

Recubrimientos biocompatibles de Hidroxiapatita-Titania obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

Hortensia Melero Correas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

Doctorado en Ciencia y Tecnología de Materiales

Recubrimientos biocompatibles de
Hidroxiapatita-Titania obtenidos mediante
Proyección Térmica de Alta Velocidad
(HVOF)

Autora: Hortensia Melero Correas

Director: Javier Fernández González

Agradecimientos

Al Dr. Javier Fernández, director de esta tesis, por haberme dado la increíble oportunidad de trabajar estos años en un tema tan interesante.

Al Dr. Josep Maria Guilemany, por haber sabido hacerme sentir parte de la familia CPT.

Al Dr. Joan-Ramon Miguel por su ayuda constante.

A todos los miembros y ex-miembros del CPT, staff, doctores, becarios y alumnos internos, tanto por prestarme siempre su ayuda como por haber creado un ambiente maravilloso que no olvidaré nunca.

Al Dr. Assis Benedetti, por volcarse en nuestros ensayos de corrosión.

A Manel, Javi y Suñol, del taller mecánico, por no poner demasiadas objeciones a mis pedidos siempre urgentes.

A todo el personal de los Serveis Científico-Tècnics de la UB, en especial al grupo de DRX, por su asistencia en los muchos ensayos que hice con ellos.

A la Dra. Natàlia Garcia-Giralt, por “acogerme” en su grupo como una más y no reírse de mí en mis inicios más bien torpes en el mundo de los ensayos biológicos.

A todo el grupo de URFOA-IMIM, por haber sido siempre tan amables conmigo.

A las Dras. Cristina Madrid y Gemma Fargas, por su asesoramiento y ayuda absolutos en nuestras colaboraciones.

| *Hortensia Melero Correas*

Al Dr. José Manuel Gomes por haberme permitido conocer la Universidade do Minho y su grupo, e introducirme en el mundo de la tribología.

A Sérgio, por acompañarme todo el tiempo que estuve en Portugal y hacer mi estancia mucho más agradable.

A los Dres. Armando Salito y Jordi Garcia, por haberme permitido ver de cerca el funcionamiento de una empresa del sector como es Alhenia.

A mis amigos, por aguantarme con más o menos paciencia.

A Tomás, por estar ahí cuando le necesito, tener infinita paciencia con mis rabietas, consolarme cuando procede, y hacerme reír más que nadie.

A mis padres por todo.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Capítulo I. Introducción general..... | 11 |
| I.1. Los biomateriales..... | 11 |
| I.2. Técnicas de obtención de recubrimientos..... | 13 |
| I.2.1. Sol-gel (vía química)..... | 13 |
| I.2.2. Métodos de conversión (vía química o electroquímica)..... | 14 |
| I.2.3. Electroforesis (vía electroquímica)..... | 15 |
| I.2.4. Técnicas de deposición física de vapor –PVD..... | 16 |
| I.2.5. Proyección térmica..... | 16 |
| I.3. Contexto de la tesis..... | 19 |
| I.4. Referencias..... | 22 |
| | |
| Capítulo II. Objetivos de la tesis..... | 27 |
| | |
| Capítulo III. Método experimental..... | 31 |
| III.1. Introducción..... | 31 |
| III.2. Listado de técnicas..... | 31 |
| III.3. Referencias..... | 49 |

| | |
|--|-----------|
| Capítulo IV. Materias primas..... | 51 |
| IV.1. Introducción..... | 51 |
| IV.2. Distribución granulométrica (LS)..... | 51 |
| IV.3. Morfología de las partículas de polvo..... | 53 |
| IV.4. Composición de los polvos..... | 55 |
| IV.5. Fluidez de los polvos de proyección..... | 57 |
| IV.6. Densidad de los polvos..... | 57 |
| IV.7. Conclusiones..... | 58 |
| | |
| Capítulo V. Precedente. Recubrimientos de HAp-TiO₂ obtenidos mediante proyección plasma..... | 59 |
| V.1. Introducción..... | 59 |
| V.2. Condiciones de proyección..... | 60 |
| V.3. Recubrimientos obtenidos..... | 61 |
| V.3.1. Observación de la microestructura de los recubrimientos..... | 61 |
| V.3.2. Rugosidad superficial de los recubrimientos..... | 67 |
| V.3.3. Espesores..... | 68 |
| V.3.4. Identificación de fases presentes en los recubrimientos..... | 69 |
| V.3.5. Adherencias..... | 72 |
| V.3.6. Ensayos de inmersión en fluido fisiológico simulado..... | 73 |

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

| | |
|--------------------------------------|----|
| V.3.7. Ataque con ácido nítrico..... | 74 |
| V.4. Conclusiones..... | 76 |
| V.5. Referencias..... | 76 |

**Capítulo VI. Elección de las condiciones de proyección térmica de alta
velocidad.....79**

| | |
|---|----|
| VI.1. Introducción..... | 79 |
| VI.2. Condiciones de proyección..... | 79 |
| VI.3. Elección del rango de distancias de proyección..... | 81 |
| VI.4. Conclusiones..... | 84 |

**Capítulo VII. Recubrimientos por alta velocidad. Microestructura y estudio
de las fases.....85**

| | |
|---|----|
| VII.1. Introducción..... | 85 |
| VII.2. Microestructura de los recubrimientos obtenidos..... | 85 |
| VII.3. Rugosidad superficial de los recubrimientos..... | 92 |
| VII.4. Espesor de los recubrimientos..... | 92 |
| VII.5. Composición de los recubrimientos..... | 94 |
| VII.5.1. Difracción de rayos X y cálculos de Rietveld..... | 94 |
| VII.5.2. Análisis por EDX y microsonda electrónica..... | 98 |
| VII.5.3. Análisis de Raman..... | 99 |

| | |
|--------------------------------------|-----|
| VII.6. Ataque con ácido nítrico..... | 101 |
| VII.7. Conclusiones..... | 103 |
| VII.8. Referencias..... | 104 |

Capítulo VIII. Estudio de las propiedades mecánicas de los recubrimientos obtenidos mediante HVOF.....105

| | |
|---|-----|
| VIII.1. Introducción..... | 105 |
| VIII.2. Bond strength de los recubrimientos..... | 106 |
| VIII.2.1. Valores de adherencia pre-inmersión..... | 107 |
| VIII.2.2. Valores de adherencia tras inmersión..... | 110 |
| VIII.3. Tenacidad a fractura y scratch test..... | 111 |
| VIII.3.1. Tenacidad a fractura..... | 114 |
| VIII.3.2. Tenacidad a fractura interfacial..... | 117 |
| VIII.3.3. Scratch test..... | 120 |
| VIII.3.4. Tensiones residuales..... | 122 |
| VIII.4. Desgaste de los recubrimientos..... | 124 |
| VIII.5. Conclusiones..... | 132 |
| VIII.6. Referencias..... | 133 |

Capítulo IX. Comportamiento a corrosión.....139

| | |
|-------------------------|-----|
| IX.1. Introducción..... | 139 |
|-------------------------|-----|

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

| | |
|---|------------|
| IX.2. Ensayos de corrosión..... | 140 |
| IX.2.1. Ensayos convencionales..... | 140 |
| IX.2.2. Ensayos de impedancia..... | 146 |
| IX.3. Detalle y consecución del dispositivo a temperatura..... | 167 |
| IX.4. Conclusiones..... | 173 |
| IX.5. Referencias..... | 174 |
| | |
| Capítulo X. Viabilidad biológica en las superficies..... | 177 |
| X.1. Introducción..... | 177 |
| X.2. Ensayos realizados..... | 178 |
| X.2.1. Superficie específica..... | 178 |
| X.2.2. Ensayos in vitro..... | 180 |
| X.3. Otras consideraciones..... | 187 |
| X.3.1. Tensiones superficiales..... | 187 |
| X.3.2. Evolución de la capa de apatita en superficie..... | 190 |
| X.3.3. Estudio por ICP de la concentración de calcio en solución..... | 194 |
| X.4. Conclusiones..... | 196 |
| X.5. Referencias..... | 196 |
| | |
| Capítulo XI. Propuesta de mejora de los recubrimientos de HAp-TiO₂..... | 201 |

| | |
|--|------------|
| XI.1. Introducción..... | 201 |
| XI.2. Estudio de la mejora de la bioactividad del recubrimiento..... | 203 |
| XI.2.1. Ensayos principales realizados..... | 203 |
| XI.2.2. Informaciones complementarias..... | 219 |
| XI.3. Adición de propiedades bactericidas..... | 227 |
| XI.4. Conclusiones..... | 238 |
| XI.5. Referencias..... | 238 |
| Capítulo XII. Conclusiones y perspectivas futuras..... | 245 |
| Anexos..... | 253 |
| Anexo 1..... | 255 |
| Anexo 2..... | 257 |
| Anexo 3..... | 259 |
| Anexo 4..... | 261 |
| Anexo 5..... | 263 |
| Anexo 6..... | 265 |
| Anexo 7..... | 267 |

Capítulo I.

Introducción general

I.1. Los biomateriales

Aunque en la Antigüedad ya se utilizaban biomateriales (véase el empleo de oro, madera, plata, vidrio, etc.) [1,2], fue a partir de la Segunda Guerra Mundial cuando se empezaron a utilizar de modo masivo para el tratamiento de pacientes [3], experimentando un aumento en las últimas décadas en el ámbito de la cirugía con el progresivo envejecimiento de la población [4].

