

# RECUBRIMENTOS BIOACTIVOS PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO OBTENIDOS POR DEPOSICIÓN ELECTROFORÉTICA.

M. J. Santillán<sup>(1,2)</sup>, N. E. Quaranta<sup>(3)</sup>, F. Membrives<sup>(1)</sup>, A. R. Boccaccini<sup>(4)</sup>

(1) Facultad de Ccias. Aplicadas a la Industria. UNCuyo. San Rafael- Mendoza, Argentina

(2) Centro Atómico Bariloche. CONICET. San Carlos de Bariloche, Argentina.

(3) Facultad Regional San Nicolás. UTN.San Nicolás, Argentina. Investigador CIC.

(4) Department of Materials. Imperial College. London, United Kingdom

[mjsanti@fcai.uncu.edu.ar](mailto:mjsanti@fcai.uncu.edu.ar); [santillm@ib.cnea.gov.ar](mailto:santillm@ib.cnea.gov.ar)

## RESUMEN

Se investigó la deposición electroforética (EPD) de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2$  dopado con Ag ( $\text{TiO}_2$ -Ag) sobre titanio para aplicaciones en implantes óseos. Las condiciones óptimas de EPD se obtuvieron aplicando 10 y 3V y tiempos de deposición de 120 y 210 min., utilizando una suspensión acuosa de sólidos con 4% de etanol. De acuerdo a la evaluación de la SEM, los recubrimientos fueron homogéneos y con cierta cantidad de fisuras y con alta densidad. Estas fisuras podrían servir de sitios de anclajes a los osteoblastos y favorecer la proliferación celular. La bioactividad de los recubrimientos se evaluó por medio de estudios de inmersión en líquido corporal simulado (SBF) por períodos de hasta 28 días y posteriormente se determinó la formación de hidroxiapatita (HA). De acuerdo a los estudios de bioactividad, la incorporación de Ag al recubrimiento de  $\text{TiO}_2$  no afectaría la capacidad de formación de material de anclaje y podría otorgarle al recubrimiento un efecto antibacteriano.

**Palabras clave:** Deposición electroforética, titania, bioactividad.

## 1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos, lleva implícita una combinación de métodos de ingeniería y de las ciencias de la vida para crear elementos artificiales que dirijan la regeneración del tejido que lleven a desarrollar nuevas estrategias para la reparación y regeneración del tejido perdido o dañado.

Diversos materiales nanoestructurados tales como titania ( $\text{TiO}_2$ ) y Bioglass® son empleados en ingeniería de tejido e implantes óseos en forma de films delgados, debido a la biocompatibilidad y bioactividad que presentan. Un biomaterial es “un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Este tipo de materiales se caracterizan por estimular reacciones favorables en el tejido receptor tal que, finalmente, logran un enlace químico directo con él, produciéndose una fijación denominada “fijación bioactiva” (Hench y Best, 2004).

La osteoconductividad es una de las propiedades que se busca del material y se entiende como la capacidad que un material posee para actuar como un sustrato en el cual las células puedan adherirse y desarrollar sus funciones. Los materiales osteoconductivos son diseñados para proveer de un medio de guía al crecimiento del hueso. Estos materiales han sido calificados como bioactivos, lo que significa que están diseñados para provocar o modular una actividad biológica del tejido circundante. En el campo de

la regeneración ósea, este término está directamente relacionado con un enlace directo entre el material y el hueso (Park, 2000).

Los materiales artificiales que se usan tradicionalmente en implantes óseos son generalmente aislados del hueso circundante por medio de la formación de una cápsula fibrosa. Consecuentemente, no pueden adherirse al hueso y esto ha sido un problema crítico en su aplicación para la regeneración ósea. Al emplear materiales bioactivos, se crea espontáneamente un enlace y dichos materiales se integran al hueso en el cuerpo.

Los materiales bioactivos presentan una característica común en la interfase con el hueso después de su integración. Tanto el Bioglass®, como el TiO<sub>2</sub>, forman una capa de hidroxiapatita en la interfase, la cual actúa como mediadora en la integración con el hueso (Park, 2000). Evaluaciones histológicas *in vivo* han mostrado que esta capa de HA que se forma en la superficie de estos materiales en la etapa temprana del periodo de inmersión, posteriormente integra la matriz ósea. Cuando este proceso ocurre, se crea un enlace químico entre el hueso mineral y la superficie de HA para disminuir la energía interfacial existente entre ambas (Hench y Best, 2004), (Park, 2000), (Misra y col., 2008).

