

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN:AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITES

PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA COMPOZITELOR COLAGEN:FOSFAT DE CALCIU AMORF

Maria Diana VRANCEANU^{1*}, Rami SABAN¹, Madalina Georgiana ALBU², Iulian ANTONIAC¹

¹Politehnica University of Bucharest, 313 Independentei Street, 060042, Bucharest, Romania, email: vranceanudiana@gmail.com

²INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute, 93 Ion Minulescu Street, 031215, Bucharest, Romania, email: madalinaalbu@gmail.com

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN:AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITES

ABSTRACT. Collagen:amorphous calcium phosphate compositions were prepared by lyophilization and spongy composites for regeneration of bone defects were obtained. The spongy composites were characterized by Fourier transform infra-red (FT-IR) spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), water absorption and enzymatic degradation by collagenase. The results showed spongy composites with interconnected pores with embedded particles of mineral phase. Their biodegradation is less for the composite with 75% amorphous calcium phosphate (ACP3), as results of FT-IR and collagenase degradation showed. Due to their properties, the obtained composites could be potential biomaterials for bone tissue engineering.

KEY WORDS: composite, collagen, amorphous calcium phosphates, enzymatic stability.

PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA COMPOZITELOR COLAGEN:FOSFAT DE CALCIU AMORF

REZUMAT. Compozitele colagen:fosfat de calciu amorf au fost preparate prin liofilizare, obținându-se astfel compozite poroase pentru tratarea defectelor osoase. Compozitele poroase au fost caracterizate prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), microscopie electronică (SEM), absorbție de apă și degradare în colagenață. Rezultatele au evidențiat compozite poroase cu o rețea de pori interconectați și particule ceramice încorporate. Biodegradarea compozitelor cu 75% fosfat de calciu amorf (ACP3) se realizează mai lent, fapt susținut de rezultatele obținute prin FT-IR și degradarea cu colagenață. Datorită proprietăților acestora, compozitele obținute ar putea fi biomateriale pentru ingineria țesutului osos.

CUVINTE CHEIE: compozite, colagen, fosfat de calciu amorf, stabilitate enzimatice.

LA PRÉPARATION ET LA CARACTÉRISATION DES COMPOSITES COLLAGÈNE: PHOSPHATE DE CALCIUM AMORPHE

RÉSUMÉ. Les composites collagène: phosphate de calcium amorphe ont été obtenus par lyophilisation, en obtenant ainsi des composites poreux pour le traitement des défauts osseux. Les composites poreuses ont été caractérisés par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la microscopie électronique à balayage (MEB), l'absorption d'eau et la dégradation par la collagénase. Les résultats ont montré des composites poreux avec un réseau de pores interconnectés et de particules céramiques incorporées. La biodégradation des composites avec du phosphate de calcium amorphe (75% ACP3) se fait plus lentement, fait confirmé par les résultats obtenus par FT-IR et par la dégradation par la collagénase. En raison de leurs propriétés, les composites obtenus peuvent être biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

MOTS CLÉS: composites, collagène, phosphate de calcium amorphe, stabilité enzymatique.

INTRODUCTION

Bone tissue engineering provides a new way for regenerating bone tissues to repair damaged or diseased ones completely [1]; the technique should have a highly porous network as a scaffold to promote cells proliferation *in vitro* and finally form bone tissues in the body [2, 3].

The scaffolds are made of biodegradable materials with biocompatibility for eliminating host immune rejection response, biodegradability for ensuring complete tissue regeneration in the repair

INTRODUCERE

Pentru refacerea osoasă completă sau parțială a defectelor osoase, ingineria țesutului osos oferă o nouă modalitate de regenerare osoasă [1], folosind o arhitectură tridimensională extrem de poroasă, care să favorizeze proliferarea celulară *in vitro* pentru ca în final să ducă la formarea de țesut osos în corpul uman [2, 3].

