozite cu bază polimerică utilizate în ultima perioadă în domeniul biomedical sunt materiale avansate, capabile să asigure în primul rând o foarte bună biocompatibilitate cu organismul uman. Acestea sunt utilizate într-o multitudine de aplicații pentru diverse ramuri ale medicinei, precum ortopedia, stomatologia sau ingineria țesuturilor moi.

În ceea ce privește domeniul ortopedic, materialele compozite polimerice sunt utilizate în aplicații precum obținerea de șuruburi și plăci de fixare pentru fracturi, grefe osoase, cimenturi osoase, înlocuirea sau repararea articulației șoldului sau degetelor, etc. Acest domeniu este unul provocator și în continuă dezvoltare, datorită gamei largi de aplicații pentru care este nevoie de astfel de produse.

În cazul domeniului dentar, materialele compozite au ca matrice rășinile polimerice și sunt utilizate în aplicații de restaurare și ca adezivi. Aceste materiale trebuie să prezinte anumite caracteristici, precum rezistența micromecanică, pentru a fi adecvate utilizării în cavități mici

precum cele din zona bucală. În plus proprietăți precum aspectul comparabil cu cel al dinților, insolubilitatea în apă, insensibilitatea la deshidratare, dar și prelucrabilității simple și costurile destul de reduse, fac aceste materiale preferabile pentru domeniul dentar.

În ingineria tisulară, cele mai utilizate materiale sunt polimerii sintetici biodegradabili și anume PLA, PGA și PLGA (acid polilactic-co-glicolic). Aceștia sunt utilizați ca matrice a materialului compozit, iar ca material de ranforsare se utilizează hidroxiapatită sau sticlă bioactivă sub formă de particule sau fibre.

În ingineria țesuturilor dure, cele mai utilizate materiale compozite sunt cele de tip polimer – ceramică. La origine, osul poate fi tratat ca un material compozit în care baza este colagenul, iar celelalte componente sunt apa, hidroxiapatita, materiile organice și cele anorganice.

2.4 Fabricația aditivă utilizată pentru obținerea dispozitivelor biomedicale

Fabricația aditivă este cunoscută și sub denumiri precum printare 3D sau prototipare rapidă și reprezintă o tehnică de conversie a unui model computerizat într-o structură tridimensională, prin imprimarea și depunerea unor straturi consecutive.

În ceea ce privește domeniul biomedical, imprimarea polimerilor este avantajoasă pentru mai multe direcții, datorită diversității caracteristicilor materialelor polimerice, versatilității geometriilor și arhitecturilor complexe care pot fi obținute, spre deosebire de procesele tradiționale de fabricație. Termenul de bioprintare este utilizat atunci când produsele obținute au ca scop utilizarea în aplicații medicale.

2.4.1 Tipuri de tehnologii de fabricație aditivă cu aplicabilitate în domeniul biomedical

Există diferite tehnologii de fabricație aditivă, fiecare dintre aceste tehnici prezintă atât avantaje, cât și dezavantaje, enumerate în următorul tabel:

FDM	
Avantaje	pretabil pentru multe tipuri de materiale, rezistență ridicată, cost scăzut
Dezavantaje	anizotropie, înfundarea diuzei
Mecanism	extrudarea și depunerea materialului
Materiale	PC, PLA, ABS, nailon
Tip precursor	filament
SLA	
Avantaje	rezoluție înaltă de printare
Dezavantaje	limitarea materialelor, costuri ridicate, citotoxicitate
Mecanism	scanare laser și sinterizare indusă UV
Materiale	rășini epoxidice sau pe bază de acrilat
Tip precursor	fotopolimer lichid
SLS	
Avantaje	rezistență ridicată, îndepărtarea ușoară a suportului de pulbere
Dezavantaje	costuri ridicate, suprafețe pudrate
Mecanism	scanare laser și sinterizare indusă la cald
Materiale	PCL, poliamide pudră

Tip precursor	pudră
PLP	
Avantaje	pretabil pentru multe tipuri de materiale, costuri reduse, îndepărtarea ușoară a suportului de pulbere
Dezavantaje	contaminarea liantului, înfundarea jetului de liant
Mecanism	imprimarea liantului prin cădere la cerere
Materiale	orice material sub formă de pulbere, cu liant
Tip precursor	pudră
RoboCasting	
Avantaje	rezoluție înaltă de printare, obținerea de materiale fine
Dezavantaje	rezistență mecanică scăzută, proces încet
Mecanism	orificiu presurizat și sinterizare la cald sau indusă UV
Materiale	PLA, PCL, hidrogeluri
Tip precursor	lichid sau pastă

2.4.2 Fabricația aditivă a materialelor compozite cu matrice polimerică

Prin ranforsarea cu materiale sub formă de particule, fibre, nanoparticule sau ceramici, proprietățile mecanice și funcționale sunt îmbunătățite, iar printarea se realizează cu o precizie ridicată.

Materialele compozite cu matrice polimerică și ranforsare cu materiale tip particule prezintă proprietăți funcționale și structurale superioare celor ale materialului matricei dar și ranforsării. În ceea ce privește particulele de ranforsare, acestea pot fi de diferite tipuri și se pot combina cu polimeri puri sau termoplastici, sub formă de lichide sau pulberi. Tehnicile de fabricație aditivă utilizate pentru printarea unor astfel de materiale compozite sunt FDM, SLA și SLS.

Materialele compozite cu matrice polimerică și ranforsare cu materiale tip fibre sunt de interes datorită rezistenței ridicate la compresiune, la coroziune și a rigidității. Tehnicile de fabricație aditivă utilizate pentru printarea acestor materiale compozite sunt FDM și polyJet, alte tehnici nefiind utilizate datorită rugozității suprafeței.

Materialele compozite cu matrice polimerică și ranforsare cu materiale tip nanoparticule prezintă un foarte mare interes, deoarece nanotehnologiile fac parte și influențează viața de zi cu zi, prin aplicabilitatea pe care o au în domenii precum cel biomedical, sportiv, auto, etc. Astfel, nanotehnologiile au început să aibă aplicabilitate și în domeniul manufacturării aditive prin ranforsarea matricilor polimerice cu nanoparticule de grafit, grafenă sau nanotuburi de carbon.

Materialele compozite cu matrice polimerică și ranforsare cu materiale ceramice pot fi obținute prin orice tehnică de fabricație aditivă care se bazează pe materie primă tip pulbere.

2.4.3 Aplicații ale tehnologiilor de fabricație aditivă în domeniul biomedical

Deoarece tehnicile de fabricație aditivă (AM) sunt versatile atât din punct de vedere al materialelor utilizate (sintetice și naturale), cât și al domeniilor de aplicabilitate, acestea prezintă un mare interes și în cazul domeniului biomedical. Se estimează că aplicațiile tehnicilor

AM în domeniul medical reprezintă aproximativ 11% din total, acest procent fiind în continuă creștere.

Tehnicile de fabricație aditivă permit atingerea tuturor acestor obiective, devenind astfel utile în stabilirea strategiilor chirurgicale prin îmbunătățirea eficienței și în anumite cazuri prin reducerea probabilității de apariție a necesității efectuării unor intervenții ulterioare. În ceea ce privește aspectul economic, tehnicile AM sunt mai accesibile comparativ cu cele tradiționale, și datorită aspectelor precum timpul de producție redus și a pierderilor de material minimale.

Printre aplicațiile medicale obținute cu succes prin intermediul acestor tehnici se numără obținerea articulațiilor protetice, a articulațiilor temporo-mandibulare, a dispozitivelor protetice personalizate pentru chirurgia ortopedică, sau personalizarea dispozitivelor de dozare de medicamente.

Se poate spune că tehnicile de fabricație aditivă au cunoscut în ultimii ani o dezvoltare extraordinară datorită versatilității atât din punct de vedere a materialelor, cât și a complexității structurilor obținute. Datorită faptului că sunt tehnici noi, moderne, care se află în continuă dezvoltare, acestea prezintă bineînțeles și unele dezavantaje față de tehnicile clasice, consacrate.

Se poate utiliza o gamă largă de materiale, pornind de la metale, polimeri, ceramici, și până la materiale compozite cu ranforsări de tip particule, fibre, nanoparticule sau ceramici. Alegerea materialelor depinde de caracteristicile produsului final, dar și de proces. În ceea ce privește aplicațiile pentru domeniul biomedical, materialele se aleg în funcție de zona anatomică (țesut dur sau moale) și implicit de aspectele mecanice pe care trebuie să le îndeplinească. Astfel, materialele compozite sunt cel mai adesea utilizate deoarece sunt versatile și pot îndeplini cerințele mecanice, prin controlarea riguroasă a adaosului de material de ranforsare.