Según la definición de Williams (1990) [5], se consideran biomateriales aquellos materiales de origen natural o sintético que tienen como finalidad conseguir una función específica en el organismo humano, reemplazando o reforzando parcial o totalmente tejidos dañados. Es por tanto necesario que la respuesta por parte del cuerpo sea adecuada; no se puede emplear cualquier material como prótesis, ya que cabe la posibilidad de que el organismo no lo acepte. Es decir, que el requerimiento principal del biomaterial es su biocompatibilidad. No debe ser tóxico, cancerígeno, mutágeno, ni producir irritaciones, infecciones o alergias [6-11]. Exactamente, "la biocompatibilidad se podría interpretar como la aceptabilidad biológica, la correcta interacción de los biomateriales con los tejidos susceptibles de estar en contacto con ellos" según la definición de Williams [5]. Si el material no es biocompatible; es decir, si el organismo no lo acepta, el sistema inmunológico

ataca al cuerpo extraño, pudiendo producir una respuesta local (afecta a la zona que circunda al implante, inflamando los tejidos adyacentes) [6], o bien una respuesta remota (llega a afectar a otros órganos del cuerpo, produciendo infecciones que pueden tener graves consecuencias) [11].

Un ejemplo de clasificación de los biomateriales es la propuesta por la ASTM (American Society for Testing Materials) [12]:

- Aparatos externos: los que están en contacto con las superficies del cuerpo (como pueden ser las prótesis externas)
- Aparatos con comunicación exterior: en comunicación, por ejemplo, con canales naturales internos (catéteres), con tejidos y fluidos...
- Aparatos implantados largo tiempo: en contacto con el hueso, con tejidos y fluidos, con la sangre... (es el caso de las prótesis articulares o las mallas abdominales)

Otra clasificación interesante es la que se basa en la naturaleza del biomaterial, según sea un polímero, un metal, un cerámico o un compuesto [13]. Cada uno de ellos se emplea en la aplicación en la que sus propiedades puedan ser las más adecuadas. Como ejemplo de biomaterial polimérico se pueden citar las mallas de polipropileno para reducir hernias. Estos tipos de biomateriales tienen la ventaja de que, en general, se obtienen con relativa facilidad; en cambio, se deforman mucho y pueden sufrir degradación. Los metales se usan como prótesis de articulaciones varias, o como implantes dentales. Son mucho más resistentes que los polímeros, y también pueden sufrir degradación por la corrosión. Los cerámicos se emplean sobre todo en aplicaciones dentales o como recubrimientos sobre metales para aplicaciones de elevadas cargas; no tienen problemas de biocompatibilidad, y son muy resistentes a la compresión, pero son frágiles. Los biomateriales compuestos

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

se usan por ejemplo en válvulas cardiacas; presentan en general buenas propiedades, pero suelen ser caros y difíciles de fabricar [13].

I.2. Técnicas de obtención de recubrimientos

Existen numerosas formas de depositar recubrimientos, pero para establecer una clasificación se ha optado por la división más sencilla, que es la que se basa en sus características físico-químicas. Algunas de las técnicas de deposición de recubrimientos más empleadas se detallan en las subsecciones que siguen, haciendo especial énfasis en la proyección térmica, que será la utilizada en esta Tesis.

I.2.1. Sol-gel (vía química)

En general, el proceso sol-gel involucra la transición de un sistema desde un “sol” líquido (coloidal) a una fase sólida “gel”. El esquema del proceso y los diferentes productos posibles de obtener se pueden ver en la figura I.1.

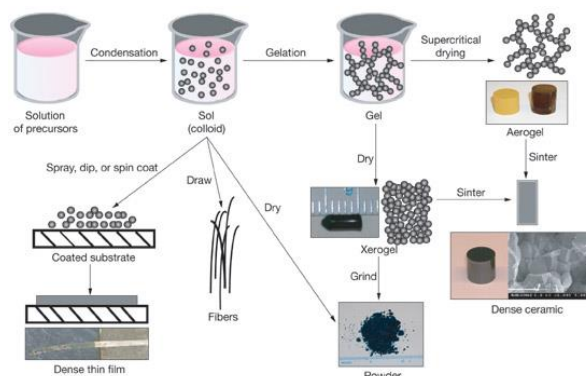


Figura I.1. Esquema del proceso sol-gel [14]

Tras la fabricación del material, éste se puede depositar sobre el sustrato mediante “dip-coating” (por inmersión simple en la suspensión coloidal) o “spin-coating” (por centrifugado para depositar las partículas sobre el sustrato), y se debe densificar después por tratamiento térmico para mejorar sus propiedades mecánicas.

El método sol-gel permite deposiciones de capas finas y una amplia variedad de composiciones para biocerámicos; es sencillo; presenta pocos problemas y económicamente es eficiente [15].

I.2.2. Métodos de conversión: (vía química o electroquímica)

Sea cual sea el método, el proceso es convertir una superficie en otra mediante modificaciones de la original. Fundamentalmente, se pueden dividir en dos: los que implican una oxidación de la superficie (vía electroquímica) y los que no (vía química). Los primeros consisten en la aplicación de una diferencia de potencial de diferente magnitud para provocar la oxidación de una superficie (en este grupo se incluirían el anodizado y la técnica de micro-arc oxidation –MAO); los segundos, en la aplicación sobre la superficie de una solución rica en compuestos de fósforo o cromo (según el tratamiento a aplicar) que reaccionen con la superficie para formar una capa de fosfatos o cromatos (fosfatado o cromado). El rango de composiciones es limitado, pero las adherencias al sustrato son muy elevadas [16].

I.2.3. Electroforesis: (vía electroquímica)

Consiste en formar una suspensión coloidal a un pH determinado, e introducirla entre un ánodo y un cátodo. Según estén las partículas cargadas positiva o negativamente, el sustrato sería ánodo o cátodo, y recibiría las partículas sobre su superficie.

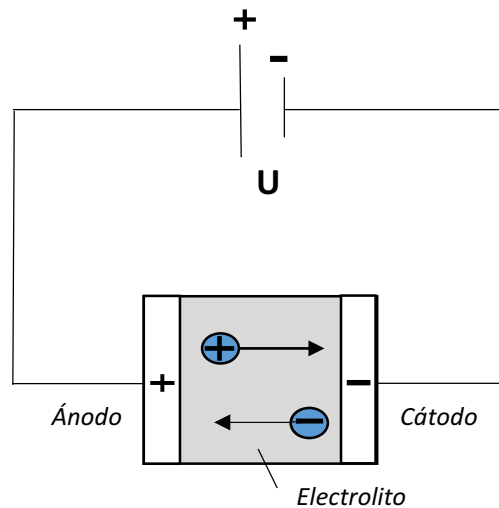


Figura I.2. Esquema del proceso de electroforesis [17]

Tiene la ventaja de tratarse de un método relativamente barato, y de no alterar el material de origen; por otra parte, se trata de recubrimientos sin unión entre las partículas ni entre recubrimiento y sustrato, y por tanto es necesaria una sinterización post-deposición [18].

I.2.4. Técnicas de deposición física de vapor -PVD:

Las técnicas PVD arrancan o evaporan átomos de un “target material” y los depositan sobre un sustrato. Las más comunes son el “sputtering” (en todas sus variantes), la EBPVD (“electron-beam physical vapor deposition”), la PLD (“pulsed-laser deposition”), o la IBAD (“ion-beam assisted deposition”). Al tratarse de átomos que llegan sobre una superficie tras haberse evaporado, muchas veces carecen de la energía suficiente para recombinarse, y por ello suelen tener una estructura amorfa. Es por esta razón que, para obtener buenas adherencias y propiedades mecánicas, es necesario muchas veces un tratamiento térmico de cristalización. Otro inconveniente que puede tener el uso de esta técnica es el calentamiento excesivo del sustrato, que puede llevar a una oxidación del mismo [18].

I.2.5. Proyección térmica

Se trata de la aplicación de energía térmica y/o cinética a partículas que al llegar al sustrato formarán un recubrimiento compacto por agregación de partículas. Según la fuente de energía, la velocidad y la temperatura de las partículas, existen diferentes tipos de proyección térmica. Aquí se detallan los tres más comunes:

Proyección plasma (en cualquier atmósfera)

Esta técnica extrae la energía de una fuente de corriente eléctrica: un impulso eléctrico provoca la formación de un plasma que se expande hacia el exterior por la boquilla de la pistola.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

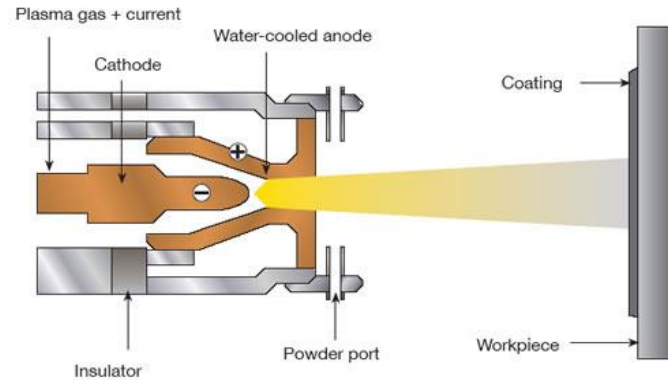


Figura 1.3. Esquema del proceso de proyección plasma [19]

Entre las ventajas de este método se incluyen una alta eficiencia en la deposición, lo cual permite la deposición de espesores importantes de forma rápida. Presenta al mismo tiempo problemas [20], como la degradación de las partículas por la alta temperatura (presencia de fase amorfa), una falta de homogeneidad importante, una adhesión débil del recubrimiento al sustrato, etc.

Proyección a alta velocidad (HVOF)

El principio es similar a la proyección por plasma, pero en este caso la energía se extrae de la reacción química entre un gas combustible (propano, propileno, hidrógeno...) y un gas comburente (oxígeno o aire) dentro de la cámara a elevada presión. Esta elevada presión provoca la expansión de los gases hacia el exterior, creando un haz supersónico que acelera las partículas, manteniéndolas a temperaturas inferiores a las obtenidas en plasma, y por tanto disminuyendo la degradación de las partículas.

