

© 2013 Springer

Folgueras Méndez, J., et al. (eds.) Recubrimientos de Hidroxiapatita Nanocristalina – Preparación, Caracterización y Evaluación de la Bioactividad. V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2011, May 16–21, 2011, Habana, Cuba. Berlin: Springer, 2013, pp. 108-111 (IFMBE Proceedings, vol. 33) [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-21198-0\\_28](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-21198-0_28)

# Recubrimientos de hidroxiapatita nanocrystalina – preparación, caracterización y evaluación de la bioactividad

E. Peón<sup>1</sup>, I.N. Bastos<sup>2</sup>, J. M. Granjeiro<sup>3</sup>, A.A. Elhadad<sup>4</sup>, A. Jiménez-Morales<sup>5</sup>, V. Barranco<sup>6</sup>, J.C.G. Sierra<sup>4</sup>, G.D. Soares<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biomateriales/Cerámicas y Composites, Universidad de La Habana, Ciudad Habana, Cuba

<sup>2</sup> Polytechnic Institute, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal Fluminense, Niterói, Río de Janeiro, Brasil

<sup>4</sup> Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas, CSIC, Madrid, España

<sup>5</sup> Universidad Carlos III de Madrid/Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales e Ingeniería Química, Madrid, España

<sup>6</sup> Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, CSIC, Madrid, España

<sup>7</sup> COPPE/Programa de Ingeniería Metalúrgica y Materiales, UFRJ, Río de Janeiro, Brasil  
epeon@biomat.uh.cu

**Abstract—** The coating of metallic alloys with bioactive ceramics aims to accelerate bone formation around implant, contributing to its fixation. In this paper, the deposition of bioactive hydroxyapatite ceramic by sol-gel method on Ti-6Al-4V alloy sheets was studied. Coatings prepared from hydroxyapatite sol have been accomplished by dip-coating technique on non-toxic Ti-6Al-4V alloy for biomedical applications. The coating layer was characterized by X-ray diffraction provided valuable information about the phase transformation, identification of the phases developed and degree of crystallinity. Scanning electron microscopy was applied to study the surface morphology and coating adhesion to substrate was evaluated by shear testing (ASTM F 1044-05). The obtained results show that all the prepared samples are ceramic nanopowders with crystal structure and composition like hydroxyapatite, with small deviations from the one present in the human bone. The corrosion behavior of the resulting hydroxyapatite coatings in a simulated body fluid (SBF) was studied by electrochemical impedance spectroscopy. The hydroxyapatite coated Ti-6Al-4V alloy displayed excellent bioactivity when soaked in the SBF and acceptable corrosion protection behavior. The cytocompatibility test according to ISO 10993-5 standard shows that sol-gel coating did not provoke cell dead.

**Palabras claves—** ceramics, hydroxyapatite, sol-gel, biomaterials, “in vitro” tests, cytotoxicity.

## I. INTRODUCCIÓN

Con el aumento de la esperanza de vida, se estima un aumento del número de fracturas de cadera que pasarían de 1,3 millones en 1990 a cerca de 2,6 millones en 2025, como consecuencia de caídas, accidentes y dolencias crónico-degenerativas, como la osteoporosis según los reportes de la OMS [1]. Existe una tendencia en aumento del uso de prótesis no cementadas o híbridas, especialmente en pacientes jóvenes [2,3]. En este caso, el asta femoral (o parte de ella) recibe un tratamiento superficial para optimizar la fijación

biológica, por el proceso conocido como osteointegración. La principal ventaja del uso de astas osteointegrables, es evitar el uso de cementos como el poli(metacrilato de metilo) que tiende a degradarse con el tiempo, aflojándose la prótesis y exigiendo con esto, cirugías adicionales de revisión.

Dentro de los tratamientos aplicados a las astas, se destacan los recubrimientos cerámicos con fosfatos de calcio (especialmente de hidroxiapatita - HA) por su similitud con la parte mineral del hueso, acelerándose el proceso de osteointegración [4]. Comercialmente el recubrimiento es impregnado por aspersión de plasma, mas este proceso depende de equipamiento caro, además de ser comentadas en la literatura posibles desventajas tales como el despegue del recubrimiento por su elevado grosor [5], la naturaleza física de la unión y la formación de tensiones residuales en la interfase metal-cerámica [6]. Por todo lo anterior, diversos procesos como el biomimético [7], electroforético [8] y sol-gel [9] están siendo estudiados para recubrir metales y sus aleaciones con las cerámicas de fosfatos de calcio [10].