Scaffoldurile sunt realizate din materiale biodegradabile, biocompatibile pentru a elimina răspunsul imun din partea gazdei; sunt biodegradabile pentru a asigura regenerarea completă a țesutului osos

* Correspondence to: Maria Diana VRANCEANU, Politehnica University of Bucharest, 313 Independentei Street, 060042, Bucharest, Romania, email: vranceanudiana@gmail.com

area, and osteoconduction for facilitating bone formation.

In the clinical setting, bone grafting procedures are frequently performed to enhance bone repair and regeneration in a variety of clinical conditions. Bone grafting options vary from autologous bone to several bone graft substitutes. Many biomaterials including polymers and inorganic/organic composites have been prepared, aiming to act as scaffolds for bone tissue engineering in recent years [4, 5].

Collagen scaffolds have been reported to promote, attach, differentiate and grow osteoblast cells and to enhance bone formation. The disadvantage of using collagen as a biomaterial for tissue repair is its high degradation rate, which rapidly leads to loss of mechanical properties [6]. Development of biocomposite materials for hard tissue repair or replacement has been an active research area in the recent years [7].

The incorporation of different calcium phosphate ceramics into the polymeric matrix could improve not only the mechanical properties of the material, but also its bioactivity and biological behaviour [8]. The main driving force behind the use of calcium orthophosphates as bone substitute materials is their chemical similarity to the mineral component of mammalian bones and teeth [9].

Amorphous calcium phosphates (ACPs) represent a unique class of biomedically relevant calcium orthophosphate salts, having variable chemical properties, but essentially identical glass-like physical properties. Amorphous calcium phosphate (ACP) is an essential mineral phase formed in mineralized tissues and the first commercial product as artificial hydroxyapatite.

It has been demonstrated that ACP has better osteoconductivity and biodegradability than tricalcium phosphate and hydroxyapatite *in vivo* [10]. Moreover, it can increase alkaline phosphatase activities of mesoblasts, enhance cell proliferation and promote cell adhesion. The unique role of ACP during the formation of mineralized tissues makes it a promising candidate material for tissue repair and regeneration. ACP may also be a potential remineralizing agent in dental applications [11].

ACP has been widely applied in biomedical field due to its excellent bioactivity, high cell adhesion,

în zona afectată și sunt osteoconductive pentru a facilita formarea de țesut osos nou.

Printre cele mai întâlnite metode care favorizează refacerea și regenerarea osoasă într-o varietate de condiții clinice se numără procedurile de grefare osoasă. În ceea ce privește grefarea osoasă, aceasta poate varia de la utilizarea autogrefelor și până la substituție de grefe osoase. În ultimii ani, în ingerinera țesutului osos, o atenție deosebită a fost acordată numeroaselor biomateriale care au fost dezvoltate ca scaffolduri, printre acestea enumerându-se polimerii și compozitele de tip anorganic/organic [4, 5].

A fost raportat faptul că suporturile pe bază de colagen promovează atașarea, diferențierea și creșterea celulelor osteoblaste și favorizează formarea noului os. Dezavantajul utilizării colagenului ca biomaterial pentru refacerea țesutului constă în viteza sa de degradare mare, care duce la o pierdere rapidă a proprietăților mecanice ale acestuia [6]. Dezvoltarea de noi biomateriale compozite pentru refacerea sau substituția țesutului dur este unul din domeniile foarte active din ultimii ani [7].

Încorporarea diferitelor tipuri de fosfați de calciu într-o matrice polimerică poate duce nu doar la îmbunătățirea proprietăților mecanice, dar și a bioactivității și a comportamentului biologic al materialului final [8]. Principala motivație în utilizarea ortofosfaților de calciu ca material de substituție osoasă este asemănarea chimică cu faza minerală prezentă în țesutul osos [9].

Fosfații de calciu amorf (ACP) reprezintă o clasă unică a sărurilor de ortofosfați de calciu, cu proprietăți fizice și chimice similare biosticelelor. Fosfatul de calciu amorf este un mineral esențial, întâlnit în țesutul mineralizat, fiind primul produs comercializat ca hidroxiapatită artificială.