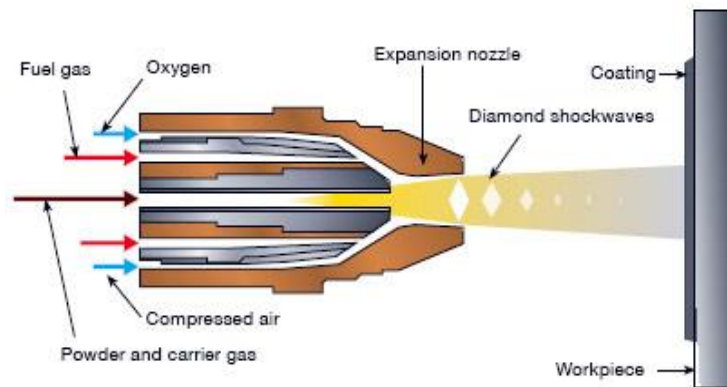


Figura 1.4. Esquema del proceso de proyección por alta velocidad (HVOF) [21]

Las ventajas de este método son las mismas que en el caso de plasma, y la degradación de las partículas es menor [22].

Proyección fría (CGS)

Fundamentalmente, partículas deformables se introducen en un haz de gas a muy alta velocidad y son dirigidas al sustrato, donde impactan y forman un recubrimiento.

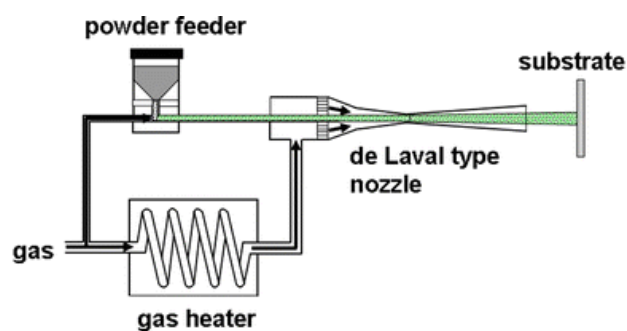


Figura 1.5. Esquema del proceso de proyección fría (CGS) [23]

Se mantienen las ventajas de los otros métodos de proyección térmica, y se evitan algunos inconvenientes, como los derivados de la degradación térmica, mientras que aparecen otros, como la dificultad de proyectar polvos de un material frágil que no puede deformar, como un cerámico [23].

Globalmente, se podría considerar la proyección térmica el método más eficiente para obtener recubrimientos espesos en serie. Es por ello, entre otras cosas, por lo que tiene tanta variedad de aplicaciones, entre las que se encuentran las biológicas.

I.3. Contexto de la tesis

Esta tesis doctoral se centra en los biomateriales para sustitución ósea aplicados en forma de recubrimientos para prótesis articulares. Por ello, en este apartado se detallarán cuáles son, más concretamente, los biomateriales empleados en sustituciones óseas, cómo se realizan los recubrimientos empleados industrialmente, qué problemas tienen, y qué alternativas existen y se han estudiado.

Materiales metálicos

Aunque actualmente se comienza a considerar la posibilidad de emplear implantes de un material polimérico como el PEEK, con propiedades mecánicas muy similares a las del hueso, hoy por hoy siguen siendo los implantes metálicos los que predominan en el mercado para sustituciones importantes de hueso (como es el caso de un implante de cadera).

Algunos de los materiales metálicos implantables más empleados se listan a continuación [24]:

- Aceros inoxidables: Con un contenido en cromo superior al 12%, son muy resistentes a la oxidación. De los diversos tipos de aceros inoxidables, el más empleado en implantes es el austenítico (concretamente, el 316 y el 316L), ya que posee la mayor resistencia a la corrosión.
- Aleaciones base cobalto: En general se trata de aleaciones cromo-cobalto, y cuatro de ellas son las recomendadas por la ASTM para aplicaciones en implantes (F76, F90, F562, F563). Tienen mucha resistencia a la corrosión, pero algunas de ellas no se recomiendan para superficies de rozamiento en prótesis articulares por sus bajas propiedades a desgaste.
- Titanio y aleaciones: Sus propiedades mecánicas (con módulos de Young menores a los de las otras aleaciones) lo convierten en el mejor candidato para sustitución de hueso, además de ser muy resistentes a la corrosión. La aleación más empleada es la Ti-6Al-4V, que es la que mejor combinación de propiedades presenta.

Materiales biocerámicos

Los materiales biocerámicos son la mejor opción para sustitución ósea por su semejanza con la fase mineral del hueso. Se pueden dividir en función de la respuesta del hueso circundante y del tipo de fijación implante-hueso [24]:

- Cerámicas densas casi inertes: la única fijación con el hueso es morfológica en la rugosidad superficial. Un ejemplo es la alúmina.
- Cerámicas porosas: el material base es casi inerte, pero al permitir el crecimiento de hueso dentro de los poros el implante se fija mecánicamente al hueso. Cualquier biocerámico cristalino es susceptible de estar en esta categoría si se induce la formación de poros.

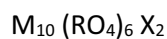
*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- Cerámicas bioactivas: su superficie reacciona y sufre una modificación con el tiempo una vez en condiciones fisiológicas, ésta se considera bioactiva. Tanto los biovidrios como los fosfatos de calcio están en esta categoría, permitiendo una fijación directa (química) entre el hueso y la biocerámica.
- Cerámicas reabsorbibles: se van disolviendo lentamente y permiten la colonización progresiva de ese espacio por el hueso. Ejemplos son el sulfato de calcio o las sales de fosfatos de calcio.

Recubrimientos sobre implantes articulares:

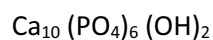
Aunque el TiAlV se utilice ampliamente en implantes articulares, no presenta unas propiedades biológicas óptimas. Aparte de no favorecer la formación de nuevo hueso, existe un riesgo de migración de iones metálicos que puede dañar los tejidos circundantes. Por ello, industrialmente se tiende a recubrir los implantes metálicos con un fosfato de calcio para mejorar sus propiedades biológicas.

Este fosfato de calcio por excelencia es la hidroxiapatita (HAp). Se trata de un compuesto de la familia de las apatitas, con fórmula:



En el caso de la hidroxiapatita la M es Ca^{2+} y la RO_4 es PO_4^{3-} . Asimismo, la X, que da nombre a la apatita, es un OH^- .

Por tanto, la fórmula de la hidroxiapatita de calcio estequiométrica será [25]:



Industrialmente, uno de los recubrimientos más empleados es el de HAp sobre Ti6Al4V mediante proyección térmica, en concreto proyección plasma. Sin embargo, se sabe desde hace años que esta técnica presenta una serie de

problemas derivados de la degradación térmica de la hidroxiapatita, como es el caso de la aparición de fases no deseadas que pueden ser nocivas para los tejidos circundantes [26].

Por ello, muchos estudios se han centrado en encontrar nuevos recubrimientos y técnicas que puedan ser una mejor solución para recubrir prótesis. Un estado del arte de esta problemática se puede leer en el Anexo 1, en el Review titulado “*Recubrimientos bioactivos: hidroxiapatita y titanía*” H Melero, J Fernández, JM Guilemany, publicado en la revista Biomecánica.

I.4. Referencias

- [1] R Daw, S Tonzani, Biomaterials. Nature 462 Editorial (2009) 425.
- [2] N Huebsch, DJ Mooney, Inspiration and application in the evolution of biomaterials. Nature 462 (2009) 426-432.
- [3] E Gentleman, MD Ball, MM Stevens, Biomaterials. En: YLG Verhasselt, BP Mansourian, A Wojtczak, editores. Medical Sciences, vol. 2. Eolss Publishers, Oxford, UK (2009).
- [4] T Rezler. Europe dental bone graft substitutes & other biomaterials market. Strategic Report. iData Research (2013).
- [5] DF Williams. The Williams dictionary of biomaterials. University of Liverpool, Liverpool University Press, Liverpool, UK (1999).
- [6] JM Anderson. Inflammation, wound healing, and the foreign body response. En: BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen, JE Lemons, editores. Biomaterials Science. An introduction to biomaterials in medicine. Academic Press, San Diego, USA (1996).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

[7] RJ Johnson. Immunology and the complement system. En: BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen, JE Lemons, editores. Biomaterials Science. An introduction to biomaterials in medicine. Academic Press, San Diego, USA (1996).

[8] K Merritt. Systemic toxicity and hypersensitivity. En: BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen, JE Lemons, editores. Biomaterials Science. An introduction to biomaterials in medicine. Academic Press, San Diego, USA (1996).

[9] SR Hanson, LA Harker. Blood coagulation and blood-materials interactions. En: BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen, JE Lemons, editores. Biomaterials Science. An introduction to biomaterials in medicine. Academic Press, San Diego, USA (1996).

[10] FJ Schoen. Tumorigenesis and biomaterials. En: BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen, JE Lemons, editores. Biomaterials Science. An introduction to biomaterials in medicine. Academic Press, San Diego, USA (1996).

[11] AG Gristina, PT Naylor. Implant-Associated infection. En: BD Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen, JE Lemons, editores. Biomaterials Science. An introduction to biomaterials in medicine. Academic Press, San Diego, USA (1996).

[12] ASTM F2211-04. Standard classification for tissue engineered medical products (TEMPs).

[13] Course Biomaterials. Faculty of Bioengineering of Utah. <http://www.bioen.utah.edu/faculty/pat/Courses/biomaterials2006/Metals%20and%20Applications%20in%20Orthopedics.pdf>

[14] Novel materials from SolGel Chemistry. Science & Technology. <https://www.llnl.gov/str/May05/Satcher.html>

[15] R Gupta, A Kumar, Bioactive materials for biomedical applications using sol–gel technology. *Biomed. Mater.* 3 (2008)

[16] SR Paital, NB Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Mater. Sci. Eng. R-Rep.* 66 (2009) 1-70.

[17] P Zillig. Übungen im Vortragen mit Demonstrationen - Physikalische Chemie, WS 06/07. Elektrophorese / isoelektrischer Punkt. Didaktik der Chemie / Universität Bayreuth. <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/elektrophorese/elektrophorese.htm>

[18] D Shi, editor. *Introduction to Biomaterials*. Tsinghua University Press, Beijing, China (2006).