Emplear la deposición electroforética (EPD) como método de fabricación de películas, es altamente interesante por ser una técnica muy versátil, rápida, de bajo costo, posible de adaptar a variadas geometrías y que permite la manipulación de materiales micro y nanoestructurados. Es una técnica de procesamiento de materiales basada en el movimiento de partículas cargadas en el seno de un líquido cuando se le aplica un campo eléctrico externo y como resultado de ello, las partículas coagulan sobre el sustrato (electrodo de trabajo) en forma de *film*.

La EPD está siendo altamente considerada para la producción de películas para una gran variedad de aplicaciones en el área de los recubrimientos funcionales, tales como recubrimientos bioactivos para aplicaciones en implantes (Mondrago y col., 2004), (Krause y col. 2004), (Radice y col. 2007), cátodos de celdas de combustibles (Santillán y col., 2008<sup>1</sup>), entre otros. En este contexto, la EPD ha mostrado ser un método muy conveniente para la manipulación de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (Santillán y col., 2008<sup>2</sup>), (Santillán y col., 2009).

Aquí hemos investigamos la posibilidad de usar EPD para producir películas uniformes de material bioactivo sobre Ti usando suspensiones orgánicas y acuosas y su posterior respuesta *in vitro* de la reactividad de los mismos.

## **2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **2.1. Materiales de partida.**

Se empleó TiO<sub>2</sub> nanoestructurado (Degussa), con tamaño de partícula del 21nm y superficie específica de 50m<sup>2</sup>/g. Los polvos de TiO<sub>2</sub>-Ag fueron sintetizados por reacciones de catálisis básica.

Las suspensiones se realizaron a partir de suspensiones de acetilacetona, AcAc (Tetrahedron) y I<sub>2</sub> (Merck), ambos reactivos de pureza analítica. La deposición de TiO<sub>2</sub>-Ag se realizó usando una suspensión acuosa con 5% de etanol. Como sustratos de deposición se usaron placas de titanio (>99%, Aldrich) de 15x7x0.25 mm.

### **2.2. Deposición electroforética y Caracterización microestructural.**

Para la fabricación de películas de TiO<sub>2</sub> el sustrato metálico se utilizó como electrodo negativo (cátodo) y el ánodo se confeccionó de acero inoxidable. La distancia entre electrodos fue de 15 mm.

La concentración de TiO<sub>2</sub> de la suspensión orgánica fue de 1.05%wt, mientras que la suspensión acuosa fue de 1.07%wt de TiO<sub>2</sub>-Ag.

La EPD de TiO<sub>2</sub> se realizó a voltaje constante de 10V-120s, mientras que para la deposición de TiO<sub>2</sub>-Ag se evaluó las condiciones de EPD en el rango de 3V a 20V por periodos de 30-210 s. Después de la deposición, las muestras se secaron en aire y se sinterizaron en vacío a 700°C durante 2 h (5°C/min.).

La caracterización microestructural de las probetas se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM, Philips 515) con EDS, y difracción de RX (XRD, Philips diffractometer 1700), con radiación CuK $\alpha$  usando un paso de 0.04° con 2 s por paso. La identificación de las fases cristalinas se realizó usando el programa “X’Pert HighScore” aplicando la base de datos PDF-2 y PDF-4 del ICDD.

### **2.3. Estudios in vitro de bioactividad.**

Los ensayos de bioactividad se realizaron por inmersión en fluido corporal simulado (simulated body fluid, SBF) siguiendo el protocolo de Kokubo et al. (T. Kokubo y col., 1990). El SBF contiene una composición iónica similar al plasma sanguíneo. Se preparó disolviendo a 37 °C cantidades apropiadas NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en agua destilada. Se ajustó el pH a 7.25 usando HCl y tris (hydroxyl–methyl) aminomethane. Las pruebas de bioactividad se realizaron mediante inmersión de las muestras seleccionadas en 10 ml de SBF por periodos de 7 y 28 días a 37°C. El volumen de SBF fue renovado cada 7 días.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