A fost demonstrat faptul că ACP prezintă caracteristici de osteoconductivitate și biodegradabilitate *in vivo*, mai bune decât HA și TCP [10]. Mai mult decât atât, poate duce la creșterea activității fosfatazei alcaline de mesoblaste, sporește proliferarea și promovează adeziunea celulară. Rolul unic al ACP din timpul formării țesutului mineralizat, face din acesta un candidat promițător pentru refacerea și regenerarea țesutului osos. De asemenea, ACP-ul poate fi folosit ca potențial agent de mineralizare în aplicațiile dentare [11].

ACP a fost folosit în mod extensiv în aplicațiile medicale datorită bioactivității remarcabile, ratei de

adjustable biodegradation rate and good osteoconduction [12, 13].

Various compounds from calcium phosphate family have been extensively investigated as hard tissue repair materials due to their excellent biocompatibility [14]. It has been shown that the rate of new bone formation coincides more closely with the resorption rate of poorly crystalline apatites and ACP [15].

Recently, materials with ACP, hydroxyapatite and other calcium phosphate family members have been extensively investigated for alternative bone repair due to the limitations of traditional materials such as potential immunogenicity, insufficient supply and so on [16].

ACP and ACP/biopolymer composites have emerged as a new class of bone tissue engineering scaffold materials. It is believed that ACP will be used even more extensively in the future due to the fast development of tissue engineering techniques and applied material science.

The aim of this study is to investigate the influence of the inorganic component on the morpho-structural characteristics and biodegradation of some biocomposites based on collagen (Coll) with amorphous calcium phosphate (ACP) used in bone regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Type I fibrillar collagen gel (Coll) having a concentration of 2.11% w/w and acid pH (3.2) was extracted from calf hide by a technology previously described [17, 18]. ACP particles were purchased from Plasma Biotal Limited, UK. Collagenase of Clostridium histolyticum was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and glutaraldehyde (GA) from Merck (Germany). Sodium hydroxide and phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4 were of analytical grade.

Preparation of Collagen – ACP Composites

Collagen (Coll) gel (1.2%) was the basic material for composite preparation. ACP particles were added to collagen at ratios of Coll:ACP = 75:25 (ACP1), Coll:ACP =

biodegradare controlabile și a unei osteoconductivități bune [12, 13].

O multitudine de compuși ce fac parte din clasa fosfaților de calciu au fost intens investigați ca materiale de refacere a țesutului osos datorită unei biocompatibilități foarte bune [14]. A fost demonstrat că rata de formare a noului os coincide cu rata de resorbție a apatitei slab cristaline și a ACP-ului [15].

Recent, materialele cu ACP, HAp și alți compuși din clasa fosfaților de calciu au fost cercetate în mod intens ca materiale alternative în refacerea defectelor osoase, deoarece materialele tradiționale prezintă limitări din punctul de vedere al imunogenicității, resurselor care pot fi insuficiente etc. [16].

Compozitele pe bază de ACP și ACP/biopolimer au format o nouă clasă de materiale în ingerinăria țesutului osos. Datorită biocompatibilității și osteoconductivității excelente pe care le prezintă, acest tip de material este adecvat pentru refacerea și substituția osoasă. Ca urmare a dezvoltării rapide a tehnicii de ingerinărie tisulară și științei materialelor aplicate, se crede că pe viitor materialele de tip ACP vor atrage o atenție și mai mare asupra lor.

Scopul acestui studiu este de a cerceta influența fazei anorganice asupra caracteristicilor morfostructurale și de biodegradare a biocompozitelor pe bază de colagen (Coll) cu fosfat de calciu amorf (ACP) utilizabile în regenerarea osoasă.

MATERIALE ȘI METODE

Materiale

Colagenul fibrilar de tip I (Coll) cu o concentrație inițială de 2.11% g/g și pH (3.2) a fost extras din piele crudă de vitel, conform unei tehnologii descrisă anterior [17, 18]. Particulele de ACP au fost achiziționate de la firma Plasma Biotal Limited, UK. Colagenaza din *Clostridium histolyticum* a fost achiziționată de la Sigma-Aldrich (SUA), iar aldehida glutarică (GA) de la Merck (Germania). Hidroxidul de sodiu și soluția tampon fosfat (PBS) cu pH 7.4 au fost de grad analitic.