[19] Image courtesy of Sulzer Metco. Sulzer-Metco website. www.thermalspray.com/plasma-spray-coatings/

[20] Image courtesy of Sulzer Metco. Sulzer-Metco website. www.thermalspray.com/plasma-spray-coatings/

[21] Image courtesy of Sulzer Metco. Sulzer-Metco website. www.thermalspray.com/hvof-coating/

[22] Image courtesy of Sulzer Metco. Sulzer-Metco website. www.thermalspray.com/hvof-coating/

[23] T Schidmt, H Assadi, F Gartner, H Richter, T Stoltenhoff, H Kreye, T Klassen, From particle acceleration to impact and bonding in cold-spraying. *J. Therm. Spray Technol.* 18 (2009) 794-808.

[24] I Proubasta, J Gil, JA Planell, editores. *Fundamentos de biomecánica y biomateriales*. Ediciones Ergon, Madrid, España (1997).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

[25] Apuntes Biocerámicos. Máster de Ciencia de los Materiales. Universitat Politècnica de Catalunya (2009).

[26] M Gaona, Recubrimientos biocompatibles obtenidos por proyección térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona, España (2007).

Capítulo II.

Objetivos de la tesis

Muchos estudios han dado cuenta de los problemas que presentan los recubrimientos de hidroxiapatita obtenidos por proyección plasma habitualmente empleados en la industria de las prótesis. La bibliografía consultada muestra muchas vías de estudio alternativas para solucionar o reducir el impacto de estos problemas. Para el desarrollo de esta tesis doctoral se ha seguido una vía desarrollada en el Centro de Proyección Térmica y que se fundamenta en dos ideas:

- La sustitución de la proyección plasma por la proyección térmica de alta velocidad, con menores temperaturas alcanzadas y, por tanto, menor degradación térmica. Ya que de acuerdo con la bibliografía uno de los mayores problemas de la proyección plasma es la formación de fases amorfas de rápida disolución por la degradación térmica, que llevan a una falta completa de adherencia entre recubrimiento y sustrato, el objetivo del cambio de técnica es obtener un menor porcentaje de fases amorfas, consiguiendo una mejor adhesión del recubrimiento al sustrato.
- Combinar la HAp con un cierto porcentaje de TiO₂, con propiedades mecánicas más adecuadas para esta aplicación, con la idea de obtener recubrimientos con mejores propiedades mecánicas. Anteriormente se habían obtenido buenos resultados con recubrimientos con una

combinación inicial de polvo de 60%HAp-40%TiO₂. En este caso, se ha intentado reducir el porcentaje de TiO₂ para, manteniendo en la medida de lo posible una mejora de las propiedades mecánicas, obtener unas propiedades biológicas más similares a las de la hidroxiapatita. O, dicho de otro modo, encontrar el balance más adecuado entre propiedades mecánicas y biológicas. Por ello, se ha tomado una combinación inicial de polvo de 80%HAp-20%TiO₂.

El objetivo de la tesis es, por tanto, la obtención de recubrimientos 80%HAp-20%TiO₂ con la mejor combinación de propiedades mecánicas y biológicas. Para ello se deberá caracterizar completamente estos recubrimientos con combinación 80-20, comparándolos si procede con recubrimientos de otras composiciones, para poder concluir si efectivamente suponen una mejora respecto a los recubrimientos de HAp obtenidos por proyección plasma.

El estudio se ha dividido en varias secciones:

- Análisis y caracterización de los polvos de partida, así como de su mezcla.
- Estudio del precedente (proyección plasma). Sirve para evaluar, a modo introductorio e informativo, qué recubrimientos se obtendrían en caso de emplear la proyección plasma, habitualmente utilizada en la industria, para obtener recubrimientos con el mismo polvo de partida. Se caracterizará la microestructura, las fases presentes y la adherencia, interpretando los resultados obtenidos.
- Obtención de los recubrimientos con el polvo de partida mediante proyección térmica de alta velocidad (elección de las condiciones de proyección).
- Estudio de la microestructura y fases de los recubrimientos obtenidos.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- Estudio de las propiedades mecánicas. Pre- y post- inmersión en fluido fisiológico en el caso de los ensayos de adherencia, pre-inmersión para el resto.
- Estudio de la corrosión de estos recubrimientos.
- Estudio de la viabilidad biológica en superficie.
- Propuesta de vías de mejora que puedan constituir una puerta abierta a futuros estudios, una vez vistas las ventajas y limitaciones de estos recubrimientos.

Capítulo III.

Método experimental

III.1. Introducción

En este capítulo se han listado todas las técnicas empleadas a lo largo de la tesis. Para mayor claridad, se ha preferido un orden alfabético de las mismas a un orden temático o cronológico, ya que muchas de ellas se emplean indistintamente en varios puntos de la tesis. Así, la estructura empleada permitirá una localización rápida de la técnica buscada.

III.2. Listado de técnicas

Análisis de imagen: Realizado para medir espesores. El software utilizado es el Matrox Inspector. Por cada caso estudiado, se realiza un mínimo de 20 medidas a lo largo de todo el espesor del recubrimiento, para 3 secciones diferentes.

Ángulo de contacto: La técnica del ángulo de contacto se emplea para calcular tensiones superficiales. El método estándar es el llamado “sessile drop”, que se basa en medir el ángulo de contacto característico que forma una gota depositada en una superficie (Figura III.1.). Para ello se empleó agua

bidestilada grado MilliQ, depositando 4-6 gotas ($3\mu\text{L}$) por muestra, y dos muestras por caso analizado.

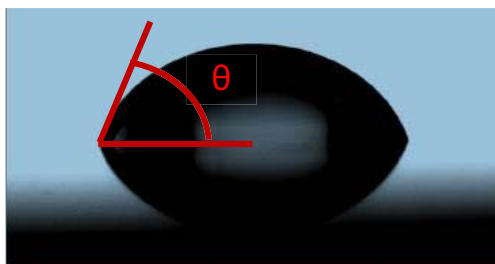


Figura III.1. Ángulo de contacto medido por "sessile drop" [1]

Para recubrimientos en los que resulta imposible o contraindicado medir la tensión superficial mediante "sessile drop", la opción más indicada es el método de "captive bubble". En lugar de ser una gota lo que se deposita en superficie, es una burbuja de aire lo que se deposita bajo el recubrimiento (éste está invertido) inmerso en una fase líquida (Figura III.2.). El ángulo de contacto sería la diferencia entre 180° y el ángulo medido entre la burbuja y la superficie. En este caso, como fase líquida se empleó igualmente agua bidestilada, depositando 4-6 burbujas de $3\mu\text{L}$ bajo cada muestra, y empleando 2 muestras por caso analizado.



Figura III.2. Ángulo de contacto medido por "captive bubble" [1]

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

El equipo empleado es un goniómetro Contact Angle system OCA15plus (Dataphysics, Germany), con un software acoplado SCA20 (Dataphysics, Germany).

Bacterias (ensayos con): Se consideraron tres bacterias: E. coli CECT405 y P. aeruginosa CECT116 como Gram-negativas, y S. aureus CECT 239 como Gram-positiva, obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo. Tras cultivar las bacterias una noche en medio LB a 37 ° C con aireación, éstas fueron diluidas en medio fresco, y se incubaron hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 DO a 600 nm (a mitad de la fase logarítmica de crecimiento). Las células se centrifugaron (5 min; 3000 xg), se lavaron dos veces con solución de Ringer ¼, y se ajustaron a una densidad final de 0,6-0,7 OD (600 nm) también con solución de Ringer ¼. Todas las muestras se vertieron en un vial con 1 ml de una dilución 1:10 de la suspensión bacteriana en solución Ringer ¼. La concentración inicial de bacterias en el vial era de aproximadamente 5×10^7 CFU/ml. Para asegurarse de que cualquier disminución en el número de bacterias era debida a la exposición a diferentes muestras, se incluyó un control con células bacterianas a la misma concentración inicial en solución Ringer ¼ sin ninguna muestra. Las suspensiones bacterianas se incubaron durante 4 horas a 37 ° C y 200 rpm. Se tomaron muestras al inicio (0 h) y después de 2 y 4 h. Después de diluciones apropiadas, las muestras se colocaron en placas en agar LB y se incubaron a 37°C. Las bacterias viables se monitorizaron mediante el recuento del número de unidades formadoras de colonias (CFU) de la dilución apropiada. Para testar el efecto antibacteriano por difusión en placas, se prepararon suspensiones de las bacterias y se dispersaron en medio sólido (placas de agar LB), y las diferentes muestras se

colocaron en diferentes zonas de la placa de agar. Después de la incubación durante una noche a 37°C, se determinó la presencia o no de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano.

Ball-on-Flat tests: Se realizaron tests recíprocos de ball-on-flat con un tribómetro Plint TE67/R (Phoenix Tribology Ltd., UK) de acuerdo con la norma ASTM G133-05 (2010) [2], empleando como mínimo dos muestras diferentes y realizando cuatro ensayos por carga y caso. La duración del test es de 1h, y se empleó una esfera de alúmina de 10mm de diámetro. Todos los ensayos se realizaron en condiciones fisiológicas (Hanks a 37°C), a una frecuencia de 1Hz y con una amplitud de recorrido de 12 mm. Se graficó el coeficiente de fricción y se calculó también el coeficiente de desgaste k ($\text{mm}^3/\text{N.m}$) de acuerdo con la ecuación (III.1.):

$$K = V/S.P \qquad \text{Eq. (III.1.)}$$

donde V es el volumen perdido en mm^3 , S la distancia total de deslizamiento (43,2 m) y P la carga normal aplicada (N).