PARTEA a II-a

CERCETĂRI EXPERIMENTALE

Capitolul 3. Metodologia cercetării

În cadrul acestei teze de doctorat, unul dintre obiectivele principale a constat în obținerea unor materiale noi sau îmbunătățite, cu aplicații în domeniul biomedical, folosind ca bază cele mai noi rezultate prezentate în literatură.

Întrucât în cazul efectuării unor operații de adiție osoasă, indiferent de tipul materialului pulverulent folosit, este necesară menținerea acestuia în locul în care a fost inserat pe perioade lungi de timp (de ordinul lunilor), se pot folosi materiale tip film pentru fixarea acestora. Ideea principală în acest sens a constat în încercarea de a dezvolta un material care să aibă caracteristicile minime necesare în sensul de a menține materialul de adiție în locul în care a fost inserat, dar și de a aduce un aport de substanțe care pot contribui la refacerea mai rapidă a osului. Astfel, au fost dezvoltate filme compozite din acetat de celuloză (un material bioresorbabil) și particule de hidroxiapatită. Pentru simplificare, denumirea acestor tipuri de materiale a fost abreviată, fiind utilizate în continuare sub pseudonimul „CA+HAp”.

Un alt aspect important în domeniul chirurgiei, unde apar și defecte osoase cu dimensiuni mari, este legat de materialele care pot umple temporar golurile respective. Printarea 3D, permite obținerea unor produse cu geometrii complexe, așa cum este necesar în unele situații, dar materialele disponibile nu oferă cele mai bune condiții de refacere a țesutului osos. Pentru a răspunde acestei solicitări, o posibilitate identificată a constat în folosirea pentru printarea 3D a unor filamente din materiale compozite resorbabile în timp, dar care după efectuarea operației chirurgicale să permită eliberarea unor cantități de elemente necesare refacerii osului (Ca și P). În acest sens, s-a optat pentru două tehnologii diferite.

Prima metodă a presupus inserarea superficială a unor particule de hidroxiapatită în filamente de acid polilactic - PLA (material bioresorbabil) și în poliuretan termoplastice – TPU. Pentru simplificare, denumirea acestor tipuri de materiale a fost abreviată, fiind utilizate în continuare sub pseudonimul „PLA/TPU+HAp”.

A doua tehnologie a presupus omogenizarea unor particule de hidroxiapatită într-o matrice de polimer bioresorbabil de tip PLA. Pentru simplificare, denumirea acestor tipuri de materiale a fost abreviată, fiind utilizate în continuare sub pseudonimul „PLA+HAp”.

3.1 Materiale folosite pentru obținerea celor trei tipuri de materiale compozite

Materialele compozite investigate în această teză de doctorat au fost obținute prin combinarea sub diverse forme a hidroxiapatitei sintetizată din resurse de origine naturală și a trei tipuri diferite de materiale polimerice: acetat de celuloză, acid polilactic și poliuretan termoplastice. Pulberea de hidroxiapatită a fost obținută țesut osos bovin, iar materialele polimerice au fost procurate comercial.

3.2 Fluxul tehnologic de obținere a pulberii de hidroxiapatită

Componenta ceramică (pulberea de HAp din os bovin) a fost obținută conform unei rute prezentate în literatura de specialitate. Astfel, oasele de origine bovină achiziționate de la abatoarele locale au fost supuse unor tratamente termice de fierbere pentru îndepărtarea materiei organice, deproteinizare pentru îndepărtarea urmelor de colagen și calcinare.

Pentru obținerea pulberii de hidroxiapatită, oasele calcinate au fost măcinate, pulberea rezultată fiind sortată granulometric obținându-se astfel mai multe sorturi granulometrice de pulbere de HAp.

3.3 Metode de analiză și caracterizare a materialelor

- microscopie electronică de baleiaj (SEM)
- spectroscopie de radiații X cu dispersie după energii (EDS)
- spectroscopie cu fotoelectroni de radiații X (XPS)
- spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)
- microtomografie computerizată (μ CT)
- evaluare a unghiului de contact (CA)
- prelucrare și analiză digitală a imaginilor (pseudocolorare și profile de rugozitate)
- evaluarea permeației de apă și a retenției de proteină
- evaluarea biocompatibilității *in vitro*
- încercarea de rezistență la compresiune
- aderența particulelor la substrat – testare de tip pull-out
- calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)

Capitolul 4. Obținerea unor materiale compozite polimer-ceramică în formă de film cu matrice din acetat de celuloză ranforsată cu hidroxiapatită

Scopul general al acestei componente a studiului a constat în obținerea unor structuri polimer-ceramică în formă de film, din precursori de origine naturală, pentru aplicații biomedicale. Aceste structuri constau dintr-o matrice de acetat de celuloză, extras din plante, cu un adaos de diferite concentrații de pulbere de hidroxiapatită (HAp).

4.1 Obținerea materialelor compozite în formă de film cu matrice din acetat de celuloză ranforsată cu hidroxiapatită

Pentru obținerea materialelor compozite de acest tip, a fost utilizată pulbere de HAp din două sorturi dimensionale diferite, și anume $<20 \mu\text{m}$ și $<40 \mu\text{m}$. Omogenizarea soluției de polimer cu pulberea de HAp s-a realizat cu o sondă de ultrasonare, timp de 1 și 4 minute, astfel încât să se asigure dispersia diferită a particulelor. Materialele compozite tip film au fost obținute prin inversie de fază prin imersie în apă.

4.2 Rezultate și discuții privind caracterizarea materialelor compozite în formă de film cu matrice din acetat de celuloză ranforsată cu hidroxiapatită

4.2.1 Caracterizarea morfologică și compozițională

Matricele de AC obținute la un timp de dispersie de 1 și 4 minute, au prezentat structuri poroase, cu pori sferici și cu forme complexe, interconectați. Prin adăugarea diferitelor cantități de pulberi de HAp, se produce aglomerarea particulelor, ceea ce conduce la formarea agregatelor.

În ceea ce privește dimensiunile agregatelor, acestea sunt proporționale cu cantitatea de pulbere de HAp adăugată, în general inducând și o suprafață complet modificată. În plus, s-a constatat faptul că există o corelație directă între mărimea particulelor și gradul de aglomerare al acestora. În ceea ce privește materialele compozite cu adaos de pulbere de HAp <40 μm, există o tendință accentuată de colmatare a porilor matricei de AC. În ceea ce privește influența timpului de dispersie asupra morfologiei filmelor din materiale compozite, se observă diferențe clare, în funcție de cantitatea de pulbere de HAp. Un timp mai îndelungat (4 minute) a asigurat o distribuție mai omogenă a particulelor în matricea de AC și în același timp a împiedicat formarea unor agregate de dimensiuni mari.

Din punct de vedere compozițional, analizele EDS efectuate pe probele de referință au demonstrat prezența elementelor caracteristice AC și anume C și O. În ceea ce privește filmele compozite, s-a observat faptul că intensitățile semnalelor corespunzătoare elementelor principale ale HAp (Ca și P) cresc proporțional cu concentrația de pulbere adăugată.

Pentru o mai bună înțelegere, uniformitatea compozițională a suprafeței probelor a fost evidențiată prin utilizarea cartografierei EDS – analiză tip mapping.

Conform observațiilor anterioare efectuate în spectrele EDS, dimensiunea mai mică a particulelor și timpul de dispersie prelungit determină o dispersie uniformă a particulelor în întregul volum al matricei, cartografierea EDS oferind reprezentarea vizuală a compoziției suprafeței.

4.2.2 Reconstrucția topografică și evaluarea rugozității

Reconstrucțiile 3D și profilele de rugozitate corespunzătoare tuturor probelor au fost efectuate în urma procesării digitale a micrografiilor. Astfel, după adăugarea pulberii de HAp și după dispersia cu ultrasunete în diferite intervale temporale, se observă apariția unor modificări clare în imaginile de reconstrucție 3D. Este confirmată tendința de aglomerare a particulelor, prin prezența agregatelor cu dimensiuni și forme variabile dependente de timpul de ultrasonare.

Analiza profilelor de rugozitate a suprafeței confirmă faptul că timpul de dispersie influențează în mod direct rugozitatea suprafeței. Evoluția parametrilor de rugozitate, profilurile indică o scădere a intensității vârfulor la timpi de dispersie mai mari. Dispersia corespunzătoare a particulelor de HAp în matricea de AC previne aglomerarea particulelor și formarea de agregate, rezultând astfel o suprafață mai netedă.