Prepararea compozitelor colagen – ACP

Materialul de bază utilizat la obținerea compozitelor a fost gelul de colagen (1.2%). Particulele de ACP au fost adăugate în colagen în următoarele

50:50 (ACP2), Coll:ACP = 25:75 (ACP3) and then the pH was adjusted at 7.4. All gels were cross-linked with 0.25% glutaraldehyde (GA) (reported to the weight of dry collagen), then cast in polystyrene dishes and kept at 4°C for 24 hours. After the cross-linking they were freeze-dried (48 hours) in order to obtain porous scaffolds, as follows: cooling to -40°C (4 h), keeping up for 8 h, then freeze-dried at -40°C and 0.1 mbar for 10 hours, then heating to +20°C for 18 h at 0.1 mbar, then heating (6 h) to 30°C and finally freeze-dried at +35°C at 0.01 mbar for 6 hours, using the Christ Model Delta 2–24 LSCfreeze-dryer (Germany).

FT-IR Spectroscopy

The chemical reaction between the functional groups of collagen and the ceramic phase was evaluated by infrared spectroscopy using a JASCO 6200 FTIR Spectrometer. All spectra were recorded in absorption mode at 4 cm⁻¹ interval and 160 scans.

Water Up-take

The water up-take was determined by a conventional gravimetric procedure, in which pre-weighed composite samples of 1 cm diameter were allowed to swell in distilled water for a period of time (up to equilibrium swelling). Thereafter the samples were taken out of the water and gently pressed on a filter paper to remove the excess and weighed again using a sensitive balance. The swelling ratio (SR) was calculated from the following equation:

$$SR = (M_t - M_0)/M_0 \quad (1)$$

where M_t is the mass of the swollen gel at time t, and M_0 is the mass of the dry gel at time 0.

Enzymatic Degradation

Enzymatic degradation of composites was investigated by monitoring the weight loss depending on exposure time to collagenase solution. Composites with 1 cm diameter were accurately weighed, placed in PBS solution and collagenase (1 g/mL) and incubated at 37°C. At regular intervals the swollen composites were removed from degradation solution, blotted dry and weighed. The percent of

concentrații: Coll:ACP = 75:25 (ACP1), Coll:ACP = 50:50 (ACP2), Coll:ACP = 25:75 (ACP3), valoarea pH-ului fiind ajustată la 7.4. Gelurile au fost reticulate cu 0.25% aldehidă glutarică (raportată la substanță uscată), turnate în godeuri de polistiren și păstrate la 4°C timp de 24 ore. Pentru a obține o structură poroasă, după reticulare, probele au fost liofilizate timp de 48 de ore, după cum urmează: înghețare la -40°C (4 h), menținându-se apoi timp de 8 h, liofilizare la -40°C și 0.1 mbar timp de 10 ore, apoi încălzite la +20°C timp de 18 h la 0.1 mbar, încălzite (6 h) la 30°C, iar liofilizarea finală s-a făcut la +35°C la 0.01 mbar timp de 6 h, folosind un liofilizator Christ Model Delta 2–24 LSC(Germania).

Spectroscopie FT-IR

Reacția chimică dintre grupările funcționale ale colagenului și faza ceramică a fost evaluată prin spectroscopie FTIR, cu un spectrometru JASCO 6200 FTIR. Spectrele au fost înregistrate în absorbție la un interval de 4cm⁻¹ și 160 de scanări.

Absorbția de apă

Absorbția de apă a fost evaluată prin tehnică gravimetrică, în care compozitele au fost inițial cântărite, permitându-le apoi să se gonfleze în apă distilată o perioadă de timp (până la echilibru). La intervale regulate de timp, probele au fost îndepărtate din apă distilată, presate ușor pe hârtie de filtru pentru a îndepărta excesul de apă și cântărite din nou. Cantitatea de apă absorbită (SR) a fost calculată conform următoarei ecuații:

în care M_t – masa hidrogelului la timpul t, M_0 masa inițială a hidrogelului.