Biocompatibilidad (ensayos in vitro de): Los osteoblastos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Nacher et al. [3], y se realizó en estudio de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983, y con la aprobación de comité ético de Hospital del Mar-IMIM. Hueso trabecular obtenido tras reemplazos de prótesis de rodilla, con la aprobación del paciente, se limpió y colocó en placas de Petri con medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, con 4,5 g/L de glucosa, y suplementado con 10% FBS, piruvato (1 mM), glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/mL), estreptomycin (100 UI/mL) y ácido ascórbico (100 mg/ml) de

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Invitrogen), a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y cambiando el medio regularmente hasta la confluencia de las células. Los materiales a estudiar, tras su esterilización por rayos gamma a 25kGy, se colocaron en placas de poliestireno de 24 pocillos (Nunc A/S) con solución Hanks durante una noche, y tras retirarla se sembraron los pocillos con unas 20000 células para los ensayos de viabilidad y proliferación, y con 50000 para los ensayos de diferenciación. El medio empleado fue el citado más arriba, pero se suplementó con vitaminas K y D a 10⁻⁸ M para los ensayos de diferenciación. Antes de los diferentes ensayos celulares, cada muestra se colocó sola en un pocillo nuevo para asegurar que los resultados correspondían únicamente a la muestra analizada. Asimismo, se emplearon controles positivos (células sobre una superficie de PS) y negativos (materiales sin células). Los valores obtenidos con éstas últimas se restaron de los valores absolutos obtenidos con los materiales sembrados.

Se realizaron diferentes ensayos para evaluar el comportamiento celular de los materiales. Dos de ellos fueron ensayos de viabilidad celular: MTT (kit colorimétrico, Roche Diagnostics GmbH), basado en la transformación de la sal de tetrazolio a formazán por parte de las células activas, y que da una medida de la cantidad de células vivas en superficie midiendo la intensidad del color con un espectrofotómetro; y fluorescencia (LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit for mammalian cells, Invitrogen), que permite luego por simple observación de la superficie con un microscopio óptico Leica DM1000 localizar la distribución de las células vivas (citoplasma verde) y muertas (núcleo rojo). Por otro lado, se evaluó la proliferación celular con un kit colorimétrico de BrdU (Roche Diagnostics GmbH), basado en la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) en lugar de timidina en el ADN de las células que se están replicando, lo cual da una medida del número de células que están sufriendo este proceso a través de la intensidad del color.

También se realizaron medidas de diferenciación osteoblástica a partir de la medida de la actividad de la fosfatasa alcalina (kit colorimétrico ensayo ALP, Abcam), con un test basado en la transformación del p-nitrofenil (pNPP) a p-nitrofenol por parte de la ALP, que permite la medida de la actividad de la ALP a través de la intensidad del color. Se tomó un número de muestras de ocho para cada ensayo de los citados excepto para el de fluorescencia, en el que se tomaron dos muestras por caso.

Por último, se analizó la morfología celular mediante la fijación de las células en la superficie del recubrimiento con una solución al 2,5% de glutaraldehído en tampón cacodilato durante dos horas, seguida de la conservación en tampón cacodilato hasta su deshidratación progresiva con alcohol y un secado por punto crítico. Tras ello, las superficies se observaron por microscopía electrónica de barrido.

Bond strength tests (ensayos de adherencia): Para estudiar la adherencia de los recubrimientos, se ha seguido la norma ASTM C633-01(2008) [4]. Los ensayos se han realizado a tracción con la máquina universal de ensayos SERVOSIS, modelo ME-402/10, a una velocidad de $0,020 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta rotura.

Corrosión (ensayos de): Se realizaron dos tipos de ensayos:

- Ensayos electroquímicos convencionales: Potencial de circuito abierto (E_{oc}) durante 24h, polarizaciones potenciodinámicas desde $-0,200 \text{ V}/E_{oc}$ hasta $+2,0 \text{ V}/E_{oc}$ a $5 \text{ mV}/\text{s}$, polarizaciones cíclicas (CP) desde $-0,200 \text{ V}/E_{corr}$ hasta $+2,0 \text{ V}/E_{corr}$ y de Nuevo hasta 1V bajo la E_{corr} a $5\text{mV}/\text{s}$. Todos se realizaron con una celda electroquímica convencional de tres electrodos de 80mL de volumen, con un área de

*Recubrimientos biocompatibles de HA_p-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

superficie expuesta a la solución de 0,74cm². El electrolito es una solución Hanks comercial (Sigma Chemical Co., pH≈7,4) con y sin albúmina (Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma Chemical Co. con pH≈7,4) a una concentración de 4,2g/L. Como referencia se usó un electrodo de Ag/AgCl/KCl3mol/L, conectado a la solución de trabajo con un capilar Luggin, y usando como electrodo auxiliar un hilo de Pt.

- Ensayos de impedancia: Se realizaron ensayos de EIS, manteniendo previamente la muestra en contacto con la solución (la misma que para los ensayos convencionales) durante 24h. Los diagramas de EIS se tomaron para tiempos de hasta 30 días, aplicando una perturbación sinusoidal a 10mV a la Eoc, de entre 1.10⁵ a 1.10⁻³, y guardando 10 puntos por década de frecuencia. Estas medidas se realizaron con un potencióstato-galvanostato Ivium, modelo VERTEX, equipado con un módulo de impedancia. Para el análisis cuantitativo, los datos de EIS fueron ajustados usando circuitos equivalentes (EEC) con el programa Z-view®. Antes de ello, los datos experimentales fueron validados con la transformación de Kramers-Kronig, y solo los datos incluidos en el rango validado de frecuencias se usaron para hacer el ajuste por EEC.

Todos los ensayos se hicieron por triplicado a 36°C.

Densidad (medida de): Se realiza en el caso de los polvos de partida. Se pueden considerar tres cálculos de densidad:

- La densidad aparente: la norma ASTM B-212-89 [5] dictamina que para calcular este valor se debe enrasar un embudo Hall de 25 cm³, y pesar el volumen de polvo contenido en el mismo. Tras ello, obtener la relación masa sobre volumen es directo.

- La densidad vibrada: la norma ASTM B-527-85 [6] indica que para calcular la densidad vibrada se debe introducir una masa conocida de polvo en una probeta graduada, e introducir ésta a su vez en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Tras ello, se puede medir el nuevo volumen, y con él y la masa previamente conocida, calcular este valor de densidad.
- La densidad real: la norma ASTM B-238 [7] aclara que la densidad real se determina introduciendo en un matraz de 25 mL una masa conocida del polvo considerado. Tras pesar el conjunto matraz+polvo, se introduce en el matraz un líquido de elevada mojabilidad (baja tensión superficial) que impregne bien todo el polvo. Conociendo la densidad del disolvente (metanol en este caso), se puede calcular, mediante la ecuación siguiente, la densidad real:

$$\rho_{real} = \frac{M_p}{25 - \frac{(M_T - M_p)}{\rho_L}} \quad \text{Ec. III.2.}$$

Donde M_p es la masa del polvo, M_T la masa del disolvente más el polvo, y ρ_L la densidad del disolvente a la temperatura de trabajo.

Difracción de rayos X (DRX): Tanto el polvo inicial como los recubrimientos se analizaron por DRX. El equipo empleado es un SIEMENS D500 tipo Bragg-Brentano $\theta/2\theta$ que utiliza una radiación Cu $K_{\alpha 1+2}$, con $\alpha_1=1,54060$ y $\alpha_2=1,54443$, a 40kV y a una corriente de 30 mA. Los difractogramas obtenidos se analizan con ayuda de un software que dispone de patrones, con ayuda de los cuales se interpretan los resultados y se identifican las diferentes fases presentes. En el caso de la cuantificación de fases, se empleó la técnica Rietveld, arrancando los recubrimientos del sustrato, moliéndolos y mezclándolos con un 30% de Al_2O_3 como referencia. Las medidas de tensiones

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

residuales se tomaron con los recubrimientos as-sprayed, con un equipo PANalytical X'Pert PRO MRD, que utiliza la misma radiación que para los ensayos convencionales, a 45kV y a una corriente de 40mA. Se empleó el método de $\sin^2\psi$, en modo “ ψ -tilt”, midiendo a intervalos de 0,15 en $\sin^2\psi$, entre 0 y 0,9, tanto en la rama positiva como en la negativa; todo esto a 4 ángulos de rotación respecto a la normal a la superficie: $\Phi=0, 45, 90$ i 135° , empleando para todo ello el pico principal del rutilo.

Dureza (medida de): Empleada como una propiedad a relacionar con la tenacidad a fractura o la microestructura, se midió mediante indentaciones Vickers, con un equipo Matsuzawa MXT-CX a 300gf.

Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX): Se empleó la técnica de microanálisis por EDX para tomar una medida semi-cuantitativa de los porcentajes en peso de la superficie analizada o para realizar un mapeo de la superficie considerada y localizar la distribución de los diferentes elementos sobre ella. El equipo empleado es un detector Quantax, de Bruker.

Espectroscopía de plasma (ICP-OES): Se realizaron ensayos mediante la técnica de espectroscopía de plasma para evaluar la concentración de iones Ca^{2+} en una solución de Hanks tras varios días de inmersión de los recubrimientos estudiados. El equipo utilizado ha sido un ICP-OES Perkin Elmer OPTIMA3200RL en condiciones estándar. Se trató de una medida semi-cuantitativa, con un blanco de ácido nítrico al 1% y un patrón de 10ppm de los elementos analizados en ácido nítrico al 1%, sobre una dilución 1 a 5 de las muestras.

Espectroscopía infrarroja (IR): Se realizaron análisis por espectroscopía infrarroja sobre las superficies para estudiar los grupos funcionales presentes. El equipo empleado fue un Thermo SCIENTIFIC NICOLET iN10 MX de reflexión, con un detector MCT. El resultado es un promedio de ocho medidas en un mapa de 2x2mm, y se emplea una abertura de 100 micras, un step size de 100 micras, una resolución espectral de 4 cm^{-1} y un rango espectral de 4000 a 675 cm^{-1} .

Espectroscopía Raman: Se realizaron análisis de espectroscopía Raman para clarificar las fases presentes en las superficies. El equipo empleado fue un equipo Raman Jobin Yvon T64000. Se realizaron medidas en cuatro puntos de dos muestras por caso analizado. En cada punto se realizaron dos medidas: un barrido a altas longitudes de onda, de 750 a 1340 cm^{-1} , para localizar las fases derivadas de la hidroxiapatita; y otro a bajas longitudes de onda, de 70 a 710 cm^{-1} , para localizar las fases derivadas del óxido de titanio.