4.2.3 Evaluarea grupărilor funcționale

Spectrele materialelor compozite au fost împărțite în două domenii de interes, $500 - 700 \text{ cm}^{-1}$ și $950 - 1850 \text{ cm}^{-1}$, fiecare dintre acestea raportate la spectrele de referință ale matricei de AC.

În cazul materialelor compozite, benzile de vibrații specifice grupării ortofosfat PO_4^{3-} din structura HA au fost găsite la 573 și 603 cm^{-1} , 966 cm^{-1} și 1045 cm^{-1} . La 626 cm^{-1} sunt prezente benzi specifice unităților funcționale structurale hidroxil. Au fost de asemenea identificate benzile caracteristice acetatului de celuloză la 1232 cm^{-1} pentru legăturile C – O, 1373 cm^{-1} pentru $-\text{CH}_2$, 1598 cm^{-1} (modul de întindere asimetric) și 1654 cm^{-1} (modul de întindere simetric) pentru C=C și 1745 cm^{-1} pentru C=O.

În plus, s-a observat faptul că odată cu creșterea timpului de dispersie cu ultrasunete, se intensifică intensitățile benzilor în spectrele IR.

Cu excepția unor benzi apărute la $2600 - 3800 \text{ cm}^{-1}$ și caracteristice la vibrațiilor de întindere a legăturilor O – H în moleculele de apă absorbită, nu au fost înregistrate alte modificări semnificative în intervalul $1900 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

4.2.4 Analiza prin spectroscopie cu fotoelectroni de radiații X (XPS)

La aproximativ 285 eV și respectiv 530 eV se observă prezența atomilor de C și O, pentru toate probele, acestea constituind elementele principale ale AC. Creșterea intensității vârfurilor este atribuită probelor pregătite la un timp de dispersie de 4 minute.

Chiar dacă HAp nu a fost observată la suprafața probelor, o abordare indirectă poate fi efectuată cu privire la raportul C/O % atomice, care a crescut odată cu adăugarea componentei anorganice. Ca viziune generală, valorile sunt mai mari pentru probele obținute la un timp de dispersie de 4 minute. O explicație poate fi conturată datorită faptului că legătura C – O este flexibilă și astfel poate fi orientată spre particulele de HAp care sunt încorporate în matricea polimerică, inducând o compoziție a suprafeței saturată în oxigen.

Este posibil ca grupările funcționale acetat din lanțul polimeric să formeze de asemenea și unele interacțiuni fizice cu particulele de HAp. În timpul procesului de ultrasonare, lanțurile macromoleculare capătă energie pentru a deveni mai flexibile, și astfel se poate explica creșterea mobilității grupărilor acetat.

4.2.5 Analiza prin microtomografie computerizată (μCT)

Formarea agregatelor prin aglomerarea particulelor este clar observată în întregul volum, aceasta evoluând în funcție de creșterea dimensiunii particulelor, dar și de timpul de dispersie. Odată cu creșterea dimensiunii particulelor și concentrației de pulbere, tendința de colmatare a structurii poroase devine tot mai proeminentă. Acest fapt susține evaluarea morfologică.

Reconstrucțiile 3D confirmă faptul că asocierea acestor efecte poate fi moderată în urma dispersiei pe o perioadă de timp prelungită. Astfel, se poate observa faptul că particulele de dimensiuni mai mari prezintă o dispersie preferențială la o perioadă de 1 minut, pe când la 4 minute, atât suprafața, cât și secțiunile în volum prezintă aspect uniform și omogen, cu un număr redus de agregate, chiar și la concentrații mai mari de pulbere.

4.2.6 Analiza umectabilității suprafeței

Valorile unghiului de contact au fost înregistrate la o secundă după căderea picăturii de apă depusă pe suprafața acestora. Valorile ridicate ale unghiului de contact sunt direct proporționale cu creșterea concentrației de pulbere de HAp pentru ambele tipuri de pulbere.

Acest fapt reprezintă o consecință imediată a formării agregatelor pe suprafața probelor care induc modificări atât din punct de vedere al rugozității, cât și al energiei locale a suprafeței.

Din punct de vedere al timpului de dispersie cu ultrasunete, acesta prezintă o influență directă asupra umectabilității suprafețelor probelor, independent de concentrația adăugată. Astfel, o durată mai mare de dispersare este asociată cu dispersia uniformă a particulelor în matricea de AC și cu absența agregatelor mari, rezultând astfel un caracter hidrofil îmbunătățit. Toate probele investigate au prezentat un caracter hidrofil, cu valori ale unghiului de contact $<90^\circ$.

În consecință, se poate induce o umectabilitate a suprafeței controlată, prin varierea parametrilor cheie implicați în timpul procesului de sinteză a materialelor compozite.

4.2.7 Permeația de apă și retenția de proteină

Scopul investigațiilor privind debitul de apă care trece prin probe este acela de a demonstra stabilitatea acestora din punct de vedere hidrodinamic, în concordanță cu distribuția particulelor de HAp în matricea de AC. Valorile debitului descresc proporțional cu creșterea concentrației de pulbere de HAp și a dimensiunii particulelor. În plus și timpul de dispersie prelungit influențează capacitatea de curgere a apei.

Se observă faptul că probele obținute la un timp de dispersie de 4 minute prezintă valori ale debitului de apă mai mari decât cele obținute la 1 minut, fapt datorat absenței agregatelor de mari dimensiuni (deci porii matricei nu sunt înfundați).

Aceleași argumente sunt valabile și în cazul retenției de proteine. Proteinele reținute pe suprafața materialelor compozite și cele care au trecut prin porii acestora au fost măsurate din 10 în 10 minute, pe o perioadă de timp de 120 de minute.

În acest sens, au fost alese două proteine cu rol important în organismul uman, și anume hemoglobina cu rol în transportul oxigenului și albumina serică. Se observă o creștere a retenției de proteine pe suprafața probelor, direct proporțională cu creșterea concentrației de pulbere de HAp și cu creșterea dimensională a particulelor. În ceea ce privește timpul de dispersie, probele obținute la 4 minute prezintă o scădere a retenției de proteine, spre deosebire de cele obținute la 1 minut.

4.2.8 Testarea biocompatibilității *in vitro*

Cercetarea s-a axat pe determinarea răspunsului pre-osteoblastelor MC3T3-E1, și a fost studiată din punct de vedere al aderenței și morfologiei celulare dar și al viabilității.

În primul rând, a fost investigată capacitatea materialelor compozite de a susține proliferarea celulelor și morfologia acestora, prin marcarea fluorescentă a actinei citoscheletale cu faloidină. Astfel, la 24 de ore după însămânțare, osteoblastele cultivate pe substraturile compozite au prezentat diverse distribuții și trăsături morfologice. În mod predominant, celulele

MC3T3-E1 prezintă o morfologie poligonală tipică, cu numeroase lamellipodia și fibre de tensiune actinice bine reprezentate.

În cazul materialelor compozite, pe suprafața acestora celulele MC3T3-E1 prezintă o morfologie predominant în formă de fus. Acest tipar a răspândirii celulare și a morfologiei poate fi explicat prin diferențe în caracteristicile de suprafață ale substraturilor analizate. Aceleași ipoteze sunt valabile și pentru o perioadă de 7 zile după însămânțare.

Performanța biologică a substraturilor compozite obținute a fost, evaluată și prin investigarea potențialului lor de susținere a viabilității pre-osteoblastelor MC3T3-E1, prin efectuarea testului CCK-8 după 24 de ore de cultură. Numărul activelor metabolice viabile pe materialele compozite obținute a fost aproape similar cu materialele de referință, fără semnificație statistică, pentru ambele grupuri experimentale studiate. În ceea ce privește viabilitatea celulară după 7 zile de cultură, se poate observa un potențial în creștere de susținere a celulelor MC3T3-E1.

4.2.9 Concluzii preliminare

Modularea parametrilor de obținere a avut o influență directă atât asupra caracteristicilor suprafeței, cât și asupra volumului. Dintre acestea, timpul prelungit de dispersie a particulelor ceramice s-a dovedit a fi elementul cheie pentru obținerea unui aspect uniform și omogen al suprafeței și în volum. În ceea ce privește hidrofilicitatea, permeabilitatea apei și retenția de proteine, rezultatele combinate au evidențiat viabilitatea materialelor obținute pentru aplicații de regenerare osoasă. În plus, pentru o dispersie adecvată în volum și aderență celulară optimă, se recomandă folosirea unor particule de dimensiuni cât mai mici pentru obținerea materialelor compozite.