Degradare enzimatică

A fost investigată prin monitorizarea pierderii de masă în funcție de timpul de expunere la soluția de colagenază. Compozitele având diametrul de 1 cm au fost cântărite și introduse în soluție PBS și colagenază (1 g/mL) și incubate la 37°C. La intervale bine definite de timp, compozitele gonflete au fost îndepărtate din soluția de colagenază, uscate și cântărite. Pierderea de

composite degradation was determined by the following relation:

$$\begin{aligned} \% \text{ weight loss} &= (W_i - W_t)/W_i * 100 \\ \% \text{ pierdere de masă} &= (W_i - W_t)/W_i * 100 \end{aligned} \quad (2)$$

where W_i is the initial weight and W_t is the weight after time t .

Scanning Electron Microscopy

The morphological aspects of the samples surface, the adhesion of ACP particles into the collagen matrix and pore interconnectivity were determined by Scanning Electron Microscopy, with a Philips ESEM XL 30 microscope. The EDX analyses completed the structural analysis, allowing an easy identification of the ceramic phases.

RESULTS AND DISCUSSIONS

FT-IR Spectroscopy

The FT-IR spectra for collagen reference composite (Coll) showed the characteristic peaks as follows: 3302 cm^{-1} (amide A), 3078 cm^{-1} (amide B), 1636 cm^{-1} (amide I), 1547 cm^{-1} (amide II) and 1239 cm^{-1} (amide III). The phosphate bands are located between 900 and 1200 cm^{-1} . The FT-IR measurements showed that there are no alterations of triple helix of collagen, because there are no changes in amide II, III and pyrrolidine ring of collagen.

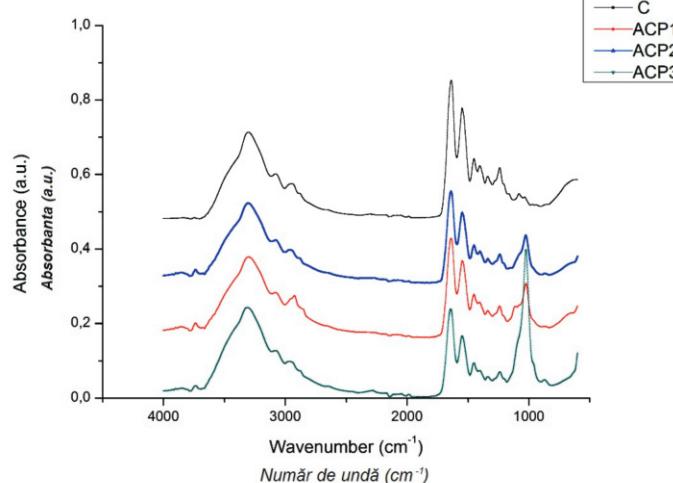


Figure 1. FTIR spectra of the collagen and composite samples collagen:amorphous calcium phosphate

Figura 1. Spectrele FTIR ale probelor de colagen și compozite colagen:fosfat de calciu amorf

masă înregistrată în urma degradării a fost calculată cu următoarea ecuație:

unde W_i este masa inițială, W_t este masa după un timp t .

Microscopie electronică de baleaj

Aspectele morfologice de la suprafața probei, adeziunea particulelor de ACP la matricea de colagen și interconectivitatea porilor au fost evaluate prin microscopie electronică de baleaj, Philips ESEM XL 30. Analiza EDX a completat analiza structurală, permitând o ușoară identificare a fazei ceramice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Spectroscopie FT-IR

Spectrul FTIR obținut pentru proba de colagen (Coll) prezintă următoarele peak-uri: 3302 cm^{-1} (amidă A), 3078 cm^{-1} (amidă B), 1636 cm^{-1} (amidă I), 1547 cm^{-1} (amidă II) și 1239 cm^{-1} (amidă III). Benzile fosfat sunt localizate în intervalul 900 - 1200 cm^{-1} . Măsurările FTIR au evidențiat faptul că nu există alterări ale colagenului deoarece nu există modificări ale amidelor II, III și ale inelului pirolidinic din colagen.