Estadística: Los resultados obtenidos para los diferentes ensayos (con n variable según el ensayo considerado) se analizaron para evaluar si entre los diferentes casos considerados existían significativas. ANOVA, a través del software Minitab, se empleó para ello. En las Figuras correspondientes, la existencia de diferencias significativas entre casos se marca con un asterisco entre los casos analizados, o con un asterisco encima de una columna de datos si ese caso tiene diferencias significativas con todos los demás (con un intervalo de confianza del 95%).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Fluidez (medida de): Para determinar la fluidez de los polvos de partida se ha seguido la norma ASTM B-213-30 [8], que establece el uso de un embudo metálico Hall (de menor diámetro de orificio) para polvos con buena fluidez y de un embudo Carney (de mayor diámetro de orificio) para polvos con peor fluidez. En ambos casos se pesan 50 gramos de polvo y se introducen en el embudo considerado obturando el orificio de salida. Una vez todo el polvo dentro, se destapa el orificio y se cronometra el tiempo que tarda en salir todo el polvo, calculando así una velocidad media de fluidez del polvo.

Granulometría láser (LS): Se emplea para estudiar la distribución granulométrica de los polvos de partida. El equipo de difracción láser utilizado es un modelo Beckman Coulter LS 13320. Este equipo emplea un láser con una potencia de 5mW y una longitud de onda de 750 nm, que permite la detección de partículas con un diámetro aparente máximo de entre 200nm y 2mm.

Previamente al ensayo, el polvo se dispersó en un vaso con acetona, de manera que cuando la dispersión se introdujera en el equipo, no contuviera aglomeraciones de partículas de polvo que pudieran falsear los resultados.



Figura III.3. Equipo de granulometría láser empleado

Inmersión en ácido nítrico: Las inmersiones de las secciones transversales en ácido nítrico, para localizar la fase amorfa de los recubrimientos, se realizaron durante 5 segundos en una solución de ácido nítrico al 2%.

Inmersión en solución Hanks: Las inmersiones en solución Hanks se realizaron en todos los casos introduciendo el recipiente en un baño termostático para mantener su temperatura estabilizada a 37°C.

Microscopía confocal: Se empleó un microscopio confocal modelo Leica DCM3D, que permitió, junto con los softwares acoplados LeicaScan y LeicaMap, el análisis dimensional de las superficies analizadas, ya sea para calcular volúmenes perdidos tras ensayos de desgaste o superficies específicas.

Microscopía electrónica de barrido: Toda caracterización microestructural se realizó con un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-5310, que dispone de un detector JEOL de electrones secundarios que permite trabajar con una resolución horizontal de 4nm. La captura y tratamiento de imágenes se hace con el programa SEMafore. El voltaje empleado en todos los casos es de 20kV, y la distancia de trabajo de 20mm.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*



Figura III.4. Equipo de microscopía electrónica empleado

Microsonda electrónica: Se realizaron algunos ensayos con microsonda electrónica para evaluar la composición elemental de algunas zonas de la sección transversal de los recubrimientos. El equipo empleado fue una Microsonda Cameca SX-50, y se analizaron 10 puntos por caso estudiado, recubriendo previamente la muestra analizada.

Preparación previa a la proyección: Los sustratos empleados son de Ti6Al4V, con tres formas.

- probetas cilíndricas de 1 pulgada (2,54 cm) de diámetro por 1cm de altura para el estudio de adherencias.
- probetas planas, de 5x5mm y 1mm de altura para ensayos celulares o bacterianos.
- probetas planas rectangulares de medidas 50x20x5 mm para el resto de estudios.

Antes de la proyección, todos los sustratos se desengrasaron por inmersión durante 10 minutos en un baño de acetona bajo la acción de ultrasonidos. Tras ello, se procedió a granallar las superficies a proyectar con corindón (Al₂O₃)

grado 24 con una presión de 5,5 bar, manteniendo siempre las superficies a un ángulo de 45° respecto a la vertical, para evitar que las partículas de corindón queden incrustadas en la superficie. El objetivo perseguido con ello es que la rugosidad superficial Ra sea superior a 4-5 μm , para asegurar que el recubrimiento queda adherido en superficie.

Preparación para caracterización microestructural: Para el caso de secciones transversales, el primer paso para examinar la microestructura es cortar las probetas (planas) con una cortadora de precisión. Una vez cortadas, se deben embutir, dejando hacia el exterior la cara a estudiar. Se emplea una resina fría EpoFix de Struers (resina epoxi). Para ello, se mezclan cinco partes de resina por una de endurecedor (en peso). Para minimizar las porosidades que se forman al solidificar este tipo de resina, se introducen las probetas en una campana de vacío, que permite hacer el vacío las primeras horas de curado.



Figura III.5. Campana de vacío y probetas obtenidas tras la embutición

Las probetas resultantes se desbastaron con discos de SiC de una granulometría hasta 1200 y agua, en una desbastadora de disco modelo RotoPol-21 de Struers; tras ello, se pulieron con una suspensión de sílica

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

coloidal (no con suspensión de diamante ya que no se obtenían un buen pulido).



Figura III.6. Desbastadora de disco empleada

Tanto para las superficies libres como transversales (en las recubiertas al menos), al tratarse de un material no conductor que se carga fácilmente por la acción del haz de electrones del microscopio electrónico, todas las muestras observadas por SEM se recubren de una capa de oro muy fina mediante la técnica de “sputtering”.



Figura III.7. Equipo de sputtering empleado

Perfilometría: Empleada para calcular la rugosidad media de las superficies. En este caso, el equipo utilizado es un perfilómetro MITUTOYO SURFTTEST 301.



Figura III.8. Perfilómetro de contacto empleado

La medida se hace a partir del deslizamiento horizontal de una punta de diamante sobre la superficie. El desplazamiento total es de 4 mm, haciéndose en cinco tramos de 0,8mm, y al adaptar la punta su movimiento a la superficie, el relieve de ésta queda registrado. Como valor comparativo de rugosidad, se ha tomado el valor medio de Ra (media aritmética de las desviaciones del perfil de rugosidad respecto a la línea media). Esta medida se ha hecho en 12 puntos repartidos homogéneamente por toda la superficie de la probeta para cada muestra.

Proyección por HVOF: El sistema de proyección por alta velocidad empleado en este caso ha sido un equipo Diamond Jet Hybrid de Sulzer-Metco, que trabaja con oxígeno como comburente y propileno o hidrógeno como combustible (equipo DJ2700 y DJH-2600), respectivamente. Puede alcanzar

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

temperaturas de llama de 2860°C y velocidades de gas de 1370 m.s⁻¹. Utiliza nitrógeno como gas portador de polvo (de la tolva a la salida de la pistola).

Los componentes del equipo son la tolva, donde se almacena el polvo y desde donde se introduce en la pistola; un microprocesador que la controla (tasa de alimentación, etc.); una consola para controlar el conjunto del equipo; un brazo robótico ABB programable, con 6 ejes de movimiento, donde se sitúa la pistola; y la pistola en sí, desde donde se expanden los gases. Esta cámara de combustión y el cañón de salida son refrigerados con la ayuda de un circuito de refrigeración por agua. La pistola sólo dispone de un inyector de polvo, y el cañón tiene forma de doble cono (invertido) para proporcionar más velocidad a las partículas.

Proyección por plasma atmosférico: El equipo empleado para la proyección plasma (atmosférica) es un modelo A-3000 S de PLASMA TECHNIK, con una potencia máxima de 55kW y voltajes de 70-80 V. Las partes que componen el equipo son una consola de control, una fuente de alimentación, un sistema de dosificación de gases, una tolva volumétrica para alimentación del polvo, un sistema de refrigeración con agua y una pistola de proyección. Ésta última es un modelo PLASMA TECHNIK F4-MB con dos inyectores de polvo, y posee un cátodo cilíndrico-cónico con la punta de ThO₂ y un ánodo tubular refrigerado con agua. Los gases se proyectan siguiendo la dirección longitudinal entre ambos electrodos y, al pasar entre ellos, donde se forma el arco eléctrico, se disocian formando un plasma. El polvo se inyecta a la salida de la pistola perpendicularmente al haz de plasma, y, al poseer dos inyectores, se pueden proyectar dos polvos a la vez.

Scratch test: La adhesión de los recubrimientos al sustrato se midió también por el ensayo de rayado o “single-point scratch technique” (ASTM C1624-05 [9]). Los tests se realizaron con un aparato de rayado CSM-Revetest a una velocidad constante de 10 mm/min, con un increment progresivo de la fuerza normal desde 1 a 140 N. La carga crítica de rayado o “critical scratch load” (L_c) es la que causa el fallo adhesivo del recubrimiento. Los caminos de rayado se examinaron por microscopía confocal. Cinco replicas se realizaron en tres muestras diferentes por caso estudiado.

Tenacidad a fractura (medida de): Se midió tanto la tenacidad a fractura a mitad del recubrimiento, por indentaciones Vickers (VIF), como la tenacidad a fractura interfacial (IIF), que también emplea este tipo de indentaciones. La primera necesita primero del cálculo del modulo de Young mediante indentaciones Knoop, a partir de la Eq. (III.3.) [10].

$$\frac{b'}{a'} = \frac{b}{a} - \alpha \frac{H_k}{E} \quad \text{Eq. (III.3.)}$$

Donde b' and a' son las dimensiones de las diagonals Knoop tras recuperación elástica, b/a es un valor conocido de 1/7.11 que corresponde a la geometría del indentador y α es una constante con valor 0.45. H_k se considera la dureza medida por indentaciones Knoop.