De acuerdo con la Organización Internacional de Normalización (International Standard Organization – ISO), el ensayo de citotoxicidad *in vitro* es el primer ensayo para avalar la biocompatibilidad de cualquier material para uso en dispositivos biomédicos [11, 12].

El presente trabajo tiene como objetivo optimizar los parámetros de proceso para realizar recubrimientos de HA sobre la aleación Ti-6Al-4V. La caracterización del recubrimiento fue realizada por técnicas de DRX, MEB/EDX, evaluada su adherencia, además de su comportamiento frente a la corrosión por medidas de impedancia electroquímica en fluido biológico simulado. Seguidamente a la caracterización se realizó el ensayo de citotoxicidad “in vitro”. Finalmente se probó el recubrimiento sobre astas femorales comerciales.

## II. MATERIALES Y METODOS

### A. Preparación de los materiales de estudio

Muestras de la aleación de Ti-6Al-4V con 1 mm de espesor y 10x10 mm (ASTM F-136) fueron proyectadas con partículas de alúmina seguido de ataque químico con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HF. Esta combinación de tratamientos provoca una superficie rugosa de topografía favorable a la adhesión e interacción química del recubrimiento con el sustrato [12].

El recubrimiento de hidroxiapatita, fue preparado aplicando una variante del proceso sol-gel descrito por D. M. Liu [13], utilizando como reactivos trietil fosfito y nitrato cálcico tetrahidratado. Primeramente se hidroliza el precursor de fósforo (trietil fosfito) bajo agitación vigorosa. Tras 24 h de hidrólisis, se añade al medio una cantidad estequiométrica de solución 4M de nitrato del calcio, manteniéndolo bajo agitación durante 30min, dejándolo a continuación en reposo a temperatura ambiente otras 24 h, para obtener el gel de hidroxiapatita. El gel se depositó sobre la superficie metálica mediante spin-coating durante 9 min a una velocidad de 4200 rpm. La aleación metálica con el recubrimiento fue tratada térmicamente a 450°C en vacío por 2 horas para densificar la capa de hidroxiapatita.

### B. Caracterización de los materiales obtenidos

El recubrimiento fue caracterizado por microscopía electrónica de barrido (MEB, JEOL JSM-6460LV) y difracción de rayos-X (DRX, Rigaku Miniflex con radiación CuK $\alpha$ ).

El ensayo de adhesión del recubrimiento de hidroxiapatita sobre el sustrato fue realizado según la norma ASTM F 1044-05. Esta norma define las condiciones del ensayo de cizallamiento para avalar recubrimientos de fosfatos de calcio sobre sustratos metálicos, e indica, el grado de adhesión del recubrimiento al sustrato. El cuerpo de prueba consiste en dos placas, una recubierta y otra no, unidas por adhesivo que debe presentar resistencia al cizallamiento superior a 34,5 MPa. Los ensayos fueron realizados por quintuplicado en máquina universal de ensayo Instron.

El comportamiento del sistema recubrimiento-HA/Ti-6Al-4V frente a la corrosión se evaluó aplicando medidas de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE). Para este propósito se empleó un potenciostato/galvanostato AutoLab EcoChemie Utrecht PGSTAT30 equipado con un módulo de analizador de frecuencia FRA2 y una configuración de tres electrodos sumergidos en una celda electroquímica conteniendo solución de fluido biológico simulado o solución de Kokubo (FBS). Las medidas de EIE fueron realizadas a potencial de circuito abierto, aplicando perturbaciones de ondas sinusoidales de  $\pm 10$ mV en amplitud y un barrido de frecuencia entre  $10^5$ - $10^{-3}$ Hz. Los datos de impe-

dancia se analizaron utilizando el programa EQUIVCRT (AC-Immittance Data Analysis System, Versión 4.51). Los valores de resistencia eléctrica fueron obtenidos aplicando las rutinas del software ZView® versión 3.1c (Scribner Associates Inc, Southern Pines).