Water Up-take

All samples absorb a large amount of water in the first minute. Water up-take kinetics curves presented in Figure 2 show the same allure for all samples. The higher amount of ceramic, the more dense structure of matrix, the smaller the pores and thus the less absorbed amount of water. Thus, compared with the reference sample (Coll), the amount of water absorbed by the composites is 2-3 times lower; they reached equilibrium within 24 hours.

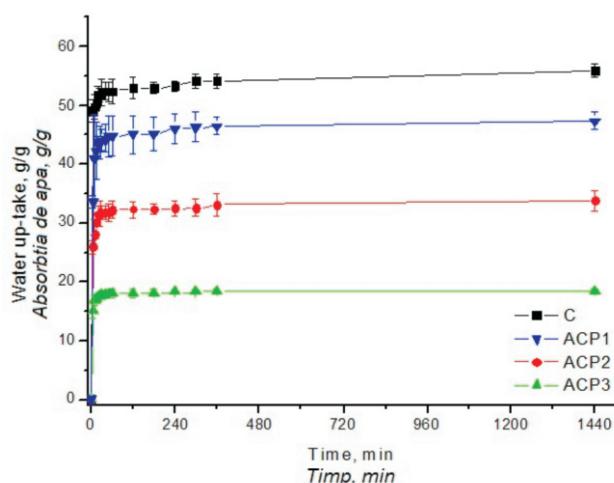


Figure 2. Water absorption profiles of the composites collagen

and collagen:amorphous calcium phosphates composites (ACP, ACP2, ACP3)

Figura 2. Absorbția de apă a colagenului și a compozitelor colagen:fosfat de calciu (ACP, ACP2, ACP3)

Enzymatic Degradation

In order to simulate rate of biodegradation and resorption of composites under *in vivo* conditions, we performed *in vitro* digestion by collagenase. Among all the enzymes, only collagenase is able to cleave collagen completely. Coll composite was completely degraded in less than 4 hours, while the composites containing ACP were digested more slowly comparing with collagen (Coll).

The composites with mineral phase were digested at different times, as Figure 3 shows.

Absorbția de apă

Toate probele absorb o cantitate foarte mare de apă în primele minute. Curbele cinetice de absorbție prezentate în Figura 2 prezintă aceeași alură pentru toate probele. Cu cât cantitatea de material ceramic este mai mare, cu atât matricea este mai densă, porii acestora sunt mai mici și, implicit, cantitatea de apă absorbită este mai mică. Astfel, comparativ cu proba de referință (Coll), cantitatea de apă absorbită de către compozite este de 2-3 ori mai scăzută, ele ajungând la echilibru în timp de 24 de ore.

Degradare enzimatică

Pentru a stimula viteza de biodegradare și resorbție a compozitelor în condiții *in vivo*, s-a realizat o digestie în colagenază *in vitro*. Dintre toate enzimele, doar colagenaza poate cliva în totalitate colagenul. Compozitele Coll au fost degradate complet în mai puțin de 4 ore, în timp ce compozitele cu ACP au fost digerate într-o perioadă mai lungă de timp, comparativ cu colagenul (Coll).

După cum se poate observa în Figura 3, compozitele cu fază minerală sunt digerate la intervale diferite de timp.