Tras la obtención del modulo de Young, se aplica la ecuación de Anstis [11], Eq. (III.4.).

$$K_c = 0.016 \sqrt{\frac{E}{H}} \left[\frac{P}{c^{3/2}} \right] \quad \text{Eq. (III.4.)}$$

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Donde P es la carga aplicada, c la traza en la superficie de la grieta medida desde el centro de la indentación, E el modulo de Young y H la dureza medida por indentación Vickers.

Para la tenacidad a fractura interfacial, se utilizó el método de Becher et al. [12], en el que se considera que la descohesión interfacial se evalúa utilizando grietas generadas por indentaciones Vickers a varios ángulos de incidencia, respetando un ratio longitud de grieta que intersecta respecto a longitud de grieta nominal de 0,5. Los materiales más frágiles presentarán descohesión con ángulos cercanos a 90°C.

Todas las indentaciones se realizaron a 300 gf, con el microdurómetro Matsuzawa MXT-CX.

III.3. Referencias:

[1] F Thomsen, Practical contact angle measurement. Kruss Technical Note TN314e (2008)

[2] ASTM G133-05 (2010) Standard Test Method for linearly reciprocating ball-on-flat sliding wear.

[3] M Nacher, J Aubia, S Serrano, ML Mariñoso, J Hernández, J Bosch, A Díez, JM Puig, J Lloveras, Effect of cyclosporine A on normal human osteoblasts in vitro. Bone Miner. 26 (1994) 231-243.

[4] ASTM C633-01(2008) Standard test method for adhesion or cohesion strength of thermal spray coatings.

[5] ASTM B-212-09 Standard Test Method for Apparent density of Free-Flowing Metal Powders using the Hall Flowmeter Funnel.

[6] ASTM B-527-93 Standard Test Method for Determination of Tap Density of Metallic Powders and Compounds.

[7] ASTM B-962-08 Standard Test Method for Density of Compacted or Sintered Powder Metallurgy (PM) Products using Archimedes' Principle.

[8] ASTM B-213-03 Standard Test Method for Flow Rate of Metal Powders.

[9] ASTM C1624-05 (2010) Standard test method for Adhesion Strength and Mechanical Failure modes of Ceramic Coatings by Quantitative Single Point Scratch Testing.

[10] BR Lawn, AG Evans, DB Marshall, Elastic/Plastic indentation damage in ceramics: the median/radial crack system. *J. Am. Ceram. Soc.* 63 (1980) 574-581.

[11] GR Anstis, P Chantikul, BR Lawn, DB Marshall. A critical evaluation of indentation techniques for measuring fracture toughness: I, direct crack measurements. *J. Am. Ceram. Soc.* 64 (1981) 533-538.

[12] PF Becher, EY Sun, CH Hsueh, KB Alexander, SL Hwang, SB Waters, CG Westmoreland, Debonding of interfaces between beta-silicon nitride whiskers and Si-Al-Y oxynitride glasses. *Acta Mater.* 44 (1996) 3881-3893.

Capítulo IV.

Materias primas.

IV.1. Introducción

Ya que para la totalidad de las proyecciones de la tesis, ya sea por plasma o alta velocidad, el polvo de partida es el mismo (salvo que se varíen los respectivos porcentajes), se ha considerado conveniente hacer un capítulo aparte sobre su caracterización.

El polvo de partida es una mezcla mecánica de polvo de 80% en masa de HAp, proporcionado por Plasma Biotall Ltd., y 20% en masa de TiO₂, proporcionado por Sulzer-Metco. Se ha evaluado la distribución granulométrica, morfología del polvo, composición, fluidez y densidades.

IV.2. Distribución granulométrica (LS)

Polvo de HAp

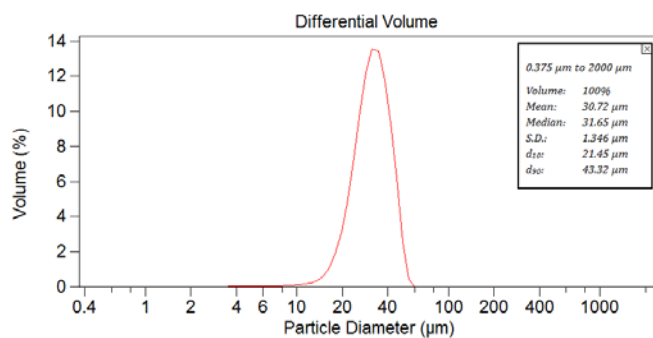


Figura IV.1. Distribución granulométrica del polvo de HAP

Una curva ejemplo de la distribución granulométrica obtenida se puede ver en la Figura IV.1. El d_{50} de la distribución es de 31 μm , con una fracción nula de partículas menores de 4 μm . Prácticamente todo el polvo se encuentra entre 20 y 50 micras, lo cual hace que se tenga una distribución de partículas apropiada para la proyección térmica, con ausencia de finos.

Polvo de TiO_2

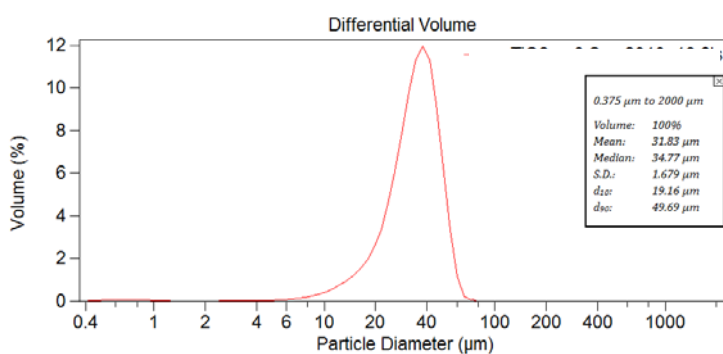


Figura IV.2. Distribución granulométrica del polvo de TiO_2

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

El tamaño de partícula obtenido para este polvo (Figura IV.2.) es similar al de la hidroxiapatita. El d50 es de 32 μm , con alrededor de 0,5% de partículas con un tamaño inferior a 1 μm .

Comparando ambas distribuciones, se puede observar que el tamaño aparente de las partículas es similar para ambos polvos, lo cual es positivo a la hora de proyectarlos conjuntamente, ya que se evitarán problemas adicionales como la progresiva separación de los dos polvos en la tolva durante la proyección, con lo que se obtendrían recubrimientos no homogéneos.

IV.3. Morfología de las partículas de polvo

La morfología de las partículas se ha estudiado vía SEM, tanto en superficie libre como en sección transversal.

Polvo de HAp

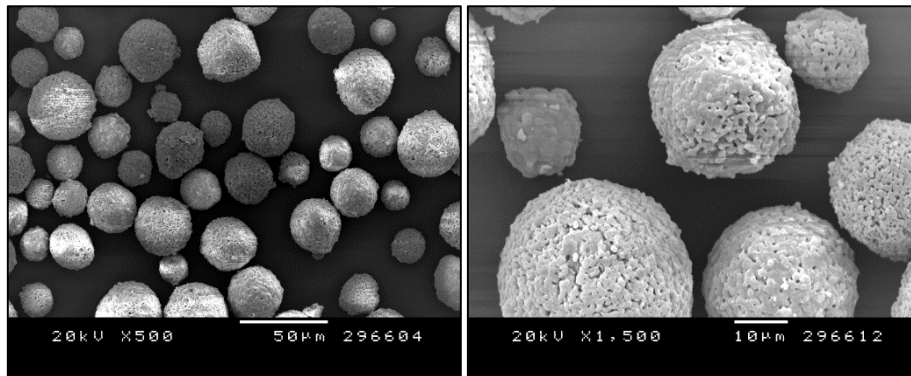


Figura IV.3. Superficie libre del polvo de HAp

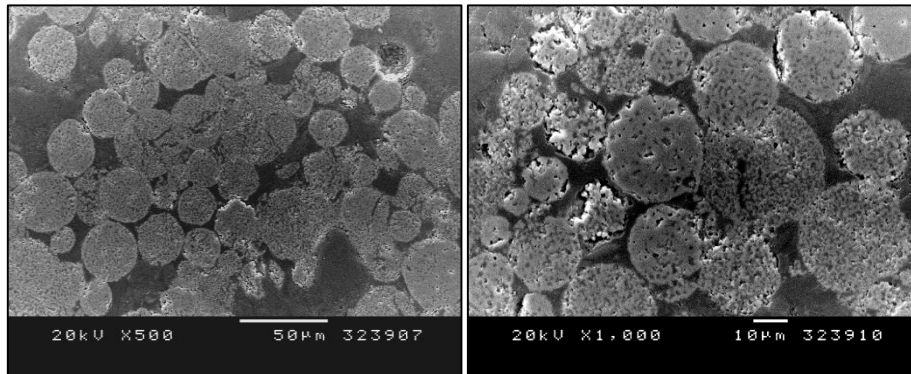


Figura IV.4. Sección transversal del polvo de HAp

El análisis por microscopía electrónica permite ver que se trata de partículas fundamentalmente esféricas, con tamaños que se ajustan a los encontrados en el apartado de granulometría (Figura IV.3.). En la sección transversal (Figura IV.4.) se observa que el polvo de HAp no es un polvo totalmente compacto, sino que tiene una porosidad intrínseca al proceso atomización.