Mai mult, investigațiile *in vitro* cu pre-osteoblaste MC3T3-E1 au demonstrat că toate substraturile compozite dezvoltate au obținut un răspuns bun al osteoblastelor în ceea ce privește aderența, morfologia și viabilitatea celulară, denotând astfel perspective promițătoare pentru aplicațiile de regenerare osoasă ghidată.

Capitolul 5. Obținerea unor materiale compozite polimer-ceramică în formă core-shell cu matrice din acid polilactic/poliuretan termoplastic ranforsată cu particule de hidroxiapatită

Scopul celei de-a doua părți a studiului experimental a constat în obținerea unor structuri polimer-ceramică în formă core-shell, din doi polimeri consacrați în domeniul biomaterialelor și anume acidul polilactic (PLA) și poliuretan termoplastic (TPU). În ceea ce privește componenta ceramică, hidroxiapatita, aceasta a fost obținută din oase de origine bovină prin aceeași rută de obținere descrisă în capitolul anterior. Filamentele obținute se intenționează a fi utilizate pentru printarea 3D.

5.1 Obținerea materialelor compozite în formă core-shell

Pentru a obține materialele compozite tip core-shell, și anume filamentul polimeric acoperit cu bioceramică, au fost utilizate două tipuri de materiale polimerice, filament de PLA

și filament de TPU. Filamentele au fost așezate pe un pat de pulbere de HAp, cu dimensiunea particulelor >125 μm, peste care s-a adăugat un nou strat de pulbere (necesar pentru acoperirea completă a filamentului).

Filamentele acoperite complet într-un volum de HAp au fost presate sub acțiunea unor forțe de presare diferite, și tratate termic într-un cuptor electric pentru diferite perioade de timp (30, 60 și 120 de minute) și temperaturi diferite (195 °C, 205 °C, 215 °C). Ultimul pas a implicat vibrarea cu ultrasunete a probelor, pentru a elimina particulele care nu au aderat la suprafața polimerilor.

5.2 Rezultate și discuții privind caracterizarea materialelor compozite în formă core-shell cu matrice de acid polilactic/poliuretan termoplastic ranforsată cu particule de hidroxiapatită

5.2.1 Caracterizare din punct de vedere morfologic și compozițional

Din punct de vedere morfologic, diferențele dintre probe pot fi observate clar. În ceea ce privește influența parametrilor de lucru asupra morfologiei, se observă faptul că temperatura reprezintă principalul factor de influență. La temperatura de 195°C, se observă o aderență de cantități diferite de particule de dimensiuni mici la suprafața ambelor materiale polimerice. În cazul filamentelor de PLA, o cantitate mai mare de particule generează un aspect mai rugos al suprafeței, în comparație cu filamentele de TPU unde o cantitate mai mică de particule aderate duce la pe o suprafață cu aspect mai neted și cu o distribuție aproximativ uniformă.

Odată cu creșterea temperaturii, se observă o modificare a morfologiei acoperirii, astfel că la 205°C, atât particulele de dimensiuni mici, cât și cele de dimensiuni mari aderă la suprafața ambelor tipuri de polimeri. În ceea ce privește filamentul de PLA, particulele mici au aderat la suprafața polimerică, în timp ce în cazul filamentului de TPU, predominanța este atribuită particulelor din gama de dimensiuni mari a pulberii de HAp utilizate.

Temperatura maximă folosită în acest studiu (215°C) are o influență definitivă asupra aspectului acoperirilor materialelor, astfel încât, în cazul acestora, pe suprafața ambelor tipuri de polimeri, doar particulele mari au aderat în cele din urmă.

În ceea ce privește analiza compozițională, spectrele EDS ale ambelor tipuri de structuri au relevat vârfuri specifice ale elementelor principale ale HAp, în special Ca și P. În ceea ce privește prezența vârfului de carbon în spectrele EDS, aceasta denotă existența substratului polimeric.

5.2.2 Analiza variației formei filamentelor

Din punct de vedere al influenței tuturor factorilor implicați în procesul de sinteză a materialelor tip core-shell, și anume forța de presare, timpul și temperatura, au fost efectuate diferite tipuri de investigații. În primul rând, s-a efectuat o analiză morfologică a secțiunii transversale a ambelor tipuri de materiale.

Factorul de formă reprezintă abaterea de la forma cilindrică inițială a filamentelor, până la forme nedeterminate și neregulate. Datorită forței de presare aplicate incremental, forma secțiunii transversale a probelor devine mai complexă și distinctă față de forma ovoidală prezentă în cazul materialelor de referință (obținute fără forță de presare). Maximul și minimumul

măsurat perpendicular pe axa longitudinală a fiecărei micrografii au fost utilizate pentru a explica gradul de deformare. În consecință, axele x și y au fost alese în funcție de direcția preferențială de deformare și nu ca orizontală și perpendiculară pe pagină.

Valorile mai mici obținute (de la valoarea maximă 1.0 corespunzătoare materialului de referință până la zero) sunt direct proporționale cu creșterea neregularității probelor.

Filamentele polimerice se topesc în furtunul de alimentare al imprimantelor 3D comerciale, după ce se parcurge un traseu definit. Prin urmare, forma secțiunii transversale trebuie considerată un parametru important.

De aceea, este important ca forma rotundă inițială a filamentului să se păstreze și să fie cât mai fidelă, fără a fi afectată de inserarea în masă a pulberii de HAp. Luarea în considerare și menținerea acestui aspect asigură faptul că aceste tipuri de materiale sunt adecvate pentru aplicații de fabricație aditivă.

Se poate concluziona faptul că:

- materialele pe bază de PLA prezintă o variație accentuată a factorului de formă în comparație cu cele de TPU ;
- creșterea timpului de expunere este direct proporțională cu scăderea factorului de formă.

5.2.3 Analiza încorporării particulelor ceramice prin măsurarea variației masice

În ceea ce privește variația masică, acesta este direct proporțională cu gradul de încorporare a particulelor de HAp în suprafața materialului polimeric, rezultând astfel învelișul bioceramic. În cazul filamentelor de PLA, așa cum sa observat anterior în figura 5.5A la temperatura de 195°C, probele de referință au prezentat cea mai mare cantitate de pulbere încorporată, indiferent de timpul de expunere. La această temperatură, materialul de referință a afișat cea mai mare variație de masă, adică 100%. În concluzie, masa finală a materialului tip core-shell este dublă față de cea a polimerului PLA inițial.

În ceea ce privește gradul de încorporarea al particulelor de HAp la 195°C, în cazul filamentului de TPU, acesta este ușor diferit comparativ cu cel de PLA, rezultând astfel o variație a masei destul de redusă. Temperatura de 205°C determină în cazul filamentelor de PLA o bună încorporare a particulelor ceramice, direct proporțională atât cu creșterea timpului de expunere, cât și cu creșterea forței de presare. Din punct de vedere al masei finale a materialelor obținute tip core-shell, aceasta poate varia până la 120% din masa inițială a polimerului, sugerându-se astfel un grad de încorporare de pulbere de HA crescut. În plus, la această temperatură, încorporarea de particule în suprafața filamentului de TPU urmează aceeași tendință descendentă, cu un model imprevizibil, independent de modificarea parametrilor de obținere. Mai mult, masa acestora variază foarte greu, astfel că valorile finale ale masei au fost cu cel mult 50% mai mari decât cele ale polimerului inițial.

Odată cu creșterea temperaturii la 215°C, masa finală a materialelor tip core-shell este modificată drastic. În cazul materialelor compozite pe baza de PLA, se observă o creștere semnificativă a masei. Odată cu creșterea timpului de expunere și a forței de apăsare, masa acestora crește proporțional, până la valori de 200%.

În plus, în ceea ce privește filamentele din TPU, sunt observate modificări semnificative ale variației masei. Deoarece temperatura este ridicată, particulele aderă cu ușurință la suprafața polimerului și, prin urmare, masa materialelor compozite finale crește până la 160% la un timp de expunere crescut, și anume 120'.

5.2.4 Încercarea de rezistență la compresiune

Cele mai promițătoare probe, și anume:

- materiale pe bază de PLA obținute la temperatura de 205°C, un timp de expunere de 60' și o forță maximă de presare de $0,5 \cdot 10^{-4}$ MPa,
- materialele pe bază de TPU obținute la temperatura de 215°C, 60' timp de expunere și o forță de presare $2,5 \cdot 10^{-4}$ MPa

au fost testate mecanic din punct de vedere al rezistenței la compresiune, împreună cu o probă din țesut osos cortical, pentru a susține investigațiile preliminare efectuate în cazul acestui studiu.