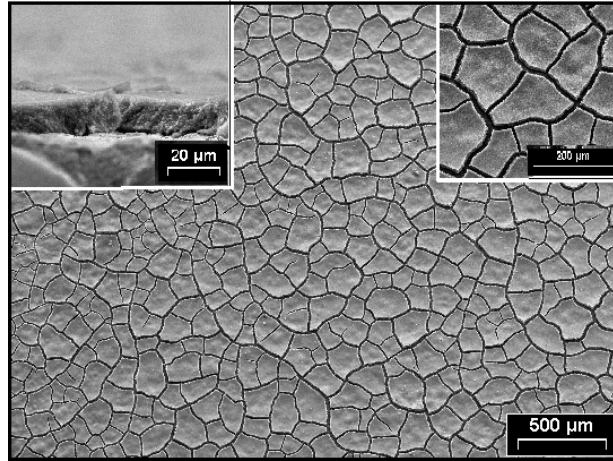
### **3.1. Deposición y caracterización de recubrimientos.**

#### a) Recubrimientos de TiO<sub>2</sub>

Cuando se emplean suspensiones donde el solvente posee grupos cetónicos, el iodo genera H<sup>+</sup> libres al reaccionar con el solvente de acuerdo a la reacción de la ec. (1) (Santillán y col., 2008). Estos protones son adsorbidos sobre las partículas de titania, confiriéndole a las mismas, la carga positiva. Similar reacción se ha reportado entre I – acetona y/o AcAc para sistemas con LSCF (Santillán y col., 2008<sup>2</sup>). El efecto inductivo-mesomérico de los grupos carbonilos sobre los átomos vecinos de la acetilacetona es alto, facilitando de este modo, la liberación de los protones, responsables de la carga positiva de los soles cerámicos.



De acuerdo a la inspección visual y a los análisis por SEM, los mejores recubrimientos de titania se obtuvieron con suspensiones de 1.05% wt de titania depositados a 10V y 120s. A mayores tiempos de deposición no se observó un incremento significativo en el peso de la película depositada pero sí una mayor inhomogeneidad superficial. Luego del tratamiento térmico, es posible observar cierto número de fisuras, debido a la diferencia entre los coeficientes de expansión térmica entre el metal y el cerámico, como puede observarse en la Fig. 1.



**FIGURA 1.** Micrografías de SEM de película de  $\text{TiO}_2$  obtenida a 10V-120s. Los insets muestran detalles de recubrimiento y el corte transversal del mismo.

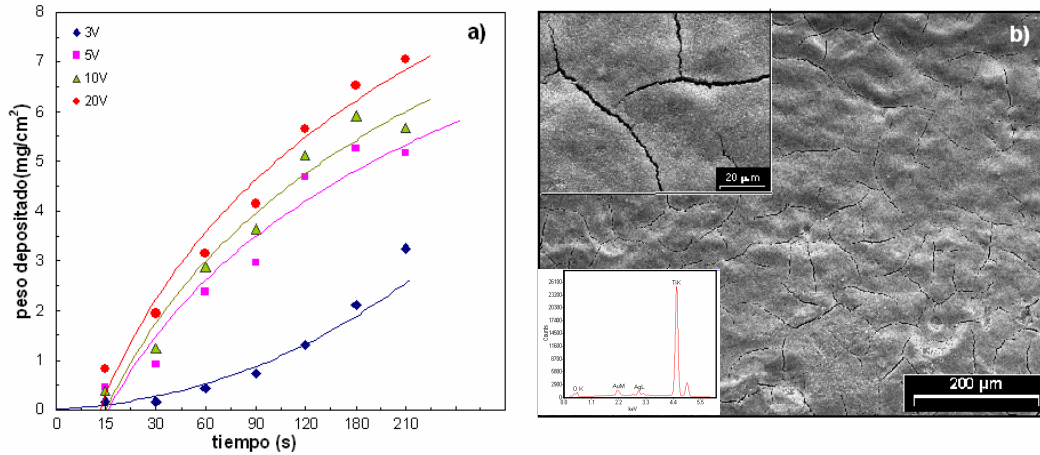
El difractograma XRD de una muestra depositada por EPD y sinterizada, se muestra en la Fig. 2, observándose una gran proporción de anatasa en su composición. En recubrimientos con potencial uso en implantes, la anatasa tiene la ventaja que presenta mayor bioactividad en comparación al rutilo (Moskalewicz y col., 2007), siendo la anatasa es una fase metaestable, por lo cual puede transformarse irreversiblemente a rutilo en un rango térmico comprendido entre los  $400^\circ\text{C}$  y  $1000^\circ\text{C}$ . La temperatura a la cual sucede dicha transformación, depende fuertemente de diversos factores, tales como las impurezas presentes en los polvos, el área específica, el tamaño de partícula y de la atmósfera de reacción, entre otros (Gennari y Pasquevich, 1999).