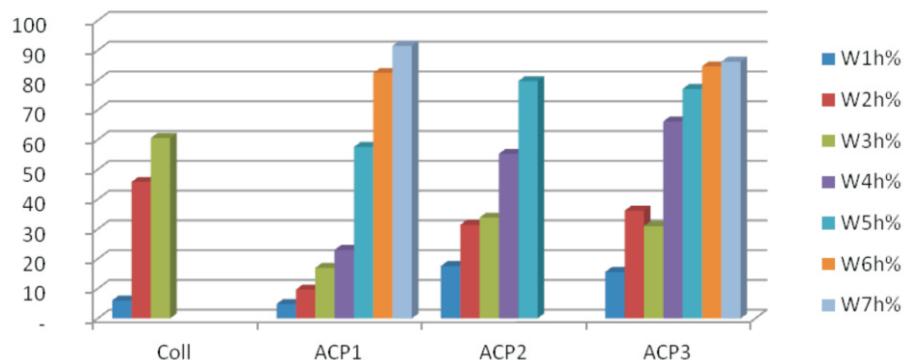


Figure 3. *In vitro* enzymatic degradation of collagen and collagen:amorphous calcium phosphate composites
Figura 3. Degradarea enzimatică *in vitro* a colagenului și a compozitelor colagen:fosfat de calciu amorf

As it is presented in the Figure 3, the resistance to collagenase increases with increasing of percentage of mineral phase (ACP), and the most resistant ones are samples containing 75% ACP (ACP3).

Scanning Electron Microscopy

The SEM images for the obtained composites showed a porous structure, very similar to that of spongy bone. Figure 4 a-d shows the microstructure of collagen, mineral phases and the composites at magnification of 200x. The collagen:ACP composites present a fully interconnected pore network. The mineral phase did not modify the form of pores, the spongy structure having the aspect of fibrous collagen matrix embedded with particles of mineral phase.

După cum este prezentat în Figura 3, rezistența la colagenază crește odată cu creșterea procentului de fază minerală (ACP), cele mai rezistente fiind probele cu un conținut de 75% ACP (ACP3).

Microscopie electronică de baleaj

Imaginile SEM obținute pentru compozitele experimentale prezintă o structură poroasă, similară cu cea a osului spongios. Figura 4 a-d prezintă microstructura colagenului și a compozitelor la o mărire de 200x. Compozitele colagen:ACP prezintă o rețea cu pori complet interconectați. Faza minerală nu a modificat forma porilor, structura poroasă păstrează aspectul fibros al matricei de colagen cu particule ale fazei minerale încorporate.

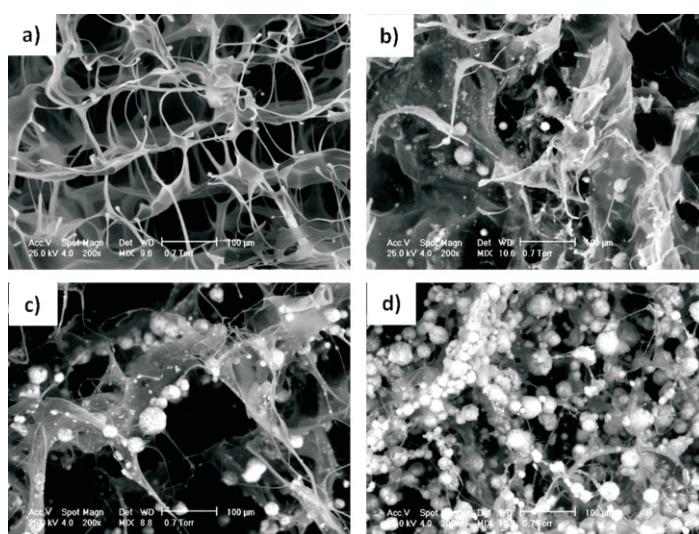


Figure 4. SEM images of the a) collagen (Coll) and collagen:amorphous calcium phosphate, b) ACP1, c) ACP2, d) ACP3
Figura 4. Imagini SEM pentru a) colagen (Coll) și colagen:fosfat de calciu amorf, b) ACP1, c) ACP2, d) ACP3

CONCLUSIONS

The aim of this research was to evaluate the absorption and degradation characteristics of some biodegradable collagen-based composites in which ceramic filler has been added (ACP).

The most stable samples were biocomposites with 75% ACP or reported to collagen due to stronger bonds, as the FTIR analysis and *in vitro* enzymatic degradation demonstrated. The homogeneity of the structure and the interconnectivity of the pores are also some important advantages of our experimental biocomposites.