În curbele filamentelor PLA și TPU cu inserție de HAp, se observă un comportament maleabil, cu o deformare plastică semnificativă. Pentru încărcarea compresivă pe osul cortical, întărirea rapidă are loc după cedare, urmată de înmuiere. Osul este considerat un solid fragil ideal care cedează la o limită de elasticitate ce coincide cu rezistența la compresiune.

Comparând valorile rezistenței la compresiune ale materialelor compozite tip core-shell selectate cu cele ale osului cortical, se observă valori de aproximativ 4 ori mai mici decât cele ale osului cortical în direcția longitudinală. Din punct de vedere comparativ, rezultatele obținute prezintă valori mai mici decât ale materialelor metalice consacrate utilizate în medicină dar mai mari decât ale celor ceramice.

5.2.5 Analiza aderenței particulelor prin testare tip pull-out.

Testul pull-out a fost efectuat de asemenea pe cele mai promițătoare probe (materiale pe bază de PLA obținute la 205°C, 60' timp de menținere și o forță maximă de presare de $0,5 \cdot 10^{-4}$ MPa și materiale pe bază de TPU obținute la 215°C, 60' timp de menținere și o forță maximă de presare de $2,5 \cdot 10^{-4}$ MPa).

Se observă o distribuție uniformă a deformațiilor cu o zonă de încărcare concentrată la interfața adeziv-filament în cazul probelor de PLA. În schimb, deformarea probelor de TPU a avut loc în partea incipientă a filamentului și a fost ulterior transferată la interfața adeziv-filament. Acest comportament neuniform poate fi explicat pe baza diferitelor module de elasticitate ale PLA-ului, TPU-ului și adezivului ales, deoarece PLA prezintă un modul de elasticitate de aproximativ trei ori mai mare decât cel al adezivului, în timp ce valorile TPU sunt apropiate de cele ale adezivului.

Se observă un comportament similar și pentru materialele compozite tip core-shell. În acest caz, prezența particulelor de HAp schimbă starea de solicitări și deformări, deoarece acestea sunt concentrate în principal în regiunea de contact a stratului de particule-adeziv și au fost transferate treptat la interfața de acoperire a particulelor-substrat. În acest caz, se poate întâlni orice reorientare / alunecare a particulelor, împreună cu scăderea rigidității ansamblului și creșterea deplasării. De asemenea, ruperea are loc la îmbinarea stratului de acoperire a particulelor-substrat și are o natură predominant coezivă, deoarece particulele apar atât pe adeziv cât și pe suprafața substratului.

În urma analizei valorilor forțelor de deplasare maxime, se observă o scădere cu 61,82% a forței de deplasare în cazul probelor tip core-shell PLA-HAp și 67,14% în cazul probele tip core-shell TPU-HAp, comparativ cu forțele de deplasare ale filamentelor polimerice inițiale (fără particule de HAp încorporate).

5.2.6 Concluzii preliminare

Toate modificările induse asupra parametrilor de lucru au avut o influență directă asupra tuturor proprietăților materialelor compozite finale tip core-shell, în special asupra acoperirii acestora.

În acest sens, pentru materialele pe bază de PLA, rezultatele obținute recomandă folosirea unei temperaturi de 205°C, un timp de expunere de 60' și o forță maximă de presare de $0,5 \cdot 10^{-4}$ MPa, în comparație cu materialele pe bază de TPU pentru care o temperatură crescută de 215°C, 60' timp de expunere și forțe de presare mai mari (până la $2,5 \cdot 10^{-4}$ MPa) s-au determinat a fi adecvate scopului final, datorită faptului că filamentul își păstrează cilindricitatea și acoperirea este uniformă și bine definită. În plus, pentru aceste probe a fost efectuat un studiu comparativ cu osul cortical, de rezistență la compresiune, pentru a demonstra aplicabilitatea lor în domeniul stomatologiei și ortopediei. Acești parametri tehnologici reprezintă o posibilitate excelentă spre o rută optimă de obținere a materialelor compozite tip core-shell destinate fabricării aditive de tip FDM.

Capitolul 6. Obținerea unor materiale compozite în formă de filament cu matrice din acid polilactic ranforsată cu particule de hidroxiapatită

Scopul celei de-a treia părți a studiului a constat în obținerea unor structuri filamentare din materiale compozite polimer-ceramică, dintr-un polimer consacrat în ingineria țesuturilor dure și anume acidul polilactic (PLA) și o componentă ceramică, și anume hidroxiapatita, obținută din oase de origine bovină, prin aceeași rută de sinteză descrisă în capitolele anterioare.

6.1 Obținerea materialelor compozite în formă de filament

Pentru a obține materialele compozite în formă de filament PLA-HAp, au fost utilizate granule de PLA de dimensiuni de aproximativ 2 mm, și pulbere de HAp de origine bovină. În ceea ce privește hidroxiapatita de origine bovină, aceasta a fost obținută prin aceeași rută de sinteză ca și în cazul celorlalte materiale compozite obținute în capitolele anterioare.

Din punct de vedere dimensional, HAp utilizată în acest studiu a făcut parte din trei sorturi diferite, și anume: $<40 \mu\text{m}$, $<100 \mu\text{m}$ și $>125 \mu\text{m}$. Din punct de vedere compozițional, au fost obținute șase tipuri de filamente diferite, și anume: 100% PLA - probă martor, 90% PLA + 10% HAp, 80% PLA + 20% HAp, 70% PLA + 30% HAp, 60% PLA + 40% HAp, 50% PLA + 50% HAp.

Granulele polimerice și componenta pulverulentă ceramică, au fost omogenizate într-un amestecător rotativ pe trei axe. Următorul tip de omogenizare a fost cel prin amestecare mecanică în topitură, pe plita unui agitator magnetic la o temperatură de 250° C. În urma acestei etape, au fost obținute folii și fâșii plate ce au fost debitate mecanic, obținându-se astfel pelete de aproximativ 2 mm.

Peletele au fost introduse într-un extrudor, și astfel s-au obținut filamentele compozite de PLA și HAp, cu diametrul de aproximativ 1.75 mm, destinate manufacturării aditive de tip FDM.

6.2 Rezultate și discuții privind caracterizarea materialelor compozite în formă de filament cu matrice din acid polilactic ranforsată cu particule de hidroxiapatită

6.2.1 Caracterizare din punct de vedere morfologic și compozițional

Cea de-a treia parte a acestui studiu se bazează pe stabilirea parametrilor necesari pentru obținerea unor filamente din materiale compozite destinate domeniului ingineriei biomedicale. Acestea, la rândul lor, au ca scop realizarea de dispozitive biomedicale obținute prin tehnici moderne, și anume fabricația aditivă de tip FDM.

A. Caracterizare compozițională și morfologică la nivel macroscopic

Din punct de vedere macroscopic, pentru materialele compozite obținute cu pulbere de HAp din sortul $<40 \mu\text{m}$, se poate observa omogenitatea filamentelor. Proba martor, 100% material polimeric, prezintă o formă cilindrică, ideală și absolut necesară scopului final, cu structură omogenă atât pe suprafață cât și în interior. Adaosul de pulbere de HAp modifică structura internă a filamentelor, observându-se particulele distribuite uniform și omogen în întreaga masă de polimer. Creșterea concentrației de pulbere de HAp este vizibilă atât în structura internă a filamentelor, cât și în aspectul exterior al acestora.

Din punct de vedere compozițional, spectrul EDS al materialului martor, și anume PLA 100%, a relevat vârfuri specifice principalelor elemente (C și O). În ceea ce privește materialele compozite tip filament, spectrele EDS prezintă vârfuri specifice atât ale elementelor principale ale HAp, în special Ca și P, cât și vârfuri specifice principalelor elemente ale PLA. Se observă modificarea radicală a spectrelor, în primul rând odată cu adaosul de HAp, dar și cu creșterea concentrației acesteia, și scăderea conținutului de PLA.

În ceea ce privește materialele obținute cu HAp din sortul $<100 \mu\text{m}$, particulele sunt mult mai vizibile în structura materialelor compozite tip filament. Astfel, din punct de vedere al omogenității, se poate observa o dispersie uniformă a particulelor atât în structura internă a materialelor, cât și la exteriorul acestora. Cu toate că filamentele își păstrează forma cilindrică, acestea suferă unele modificări ale suprafeței odată cu creșterea dimensiunii particulelor.