**FIGURA 2.** XRD del polvo de  $\text{TiO}_2$  usado en la EPD y de una película de  $\text{TiO}_2$  obtenida a 10V-120s sinterizada a  $700^\circ\text{C}$  y en vacío.

#### b) Recubrimientos de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$

Las películas fueron depositadas a diferentes voltajes y se evaluó el efecto del tiempo en la calidad de los recubrimientos. La Fig. 3a) muestra la relación masa depositada vs tiempo, para los diferentes voltajes aplicados. Morfológicamente mejores recubrimientos se obtuvieron a bajos voltajes. Si bien la tasa de deposición es menor, la calidad del film es mejor debido a que se evita la hidrólisis del agua. La Fig. 3b es una micrografía de SEM de un film obtenido a 3V-210s puede verse muy pocas fisuras superficiales.



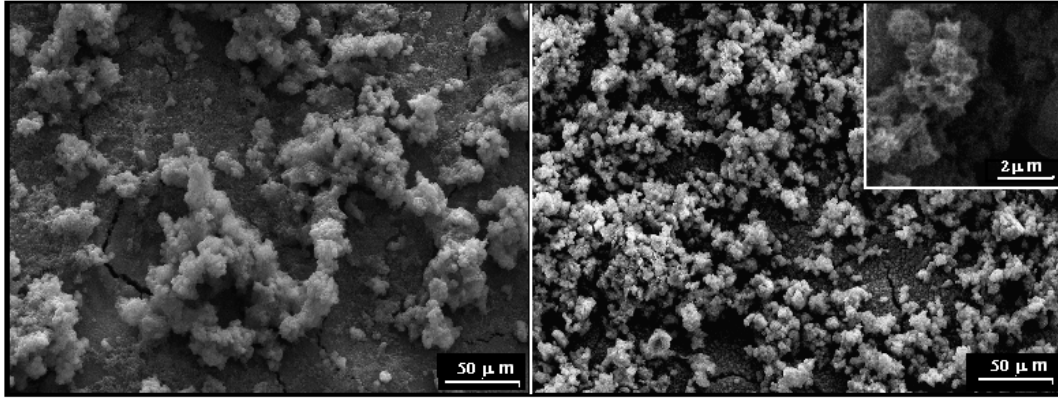
**FIGURA 3.** a) Relación peso depositado vs. tiempo para diferentes voltajes aplicados en el proceso de EPD de  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ . b) Micrografía de SEM de una película de  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  depositada por EPD (3V-210s) y sinterizada a  $700^\circ\text{C}$  y en vacío. Los insets muestran detalles de la superficie del recubrimiento y el espectro de EIS del material..

Espectros de EDS (energy dispersion scattering) muestran la presencia de Ag en la composición de la muestra (ver Fig. 3b).

### 3.2. Ensayos de bioactividad

Los ensayos de bioactividad muestran la capacidad que tiene un material en poder generar una capa de hidroxiapatita (HA) sobre su superficie. Como se mencionó, la HA es el precursor óseo que se produce como medio de enlace entre el material de implante y el hueso.