La citocompatibilidad de las muestras recubiertas fue avalada como describe la norma ISO 10993-5. Para ello fueron sembradas 30.000 células de pré-osteoblastos de femur de Balb/c 3T3 (FOST) sobre placas de 10x10 mm de las muestras recubiertas por sol-gel y mantenidas en cultivo de DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Seguidamente, las placas fueron removidas, las células fijadas en solución 2,5% de glutaraldeído tamponado con cacodilato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas en solución tampón de cacodilato 0,1M, deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol 50 y 100% e inmersas en solución de hexametilsilazana-etanol absoluto (50%:50%) seguida de hexametilsilazana (100%), secadas por 24 horas y metalizadas con oro-paladio para observación en MEB.

Para ensayar la efectividad del recubrimiento de bio-cerámica una prótesis comercial fue entonces recubierta por el proceso sol-gel. El proceso adoptado fue idéntico al utilizado en las muestras planas.

## II. RESULTADOS Y DISCUSION

La Fig. 1 muestra la morfología del recubrimiento de HA. El recubrimiento es poroso y no se observaron grietas. Los poros desarrollados en el recubrimiento pueden ser el resultado de la evolución del gas durante la descomposición térmica. Estos poros parecen estar conectados para formar una red continua con un tamaño entre 5 a 10  $\mu$ m. Esta morfología es una ventaja para permitir la circulación de fluido fisiológico y drogas. El análisis de EDX del recubrimiento de HA que cubre la aleación de Ti-6Al-4V puede observarse en la Fig. 2. No se observan ningún pico correspondiente al Ti, Al o V, pudiéndose concluir que ningún área metálica de la muestra está expuesta.

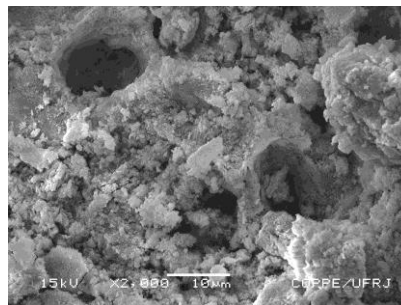


Fig. 1 Micrografía MEB del recubrimiento de HA sobre Ti-6Al-4V

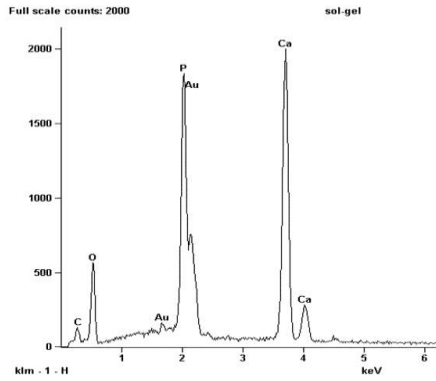


Fig. 2 Análisis de EDX del recubrimiento sol-gel de HA sobre la aleación Ti-6Al-4V

El espectro de difracción de rayos-X (Fig. 3) indica una estructura con elevada cristalinidad compuesta de hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) y carbonato de calcio  $\text{CaCO}_3$  (JCPDS 81-2027). A pesar de que algunos autores consideran el carbonato de calcio tóxico, Zhang et al. [14] obtienen cementos de fosfatos de calcio conteniendo carbonato de calcio, considerando que el carbonato de calcio eleva la reabsorción del material y le da una excelente citocompatibilidad. En el caso de implantes, la reabsorción parcial de la capa de recubrimiento puede ser un aspecto positivo en el sentido de acelerar la formación ósea [4].