Din punct de vedere compozițional, spectrele EDS prezintă aceeași creștere direct proporțională a intensității vârfurilor elementelor specifice HAp, odată cu creșterea concentrației acesteia. În același timp, creșterea intensității vârfurilor elementelor specifice HAp este direct proporțională cu scăderea intensității celor ale elementelor specifice PLA, fapt ce denotă omogenitatea materialului bicompozit obținut.

În cazul materialelor obținute cu pulbere de HAp cu dimensiuni $>125 \mu\text{m}$, aspectul macroscopic al materialelor tip filament este complet modificat. În ceea ce privește structura internă a filamentelor, se observă particule de dimensiuni mari distribuite aproximativ uniform în întreaga structură a materialelor compozite

În ceea ce privește forma filamentelor, acestea își păstrează cilindricitatea, însă aspectul exterior al acestora este unul rugos. Rugozitatea exterioară este prezentă chiar și la adaosuri mici de pulbere (20%), fapt datorat și dimensiunilor mari ale particulelor de HAp.

Din punct de vedere compozițional, spectrele EDS prezintă, ca și în cazul celorlalte materiale, aceeași proporționalitate dintre scăderea intensității vârfurilor elementelor specifice

polimerului (C și O) și creșterea intensității celor ale elementelor specifice hidroxiapatitei (Ca, P și Mg).

B. Caracterizare compozițională și morfologică la nivel microscopic

Caracterizarea morfologică la nivel microscopic este esențială pentru definirea și validarea acestor tipuri de materiale în vederea utilizării în domeniul ingineriei medicale prin intermediul tehnicii de fabricație aditivă. În acest sens, materialele compozite obținute au fost caracterizate la nivel microscopic, din punct de vedere morfologic, astfel:

- i.* probele turnate sau foliile obținute în urma omogenizării polimerului și hidroxiapatitei pentru a determina gradul de uniformizare, și pentru a valida tehnica utilizată;
- ii.* secțiunea filamentului obținut din folii prin extrudare;
- iii.* suprafața filamentului obținut.

În cazul probelor turnate, cu adaos de pulbere din sortul <40 μm, comparativ cu proba martor, 100% PLA, probele cu adaos de HAp prezintă o structură omogenă indiferent de cantitatea de pulbere adăugată. Această omogenitate este menținută și în cazul filamentelor. În secțiunea filamentului, se observă o modificare a structurii odată cu creșterea cantității de pulbere de HAp adăugată, acest fapt neafectând însă omogenitatea filamentului. Caracterizarea suprafeței filamentului indică și susține aceleași ipoteze ale unei structuri compozite uniforme.

Probele cu adaos de pulbere din sortul <100 μm prezintă un nivel ridicat al omogenității, încă din stadiul probelor turnate, aceasta menținându-se și în cazul filamentelor, atât în secțiune cât și în suprafață. Comparativ, dimensiunea particulelor influențează în mod direct morfologia suprafeței, astfel că în cazul materialelor cu adaos ridicat de pulbere de HAp, structura este complet modificată.

Probele cu adaos de pulbere din sortul >125 μm, prezintă un nivel ridicat al omogenității, încă din stadiul probelor turnate, aceasta menținându-se și în cazul filamentelor, atât în secțiune cât și în suprafață. Din punct de vedere dimensional, pulbera de HAp, prezintă dimensiuni diferite, acest fapt fiind evident mai ales în cazul filamentelor analizate în secțiune.

Din punct de vedere compozițional, analiza EDS comparativă efectuată pe toate filamentele extrudate în secțiune transversală a evidențiat elementele caracteristice compoziției fosfatului de calciu și a materialelor polimerice, și anume C, O, Ca și P. Cantitățile mici de Mg detectat în cazul probelor cu adaos de 10-50% particule ceramice se datorează precursorului de HAp și anume oasele bovin.

În plus, independent de intervalele dimensionale ale particulelor, cantitatea de carbon a scăzut drastic odată cu creșterea raportului HAp și, implicit, a fost asigurat un grad mai mare de acoperire. În ceea ce privește elementele caracteristice HAp, calciul, fosforul și magneziul, concentrațiile variabile ale acestora au crescut într-o linie de tendință ascendentă odată cu adăugarea din ce în ce mai ridicată de HA. Aceste diferențe minore pot fi atribuite variației rugozității suprafeței, dimensiunilor particulelor sau inexactității generale ale metodei.

6.2.2. Analiza prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)

Conform curbelor DSC, toate analizele probele prezintă două vârfuri endotermice la cca. 140–142 °C și 151 °C datorită topirii progresive a PLA, independent de raportul HAp. Cu

toate acestea, încorporarea particulelor de HA a condus la apariția unui vârf exotermic specific pentru fiecare probă în intervalul ~86–93 °C (la concentrații minime și maxime de HAp, a apărut tip-split) corespunzător cristalinitate—cristalizare la rece a polimerului (temperatura de cristalizare, T_c). Conform evoluției parametrului T_c , se poate aprecia că tendința sa descendentă odată cu creșterea raportului de HAp este legată de cristalizarea eterogenă a probelor cu mai multe particule de HAp, care pot acționa ca agenți de nucleare pentru cristalele de PLA.

Mai mult, toate probele din materiale compozite au prezentat un alt vârf endotermic indicativ al temperaturii de tranziție vitroasă (T_g). S-a constatat faptul că T_g crește odată cu creșterea treptată a raportului HAp de la ~53 °C la ~57 °C. Acest fenomen a fost anterior raportat și explicat pe baza influenței cantității de particule de HAp pe unitate de volum în compozit, și s-a ajuns la concluzia că T_g este dependentă de aiferentul ridicat al suprafeței particulelor de HAp.

Prin urmare, se poate concluziona că datorită tendinței particulelor de HAp de a forma centre de nucleare în matricea polimerică, fazele rigide sunt modelate și guvernează în continuare caracteristicile finale ale produselor, așa cum a fost demonstrat și prin analiza morfo-compozițională.

6.2.3 Analiza suprafeței prin măsurarea unghiului de contact și a energiei de suprafață

Hidrofilitatea suprafeței a fost evaluată prin măsurători ale unghiului de contact (CA), cu trei agenți de umectare, și anume lichide de testare diferite (apă – H_2O , diiodometan (DIM), și etilenglicol (EG)) pe pelete de amestecuri turnate.

În plus, SFE a fost calculat prin metoda dezvoltată de Owens, Wendt, Rabel și Kaelble (OWRK) folosind valorile unghiului de contact măsurate anterior. Energia liberă de suprafață indică suma interacțiunilor dispersive și polare înregistrate la interfața solid-lichid. Pentru obținerea unor rezultate experimentale bune, apa și EG au fost folosite ca lichide polare, în timp ce DIM a fost folosit ca lichid nepolar/dispersiv.

Valorile CA au indus o tentă descendentă constantă odată cu creșterea concentrației de HAp încorporată de la 10% la 50%, independent de lichidul de testare sau de dimensiunile particulelor de HAp.

CA pentru apă, DIM și EG a variat de la ~66 la 20, ~67 la 22 și de la ~70 la 21 pentru particulele de HAp din intervalele <40 m, <100 m și >125 m, respectiv. Astfel, toate rezultatele au relevat un caracter hidrofil semnificativ îmbunătățit ($CA < 90^\circ$) al materialelor compozite în comparație cu PLA pur. Chiar dacă încorporarea unor particule mai mici (<40 μm) a condus la obținerea unor suprafețe mai netede, microporozitatea suprafeței acestora și distribuția regulată, împreună cu valorile CA scăzute în comparație cu acestea ale PLA, atestă rolul benefic al acestora pentru îmbunătățirea caracteristicilor de umectabilitate ale probelor.

Evoluția dedusă a valorilor SFE, a relevat o tendință de creștere odată cu creșterea raportului de HAp, pentru toate intervalele dimensionale ale HAp. O valoare ridicată a SFE este un indicator corespunzător al unei umectări pronunțate, ambele necesare în domeniul manufacturării aditive, pentru tipărirea liniilor continue fără apariția fenomenului de fuziune. Mai mult, cu cât valoarea SFE este mai mare, cu atât sunt mai mari șansele pentru o adsorbție îmbunătățită a proteinelor și un răspuns celular global pentru produsele implantabile care ar putea fi obținute.

6.2.4 Analiza prin micro-CT a distribuției pulberilor ceramice în materialele compozite

Reconstrucțiile 3D ale tuturor filamentelor obținute din materiale compozite au oferit o imagine de ansamblu completă asupra distribuției interne a particulelor ceramice în matricea PLA. Pe baza tehnicii CT, existând capacitatea de a corela materialul tastat cu numărul atomic corespunzător, a fost posibilă prezentarea diferențiată a zonelor de interes datorită celor două materialele implicate.