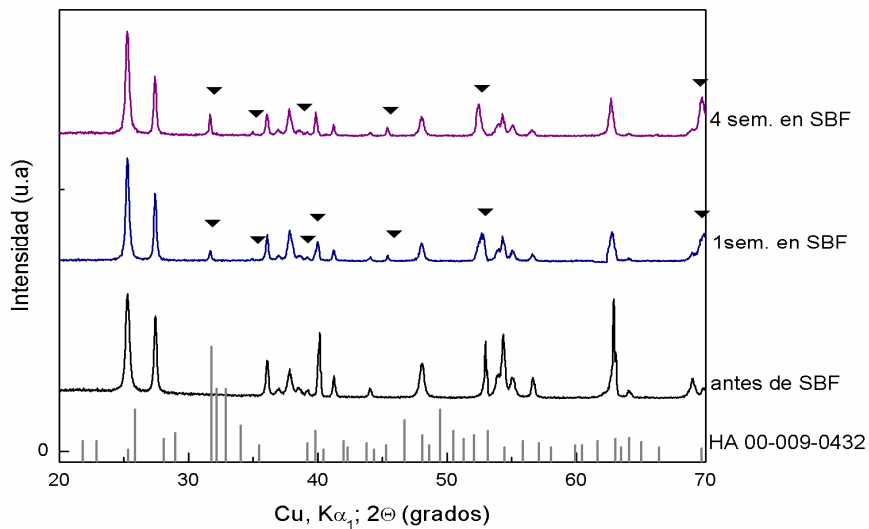
En las micrografías de SEM de películas de  $\text{TiO}_2$  luego de 1 y 4 semanas de inmersión en SBF (Fig. 4). Se observa sobre la superficie la precipitación de HA. La formación de HA implica en un primer estadio el intercambio iónico entre la superficie de la muestra y los iones de la solución, permitiendo la nucleación y el crecimiento de los cristales de HA sobre la superficie de  $\text{TiO}_2$ .



**FIGURA 4.** Micrografía de SEM de un recubrimiento de  $\text{TiO}_2$  luego de 1 y 4 semanas de inmersión en SBF (derecha e izquierda, respectivamente). Se observa la deposición de HA sobre la superficie del recubrimiento. El inset muestra un detalle de la estructura de la HA

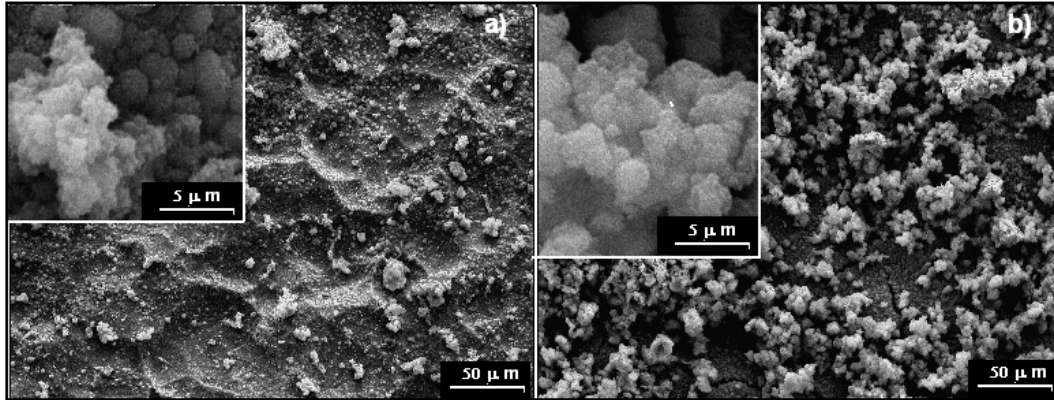
Después de una semana de inmersión se aprecian reflexiones de HA como fase anexa a los componentes de los recubrimiento ( $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ). Dichas reflexiones se hacen más intensas para tiempos prolongados de inmersión. En este caso también se observa una disminución en la intensidad de las reflexiones del recubrimiento a causa de la formación de HA sobre el mismo. Los difractogramas de XRD de las muestras de  $\text{TiO}_2$  estudiadas como también las reflexiones correspondientes a la HA pura se muestran en la Fig. 5.

Análisis por EDS (no mostrados aquí) demostraron la presencia de fosfato de calcio e iones fosfuro característicos de la formación de HA. La relación de Ca/P encontrada por análisis EDX fue aproximadamente 1.7 para ambos recubrimientos, luego de 21 días de inmersión, la cual similar a la relación estequiométrica Ca/P de la HA (1.67).



**FIGURA 5.** XRD del polvo de  $\text{TiO}_2$  usado en la EPD y de una película de  $\text{TiO}_2$  obtenida a 10V-120s sinterizada a  $700^\circ\text{C}$  y en vacío.

La Fig. 6 muestra las características morfológicas de un recubrimiento de  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  luego de 1 y 4 semanas de inmersión en SBF. Al igual que lo que sucede sobre el recubrimiento de  $\text{TiO}_2$ , se observa la formación de HA. La presencia de Ag en el recubrimiento no parece afectar la formación de la interfase de anclaje de HA. La morfología estructural típica de roseta de la HA puede observarse en detalle en los *inset* de la Fig. 6.