The absorption and degradation characteristics have been influenced by ceramic filler, improving the degradation rate of the polymeric matrix of the composites. The composites with 75% ceramic filler (ACP3) present the best behaviour.

Considering the characteristics which have been studied in this paper, the experimental biocomposites appear to be suitable for medical applications.

Acknowledgements

The work has been funded by the Sectoral Programme Human Resources Development 2007-2013 of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection through the Financial Agreement POSDRU/88/1.5/S/60203.

REFERENCES

1. Laurencin, C.T., Ambrosio, A.M.A., Borden, M.D., Cooper, J.A., *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **1999**, 1, 19–46.
2. Bruder, S.P., Fox, B.S., *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **1999**, 367s, 68–83.
3. Burg, K.J.L., Porter, S., Kellam, J.F., *Biomaterials*, **2000**, 21, 2347–59.
4. Mickiewicz, R.A., Mayes, A.M., Knaack, D., *J. Biomed. Mater. Res.*, **2002**, 61, 581–592.
5. Tenhuisen, K.S., Martin, R.I., Klimkiewicz, M., Brown, P.W., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1995**, 29, 803–810.
6. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., Chiellini, E., *Prog. Polym. Sci.*, **2010**, 35, 410–414.
7. Meziani, M.J., Rollins, H.W., Allard, L.F., Sun, Y.P., *J. Phys. Chem.*, **2002**, 106, 11178–11182.
8. Azvedo, M.C., Reis, R.L., Claase, M.B., Grijpma, D.W., Feijen, J., *J. Mater. Sci. - Mater. Med.*, **2003**, 14, 103–107.
9. Nagano, M., Nakamura, T., Kokubo, T., Tanahashi, M., Ogawa, M., *Biomaterials*, **1996**, 17, 1771–1777.
10. Boskey, A.L., *J. Dent.*, **1997**, 76, 1433–1436.
11. Zhao, J., Liu, Y., Sun, Wb., Zhang, H., *Chem. Cent. J.*, **2011**, 5, 40.
12. Li, Y.B., Li, D.X., Weng, W.J., *J. Inorgan. Mater.*, **2007**, 22, 775–782.
13. Dorozhkin, S.V., *J. Funct. Biomater.*, **2010**, 1, 22–107.
14. Dorozhkin, S.V., *Biomaterials*, **2010**, 31, 1465–1485.
15. Klein, C.P., Driessens, A.A., Groot, K., Hooff, A., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1983**, 17, 769–784.
16. Dorozhkin, S.V., *Materials*, **2009**, 2, 399–498.
17. Albu, M.G., Collagen Gels and Matrices for Biomedical Applications, LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, **2011**, 23–24.
18. Albu, M.G., Ficai, A., Lungu, A., *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2010**, 10, 3, 39–50.

CONCLUZII

Scopul acestei lucrări a fost de a evalua caracteristicile de degradare și absorbție ale unor compozite pe bază de colagen în care a fost adăugată pulbere ceramică (ACP).

Conform legăturilor chimice puternice ce au fost evidențiate prin FTIR, precum și degradării *in vitro* cu colagenază, s-a demonstrat că cele mai stabile materiale compozite sunt probele cu o concentrație de 75% ACP. Omogenitatea structurii și interconectivitatea porilor sunt, de asemenea, câteva avantaje importante ale biocompozitelor obținute experimental.

Degradarea și absorbția sunt influențate de pulberea ceramică încorporată, îmbunătățind viteza de degradare a matricei polimerice. Compozitul cu cele mai bune rezultate este compozitul cu 75% fosfat de calciu amorf (ACP3).

Tinând cont de caracteristicile studiate în cadrul acestei lucrări, compozitele experimentale par a fi corespunzătoare pentru utilizarea lor în aplicațiile medicale.

Mulțumiri

Lucrarea a fost finanțata de Programul Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013 al Ministerului Muncii, Familiei și Protecției Sociale din România prin Acordul de finanțare POSDRU/88/1.5/S/60203.