Fenomenul de dispersie particulă cu particulă de HAp evidențiat în secțiunea transversală, vedere la suprafață a filamentelor a fost păstrat și extins la întregul volum, independent de dimensiunea particulelor ceramice. Încorporarea concentrațiilor din ce în ce mai mari de HAp a redus radical spațiul liber dintre particule (matricea polimerică), păstrând în același timp gradul de omogenitate suprafață-volum. Astfel, odată ce dimensiunea particulelor de HAp a crescut concomitent cu concentrația adăugată, distribuția a fost mai uniformă, și a condus la formarea complexă, organizată și treptată a structurilor interne care au evoluat în secțiunea și pe lungimea filamentelor extrudate.

În plus, nu au fost identificate aglomerări sub formă de agregate pe suprafața probelor, sau în în volumul acestora. Cu atât mai mult, conturul individual al fiecărei particule poate fi observat în zona tăiată triunghiular 3D a tuturor probelor și subliniată în mod distinct colorată cu galben, în special pentru probele cu adaos de particule de HAp cu dimensiuni $>125 \mu\text{m}$. De asemenea, efectul de rotunjire al marginilor particulelor în timpul extrudării este confirmat în tot volumul filamentelor, care este de asemenea în bună concordanță cu evaluarea morfologică.

Prin urmare, reconstrucțiile 3D au stabilit că filamentele compozite cu diametru constant pot fi obținute atât prin modularea dimensiunii, cât și a proporției particulelor de HAp. Printr-o distribuție omogenă suprafață-volum a particulelor ceramice din matricea polimerică, în interiorul filamentelor poate fi indusă gradual o rețea ceramică. Ca atare, duza de imprimare, dimensiunea și viteza de imprimare ar putea fi modulate în funcție de tipul de filament - în acest caz determinat de dimensiunea și proporția particulelor de HAp încorporate.

6.2.5 Evaluarea caracteristicilor mecanice

Gradul de deformare după înălțime și diametru (adică, gradul de butoiere) a fost calculat prin măsurarea probelor înainte și după ce a fost aplicată forța de compresiune. Variația rezistenței la compresiune și a modului de elasticitate, împreună cu scurtarea și gradul de butoiere, a prezentat tendințe ascendente liniar, similare cu creșterea concentrației de HAp încorporată, independent de dimensiunea particulelor ceramice.

În comparație cu probele obținute numai din PLA, atât rezistența la compresiune, cât și modulul de elasticitate prezintă valori ridicate cu $\sim 1,18$ ($<40 \mu\text{m}$), $\sim 1,19$ ($<100 \mu\text{m}$), $\sim 1,10$ ($>125 \mu\text{m}$), $\sim 1,81$ ($<40 \mu\text{m}$), $\sim 1,96$ ($<100 \mu\text{m}$) și $\sim 1,43$ ($>125 \mu\text{m}$), dovedind că particulele de HAp derivate din surse naturale au acționat într-adevăr ca un material de renforsare pentru matricea de PLA. Un alt argument în această direcție se referă la capacitatea acestora de a susține grade de deformare corespunzător mai mari decât PLA înainte de fisurare, înregistrate cu un factor de amplificare de $\sim 1,34$ – $1,38$ ($<40 \mu\text{m}$), $\sim 1,35$ – $1,46$ ($<100 \mu\text{m}$), $\sim 1,31$ – $1,40$ ($>125 \mu\text{m}$) pentru scurtare, și $\sim 1,60$ – $1,88$ ($<40 \mu\text{m}$), $\sim 1,47$ – $2,06$ ($<100 \mu\text{m}$) și $\sim 1,46$ – 2 ($>125 \mu\text{m}$) pentru butoiere.

Modulul de elasticitate este reprezentativ și pentru gradul de rigiditate și prin urmare, adăugarea treptată a particulelor de HAp a condus la obținerea unor materiale compozite mai rigide. Un anumit grad de interacțiune între particulele ceramice și matricea polimerică este de așteptat, deoarece se conectează în două moduri diferite: fizic din cauza porozității ridicate a particulelor, care crește tensiunea superficială, și chimic pe baza interacțiunilor dintre grupele polare ale PLA și HAp. Ambele elemente, împreună cu gradul de cristalinitate (scăzut), cresc aderența dintre polimer și materiale ceramice, crescând astfel rigiditatea produselor compozite, chiar și la concentrații scăzute de HAp, indiferent de dimensiunea particulelor. Mai mult decât atât, valorile mai scăzute înregistrate pentru probele cu particule de HAp $>125 \mu\text{m}$ pot fi atribuite scăderii gradului de dispersie și a tendinței particulelor spre formarea de agregate.

Având în vedere rezultatele obținute, se poate presupune faptul că adăugarea de HAp are o mare influență asupra creșterii modulului de elasticitate al materialelor compozite, în timp ce dimensiunile mai mari ale particulelor tind să o scadă.

În cazul încorporării HAp derivată din resurse naturale, la diferite concentrații și cu dimensiuni variabile ale particulelor în matricea PLA, toate cele trei premise au fost îndeplinite și confirmate pe tot parcursul programului de investigație preliminară. Toate rezultatele obținute pentru caracteristicile mecanice sunt adecvate pentru aplicațiile biomedicale, având în vedere că depășesc cu mult limita inferioară de rezistență pentru osul cortical, dar nu și pe cea superioară.

6.2.6 Concluzii preliminare

A fost confirmată posibilitatea de obținere prin extrudare a filamentelor din materiale compozite cu matrice polimerică de PLA și ranforsare de HAp derivată din resurse naturale. Au fost cercetate pentru prima dată influența modulării concomitente a mărimii, proporției și formei particulelor de HAp asupra morfologiei, umectabilității suprafeței, energiei libere, distribuției interne și comportamentului mecanic al amestecurilor turnate în forme cilindrice și extrudate în filamente. Toate modificările efectuate privind componenta ceramică au influențat direct caracteristicile finale ale filamentelor extrudate din materiale compozite. În acest sens, a fost observată o dispersie omogenă în cazul tuturor probelor experimentale, independent de dimensiunea sau de proporția particulelor de HAp, prin investigații morfologice — pentru suprafață și în secțiunea transversală a filamentelor și prin micro-CT — pentru distribuția internă și dispunerea particulelor în matricea polimerică. În orice caz, pentru a păstra un diametru invariabil și o suprafață netedă și uniformă a filamentelor, proporția de HAp trebuie limitată la maximum 40% în cazul dimensiunilor de particulă $<40 \mu\text{m}$, 30% pentru particule $<100 \mu\text{m}$ și 20% pentru particule $>125 \mu\text{m}$.

În ceea ce privește aderența la interfața HAp/PLA, forma poliedrică particulară și textura microporoasă a suprafeței particulelor ceramice naturale au jucat un rol semnificativ pentru stabilirea unei legături puternice între cele două componente. Mai mult, absența oricărei porozități pe conturul interfaței particulelor ceramice cu polimerul a fost, de asemenea, observată în mod clar. În combinație cu caracteristicile mecanice îmbunătățite, se poate observa că HAp a acționat în mod avantajos ca un element de ranforsare mecanică pentru materialul polimeric, conducând la valori ale rezistenței la compresiune și ale modulului de elasticitate/gradului de rigiditate în limitele compatibile cu cele ale țesutului osos.

Capitolul 7. Concluzii și contribuții personale

7.1 Concluzii în urma rezultatelor experimentale

În cadrul acestei teze de doctorat s-a urmărit dezvoltarea unor materiale compozite cu matrice de origine polimerică și ranforsare cu particule de hidroxiapatită de origine naturală, pentru aplicații ce vizează domeniul biomedical, mai exact regenerarea osoasă.

În urma analizei amănunțite a literaturii de specialitate efectuată pentru studiul teoretic al tezei de doctorat, s-a demonstrat faptul că aplicabilitatea practică în domeniul biomedical a produselor de reconstrucție osoasă dezvoltate în urma cercetărilor din domeniul științei și ingineriei materialelor este dificilă. Până în acest moment nu sunt raportate în mod clar studii care să certifice un materiale complet adecvat regenerării osoase, care să prezinte bune proprietăți de suprafață și de biodegradare și să îndeplinească toate proprietățile mecanice necesare, comparabile cu cele ale osului uman. Fiind un domeniul relativ nou, studiile clinice sunt foarte reduse, rezultând astfel un grad de risc ridicat în ceea ce privește reușita produselor din punct de vedere al biocompatibilității dar și al comportamentului mecanic.