**FIGURA 6.** Micrografía de SEM de un recubrimiento de  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  luego de 1 y 4 semanas de inmersión en SBF (derecha e izquierda, respectivamente). Se observa la deposición de HA sobre la superficie del recubrimiento. Los insets muestran detalles de la estructura de la HA precipitada.

#### 4. CONCLUSIONES

En este trabajo hemos obtenido recubrimientos uniformes de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  para ser empleados en regeneración de tejido óseo, empleando como técnica de procesamiento la deposición electroforética. Las condiciones óptimas de EPD fueron de 10V-120s y 3V-210s par las EPD de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ , respectivamente.

A través del estudio de la formación de HA sobre la superficie de los recubrimientos luego de la inmersión en SBF, se confirmó la bioactividad para ambas composiciones de recubrimientos y se puede inferir que la presencia de Ag no afecta la nucleación y crecimiento de los cristales de HA, transformándose estos recubrimientos en una atractiva alternativa en la ingeniería de tejido óseo.

LA EPD puede considerarse una técnica atractiva para fabricar recubrimientos para aplicaciones biomédicas debido a la fácil y rápida manipulación de los materiales cerámicos.

Queda pendiente para futuras investigaciones evaluar el efecto antibacteriano de los recubrimientos de  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ .

#### REFERENCIAS

- Hench, L. L. and Best, S., (2004). Ceramics, Glasses and Glass- Ceramics en Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner, P. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. y Lemons, J. E. Ed. 2da. Elsevier Academic Press, California.
- Park, J. B., (2000). Biomaterials en The Biomedical Engineering Handbook. 2a.Ed., Ed. Bronzino.



- Misra, K., Mohn, D., Brunner, T., Stark, W., Philip, S., Roy, I., Salih, V., Knowles, J., Boccaccini, A., (2008). Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of (3HB)/Bioglass\_ composites. *Biomaterials*, 29, 1750-1761
- Mondrago, P., Cortez, N., Vargas, G., (2004). Electrophoretic deposition of hydroxyapatite submicron particles at high voltages. *Mater. Lett.*, 58 (7–8), 1336-1339
- Krause D., Thomas B., Leinenbach C., Eifler D., Minay E.J., Boccaccini A.R., (2006). The electrophoretic deposition of Bioglass\ particles on stainless steel and Nitinol substrates. *Surface & Coatings Technology*, 200, 4835 – 4845
- Radice S., Kern P., Burki G., Michler J., Textor M., (2007). Electrophoretic deposition of zirconia-Bioglass composite coatings for biomedical implants. *J. Biomedical Materials Research, Part A(82A)* (2), 436-444.
- Santillán M.J., Caneiro A., Quaranta N. and Boccaccini A.R., (2008<sup>1</sup>). Electrophoretic deposition of  $\text{La}_{0.6}\text{Sr}_{0.4}\text{Co}_{0.8}\text{Fe}_{0.2}\text{O}_{3-\square}$  cathodes on  $\text{Ce}_{0.9}\text{Gd}_{0.1}\text{O}_{1.95}$  substrates for intermediate temperature solid oxide fuel cell (IT-SOFC). *J. Eur Ceram. Soc*, (in Press).
- Santillán M.J., Membrives F., Quaranta N., Boccaccini A.R., (2008<sup>2</sup>) Characterization of  $\text{TiO}_2$  nanoparticle suspensions for electrophoretic deposition. *J. Nanopart Res.*, 10, 787–793.
- Santillán, M.J., Quaranta, N., Membrives, F., Roether, J.A., Boccaccini, A.R. (2009) Processing and characterization of biocompatible titania Coatings by electrophoretic deposition. *Key Eng. Materials*. (Accepted).
- Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T., (1990). *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 721.
- Moskalewicz, T., Czyrska-Filemonowicz A., Boccaccini, A.R., (2007). Microstructure of nanocrystalline  $\text{TiO}_2$  films produced by electrophoretic deposition on Ti–6Al–7Nb alloy. *Surface & Coatings Techn.*, 201, 7467–7471.
- Gennari, F.C., Pasquevich, D.M., (1999). *J. Am. Ceram. Soc.*, 82, 1915-1921.