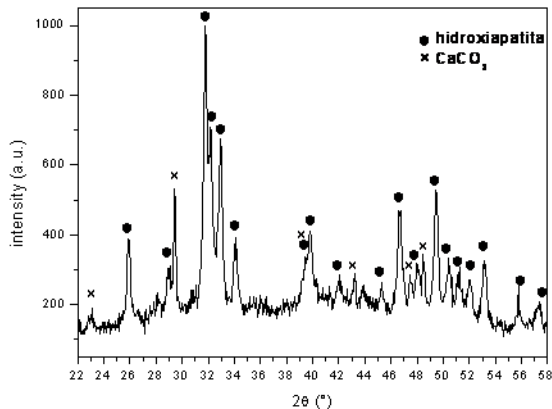


Fig. 3 Difracción de rayos-X de la aleación Ti-6Al-4V recubierta por el método sol-gel

La resistencia al cizallamiento de las muestras ensayadas fue igual a  $29,0 \pm 3,6$  MPa. Según lo reportado por la ISO, ensayos interlaboratorios de la aleación Ti-6Al-4V recubierta con HA por el método de aspersión térmica presentan una resistencia al cizallamiento igual a 29,6 MPa [10]. También el desvío apreciado (3,6 MPa) fue inferior al máximo admitido por la norma que es de 4,81 MPa. De esta forma, es

posible concluir que el recubrimiento de HA por el proceso de sol-gel tiene buena adhesión al sustrato metálico. Un trabajo reciente sobre desgaste de capas producidas por sol-gel sobre la aleación Ti-6Al-4V mostró que estos recubrimientos son menos propensos al desgaste que los recubrimientos de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$ , probablemente por la mayor deformación plástica de la capa de HA [15].

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) se usó para evaluar las propiedades de protección ante la corrosión del sistema de recubrimiento HA/Ti-6Al-4V. La Fig. 4 muestra la evolución de los espectros de impedancia electroquímica (método Nyquist) a diferentes tiempos de inmersión en FBS de las muestras. Durante tiempos de inmersión cortos (5 min) se obtienen arcos muy abiertos con valores de impedancia altos. Entre 5 min y 1 día de inmersión se observa una rápida disminución de los valores de impedancia que puede ser debido a la penetración de la solución del FBS a través de los poros presentes en la capa de recubrimiento. Sin embargo, con el tiempo, la evolución de la impedancia muestra una tendencia diferente. La curvatura de los arcos de Nyquist se abren rápidamente y la impedancia total alcanza valores comparables a los observados al inicio de la inmersión en FBS. Este comportamiento puede ser debido al bloqueo de los poros por la formación de precipitado de HA desde la solución, que previene penetraciones extensas.

La evolución de la resistencia total del sistema recubrimiento HA/Ti-6Al-4V durante el tiempo de inmersión en SBF fue calculado de los espectros de impedancia mediante el software ZView, obteniéndose valores positivos (+0.71) del coeficiente ( $\Delta R/R_i$ ), debido al efecto de bloqueo de la precipitación biomimética de HA a partir de la solución de FBS que limita su penetración hacia el sustrato metálico.

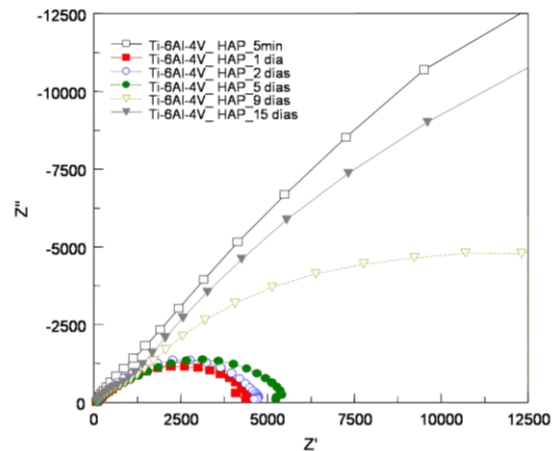


Fig. 4 Evolución de los espectros de impedancia electroquímica para recubrimientos HA/Ti-6Al-4V en inmersión de FBS

Micrografías electrónicas de barrido de las células sembradas sobre la aleación recubierta por sol-gel de HA pueden observarse en la Fig. 5, donde se constata la adhesión de las células y diseminación sobre el material con emisión de filopodio y pseudópodos.