În ceea ce privește tehnicile de fabricare a produselor din materiale compozite cu matrice polimerică și ranforsare ceramică, de interes în ultimul timp sunt cele de fabricație aditivă. Interesul crescut față de aceste tehnici se datorează faptului că se pot obține produse sută la sută personalizate, cu geometrii și dimensiuni diverse, într-un timp relativ scurt față de metodele clasice. Cu toate acestea, fiind tehnologii moderne, costurile implicate sunt ridicate, și astfel rentabilitatea acestora nefiind încă pe deplin justificată.

Astfel, cercetarea experimentală prezentată în această teză de doctorat a vizat obținerea unor materiale compozite cu matrice polimerică ranforsată cu pulberi ceramice pentru aplicații în domeniul biomedical, în vederea regenerării osoase ghidate, prin variația atât a parametrilor rutelor de obținere, cât și a cantității și dimensiunii particulelor de hidroxiapatită adăugată. Elementul comun al acestor materiale a fost partea ceramică (hidroxiapatita) obținută printr-o rută de sinteză bine stabilită și raportată în literatura de specialitate. În ceea ce privește componenta polimerică, aceasta a fost diferită, în vederea obținerii unor materiale compozit îmbunătățite. Astfel:

- i. prima parte a vizat obținerea de materiale compozite cu matrice din acetat de celuloză și ranforsare de hidroxiapatită în formă de film;
- ii. a doua parte a urmărit obținerea de materiale compozite cu matrice din PLA și TPU și ranforsare de hidroxiapatită în formă de filament core-shell;
- iii. a treia parte a implicat obținerea de materiale compozite cu matrice din PLA și ranforsare de hidroxiapatită în formă de filament.

Cercetarea a continuat cu caracterizarea complexă din mai multe puncte de vedere, a tuturor acestor tipuri de materiale compozite.

Principalele concluzii rezultate din cercetările experimentale efectuate în cadrul tezei de doctorat sunt prezentate în continuare.

- i. În ceea ce privește materialele compozite în formă de film:
 - prin modularea timpului de dispersie cu ultrasunete dar și a dimensiunilor particulelor și a concentrației de pulbere de hidroxiapatită adăugată, se influențează direct caracteristicile de suprafață și volumetrice ale produselor finale;

- investigațiile premergătoare biocompatibilității, și anume hidrofilicitatea, permeabilitatea apei și retenția de proteină au scos în evidență viabilitatea acestor tipuri de produse în aplicațiile vizate;
 - în urma investigațiilor *in vitro* cu celule pre-osteoblaste MC3T3-E1, s-a demonstrat faptul că toate tipurile de materiale compozite obținute în această parte a studiului au avut un răspuns în cadrul studiilor pe osteoblaste, fapt ce confirmă potențialul aplicabilității în domeniul biomedical;
 - prin varierea timpului de dispersie al particulelor de hidroxiapatită în matricea de acetat de celuloză, s-a constatat faptul că un timp mai îndelungat asigură o dispersie uniformă, adecvată în tot volumul polimeric;
 - în urma varierii dimensiunilor particulelor de hidroxiapatită, s-a constatat că particulele cu dimensiuni mai reduse sunt mai potrivite acestor tipuri de aplicații;
 - modificarea concentrației de hidroxiapatită adăugată a condus spre constatarea că o concentrație mai redusă asigură o dispersie uniformă, în timp ce o concentrație mai ridicată conduce la formarea de agregate, independent de timpul de dispersie.
- ii. În ceea ce privește materialele compozite în formă de filament core-shell:
- prin varierea parametrilor tehnologici (timpul și temperatura de tratament în cuptor, forța de presare) dar și prin varierea materialului matricei polimerice (PLA și TPU), au fost influențate direct toate proprietățile produselor finale, în special în ceea ce privește acoperirea ceramică (shell);
 - în urma investigațiilor efectuate pe materialele cu matrice de PLA, s-a constatat că rezultatele optime sunt obținute la următorii parametri de lucru - temperatură de 205°C, timp de expunere de 60 de minute și forță maximă de presare de $0,5 \cdot 10^{-4}$ MPa;
 - investigațiile efectuate pe materialele cu matrice de TPU au demonstrat faptul că rezultatele optime sunt obținute la următorii parametri de lucru: temperatură crescută de 215°C, 60 de minute timp de expunere și forțe de presare mai mari (până la $2,5 \cdot 10^{-4}$ MPa);
 - prin studiul comparativ de rezistență la compresiune cu osul cortical, s-a demonstrat posibila aplicabilitate a acestor tipuri de materiale compozite în domeniul stomatologiei și ortopediei;
 - modularea acestor parametri tehnologici reprezintă o posibilitate a unei rute de sinteză optime a materialelor în formă de filament core-shell destinate domeniului biomedical, dar și fabricării aditive.
- iii. În ceea ce privește materialele compozite în formă de filament:
- în urma modulării simultane a caracteristicilor componente ceramică (dimensiunea particulelor și concentrația de pulbere adăugată) s-a observat o influență directă asupra caracteristicilor finale ale materialului compozit în ceea ce privește morfologia, umectabilitatea suprafeței, arhitectura internă și aspectele mecanice;
 - s-a constatat o dispersie omogenă a ranforsării ceramice în matricea polimerică pentru toate materialele obținute în cadrul acestei părți a studiului experimental;
 - a fost observată absența porozităților de contur la interfața particulelor ceramice cu polimerul;
 - în urma caracterizărilor din punct de vedere mecanic, s-a demonstrat faptul că pulberea de hidroxiapatită acționează ca un material de ranforsare, prin îmbunătățirea semnificativă a proprietăților mecanice;

- caracterul hidrofil de care beneficiază toate materialele compozite dezvoltate în această parte a studiului demonstrează potențialul acestora de a răspunde favorabil aderenței celulare.

Metodele de obținere prezentate în cadrul acestui studiu privind materialele compozite cu matrice polimerică și adaos de material de ranforsare ceramic (hidroxiapatita) au condus la realizarea unor produse cu aplicabilitate în domeniul biomedical.

7.2 Contribuții originale

Această teză de doctorat include **contribuții originale** în domeniul ingineriei materialelor. Scopul principal a fost acela de a obține materiale noi, cu proprietăți superioare, care vizează aplicabilitatea în domeniul atât stomatologic, cât și al ortopediei. În ceea ce privește contribuțiile originale rezultate în urma cercetărilor experimentale, acestea sunt reprezentate de:

- obținerea pentru prima dată a unor materiale compozite în formă de film care pot stimula regenerarea osoasă prin matricea de acetat de celuloză (polimer bioresorbabil) și adaosul de hidroxiapatită (sursă bogată de Ca și P - elemente ce stimulează osteogeneza);
- dezvoltarea unei rute tehnologice originale de obținere a filamentelor compozite în formă core-shell, prin inserarea superficială a particulelor de hidroxiapatită în suprafața filamentelor polimerice bioresorbabile de acid polilactic și poliuretan termoplastice;
- dezvoltarea unei rute tehnologice de obținere în două etape, care implică omogenizarea particulelor (utilizate ca material de ranforsare) într-o matrice polimerică de acid polilactic. Scopul principal al acestei părți a constat în obținerea unor materiale compozite biocompatibile care pot fi folosite pentru extrudarea unor filamente pentru fabricația aditivă a scaffoldurilor prin metoda FDM.

Cercetările prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au aplicabilitate practică în vederea fabricării produselor din materiale compozite destinate regenerării țesutului osos. Strategiile prezentate pot fi implementate în vederea atingerii mai multor obiective care vizează fabricarea produselor personalizate în serie, în special prin tehnici de fabricație aditivă de tip FDM.

În ceea ce privește importanța contribuțiilor originale din această teză de doctorat, aceasta este susținută în 8 lucrări prezentate în cadrul unor conferințe naționale și internaționale și recunoscută prin publicarea a 3 articole științifice din domeniul ingineriei materialelor, în reviste de specialitate cotate Clarivate Analytics cu factor de impact cumulat egal cu 15, conform WoS (Web Of Science).

Succesul acestor tipuri de materiale compozite destinate regenerării osoase depinde și de continuarea cercetărilor experimentale, care poate cuprinde: testarea suplimentară a performanțelor biologice și mecanice a tuturor celor trei tipuri de materiale compozite, testarea preclinică pe modele animale, validarea materialelor prin studii de reproductibilitate în vederea obținerii unor materiale de referință certificate pentru a fi utilizate ca etalon în controlul calității produselor destinate domeniului biomedical.