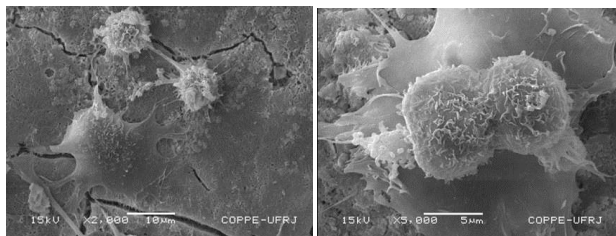


Fig. 5 MEB de la morfología de las células cultivadas sobre muestras de Ti-6Al-4V recubiertas por sol-gel de HA

A partir de la confirmación de la citocompatibilidad, la resistencia al cizallamiento y las fases cerámicas formadas, fue recubierto un implante real para identificar si el recubrimiento era uniforme sobre piezas con geometría compleja. La Fig. 6 muestra parte de un asta femoral con recubrimiento uniforme y, cualitativamente, con la misma adhesión al sustrato metálico, indicando el éxito del recubrimiento por el método sol-gel.



Fig. 6 Implante con recubrimiento cerámico por el método sol-gel

### III. CONCLUSIONES

Se obtuvieron recubrimientos de hidroxiapatita cristalina sobre Ti-6Al-4V a partir de precursores de tipo sol-gel como lo demostró la DRX. La porosidad del recubrimiento, entre 5 y 10  $\mu\text{m}$  puede ser una ventaja para permitir la circulación de droga y fluido fisiológico. Los resultados de resistencia al cizallamiento indican que la deposición por el método sol-gel presenta una adhesión adecuada de la interfase metal-cerámica y el sistema fue considerado atóxico

por el ensayo de citotoxicidad, según la norma ISO 10993-5. Los recubrimientos obtenidos de HA sobre la aleación de Ti-6Al-4V mostraron buenas propiedades de barrera contra el fenómeno de corrosión en los ensayos "in vitro".

También fue posible recubrir astas comerciales por el proceso de sol-gel, lo que puede ser una alternativa viable para la producción de astas femorales no cementadas.

### RECONOCIEMENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero a estas investigaciones por medio de proyectos a CNPq (Ref. 491512/2004-0), Comunidad de Madrid (Ref. 07N/0082/2002), CSIC (Ref. 2001CU0004) y Programa Nacional de Materiales (Ref. MAT2006-04486).

### REFERENCIAS

1. DATASUS, 2007.
2. Rodrigues C. V. M. (2006) Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, maio.
3. LeGeros R Z (2002) Clinical Orthopaedics and Related Research 395:81-98.
4. Lynn A K, DuQuesnay D L (2002) Biomaterials 23:1937- 1946.
5. Yang Y-C (2007) Surf. Coat. Technol. 201:7187-7193.
6. Kokubo T, Takadama T (2006) Biomaterials 27:2907-2915.
7. Sena L A, Andrade M C, Rossi A M, Soares G A (2002) Journ. Biomed. Mater. Research. 60:1-7.
8. Liu D-M, Yang Q, Troczynski T (2002) Biomaterials 23:691- 698.
9. Peon E, Jimenez-Morales A, Fernandez-Escalante E, Garcia-Alonso M C, Escudero M L, Galván J C (2005) Rev. Metal. Madrid Sp. Iss.:479.
10. International Standard Organization, ISO 10993.
11. Rogero S O, Lugão A B, Ikeda T I, Cruz A S (2003) Materials Res. 6, 3:317.
12. Diniz M G, Soares G A, Coelho M J, Fernandes M H (2002) Journ. Mater.Sci.: Mater in Medicine 13:421-431.
13. Liu D-M, Troczynski T, Tseng W J (2001) Biomaterials 22:1721-1730.
14. Combes C, Miao B, Bareille R, Rey C (2006) Biomaterials 27 1945-1954.
15. Zhang W, Wang C, Liu W (2006) Wear 260:379-386.
16. Rogero S O, Santos C, Daguano J K M F (2007) Matéria 12:134-139.

Autor: Eduardo Peón Avés  
 Instituto: Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana  
 Calle: Ave Universidad e/ G y ronda, Vedado  
 Ciudad: Ciudad Habana  
 País: Cuba  
 E-mail: epeon@biomat.uh.cu