Polvo de TiO₂

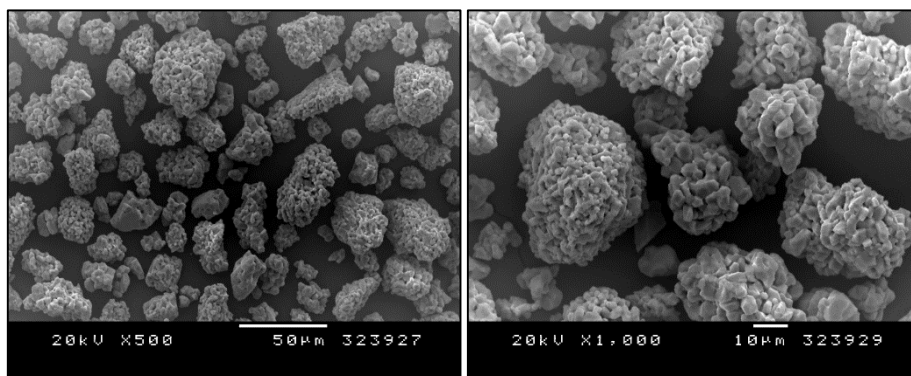


Figura IV.5. Superficie libre del polvo de TiO₂

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

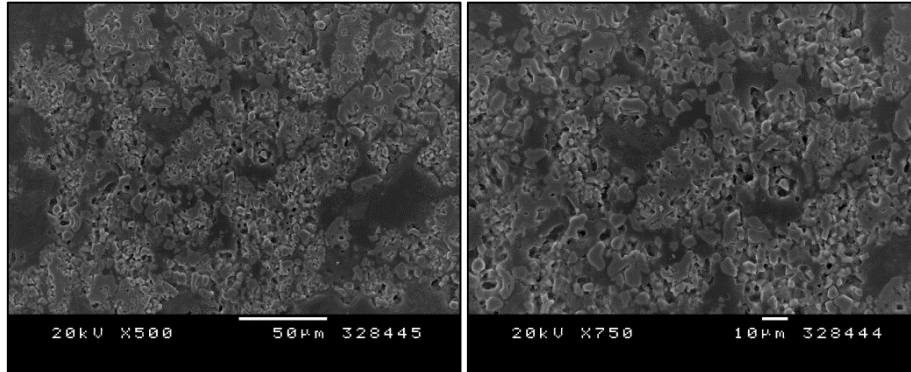


Figura IV.6. Sección transversal del polvo de TiO₂

El polvo de titania muestra una morfología irregular (Figura IV.5.), lo cual podría hacerle tener, por sí solo, menos fluidez. Sin embargo, al estar mezclado como fase minoritaria con la hidroxiapatita, es poco probable que la morfología afecte a la hora de proyectar la mezcla. En cuanto al tamaño de partícula aparente, a pesar de no ser esférico, se corresponde con el encontrado en los ensayos de granulometría. La estructura de las partículas, que se puede ver en la sección transversal (Figura IV.6.) es muy porosa. Por todo ello se puede deducir que el proceso de producción de las partículas es un “sintered” o sinterizado.

IV.4. Composición de los polvos

Las composiciones del polvo suministradas por el proveedor se muestran en la Tabla IV.1..

| | Composición mayoritaria | Elementos minoritarios y/o trazas |
|------------------|-----------------------------|---|
| HAp | Hidroxiapatita (cristalina) | As, Cd, Hg, Pb < 1 ppm |
| TiO ₂ | Rutilo (cristalino) | Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , Fe ₂ O ₃ , CaO, MgO < 0,1 % |

Tabla IV.1. Composición de los polvos según proveedor

Para verificar si estos polvos tenían efectivamente como fases mayoritarias las citadas (hidroxiapatita y rutilo), los recubrimientos se sometieron a una difracción de rayos X que dio como resultado el espectro de la Figura IV.7..

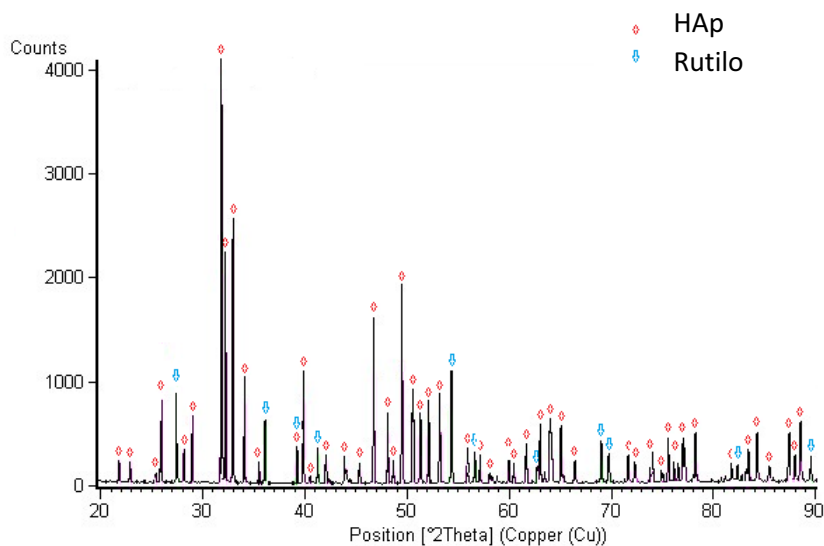


Figura IV.7. DRX de la mezcla de polvos de partida

La estrechez de los picos indica que se trata de dos polvos cristalinos. Las únicas fases detectables por DRX son la hidroxiapatita estequiométrica y la titanía en fase rutilo. No se han encontrado fosfatos o subproductos de la HAp, así como tampoco otras fases de la titanía.

IV.5. Fluidez de los polvos de proyección

Los resultados de los ensayos de fluidez han permitido observar que ni el polvo de HAp ni el de TiO₂ fluyen a través del embudo de Carney o de Hall. A pesar de ello, aunque sería aconsejable que mostraran una mejor fluidez, se trata de un ensayo cualitativo que no es asimilable a las condiciones de proyección, ya que son muchos los polvos que no fluyen a través de estos embudos pero que a presión y temperatura no presentan problemas de fluidez.

IV.6. Densidad de los polvos

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IV.2..

| | $\rho_{\text{aparente}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$ | $\rho_{\text{vibrada}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$ | $\rho_{\text{real}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$ |
|------------------------------|--|---|--|
| HAp | 1,036 | 1,263 | 3,001 |
| TiO ₂ | 1,622 | 1,978 | 4,011 |
| HAp+TiO ₂ exp. | 1,100 | 1,375 | 3,027 |
| HAp+TiO ₂ teórico | 1,153 | 1,406 | 3,203 |

Tabla IV.2. Densidades de los polvos

Como se puede ver en la Tabla IV.2., existen ciertas diferencias en la densidad de los dos polvos. Esta diferencia se debe a la estructura interna de las partículas, muy porosas en ambos casos. Esta diferencia de densidad hace pensar en la posible existencia de problemas de diferente fluidez o compactación de los polvos dentro de la tolva. A pesar de ello, se ha hecho el cálculo de la densidad de la mezcla tras varios días de almacenamiento en

reposo y, por tanto, compactación espontánea en el recipiente. Los valores se aproximan a los teóricos, así que estas diferencias no tendrían por qué representar un problema.

IV.7. Conclusiones

Ambos polvos son válidos para una proyección térmica conjunta, ya que el uso de presión y de un “carrier gas” permite que un polvo que no fluye en condiciones estándar se pueda proyectar sin problemas. La poca diferencia entre las densidades, así como el hecho de que el polvo irregular sea minoritario y vaya arrastrado por las partículas de HAp, esféricas, garantizan que esta irregularidad no supondrá un problema a la hora de la proyección. Asimismo, han quedado claras las fases iniciales (hidroxiapatita y rutilo cristalinos), lo cual permitirá una comparación con las fases resultantes una vez proyectada esta mezcla de polvos.

Capítulo V.

Precedente. Recubrimientos de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Plasma

V.1. Introducción

La técnica de proyección térmica por plasma sigue siendo la más empleada en la industria de recubrimientos para prótesis, si bien presenta serias limitaciones por la degradación térmica resultante de las elevadas temperaturas [1]. Aunque en general se emplea la proyección plasma a vacío, que presenta ventajas respecto a la atmosférica (interfaces más limpias, mayores eficiencias de deposición, menores tensiones residuales, entre otras) [2], en esta tesis se han realizado recubrimientos por proyección térmica de plasma atmosférico dado que no se dispone del equipo que permite obtener vacío, y se han utilizado como referencia de cara a comparar los obtenidos posteriormente mediante otra técnica. El capítulo se estructurará en varias partes, las más importantes de las cuáles son caracterización microestructural, identificación de fases y medida de adherencias.

V.2. Condiciones de proyección

Las condiciones empleadas se han escogido a partir de óptimos obtenidos en trabajos similares realizados previamente en el Centor de Proyección Térmica [3], y se detallan en la Tabla V.1..

| | Caso 1 | Caso2 | Caso 3 |
|---------------------------------------|----------------|-------|--------|
| Gas primario Ar (l/min) | 40 | 40 | 47,5 |
| Gas secundario H ₂ (l/min) | 12 | 12 | 13 |
| Gas transportador Ar (l/min) | 3,5 | | |
| Velocidad transversal pistola (mm/s) | 500 | 1000 | 1000 |
| Número de capas | 9 | 18 | 18 |
| Intensidad (A) | 600 | | |
| Distancia (mm) | 90-110-130-150 | | |

Tabla V.1. Condiciones de proyección por plasma

Al estar ya acotadas, por estudios previos, las condiciones de proyección, se han hecho pequeñas variaciones para seleccionar tres condiciones concretas y analizarlas. Los casos 1 y 2 presentan los mismos caudales de gases, variando el número de capas y la velocidad transversal de la pistola, y por tanto el espesor por capa. Para el caso 3 se ha tomado otra combinación de caudales de gas primario y secundario. Aunque éste último caso presenta el mismo número de capas y velocidad transversal de la pistola que el caso 2, la velocidad de las partículas ha aumentado respecto a él, por la mayor cuantía de los caudales de Ar y H₂. En cuanto a la temperatura teórica del haz, será mayor la del caso 3, por la mayor relación H₂/Ar, lo que implica una mayor potencia del plasma [4] y por tanto una mayor capacidad de transferencia

térmica del haz. Aun así, al aumentar al mismo tiempo la velocidad de las partículas y, por tanto, disminuir el tiempo de residencia de las mismas en el haz de proyección, este efecto puede no ser tan notable ya que se compensa en parte.

V.3. Recubrimientos obtenidos

V.3.1. Observación de la microestructura de los recubrimientos (SEM)

En las Figuras V.1. a V.12. se expone un conjunto de micrografías representativas de cada uno de los recubrimientos obtenidos para cada distancia estudiada.

Caso 1

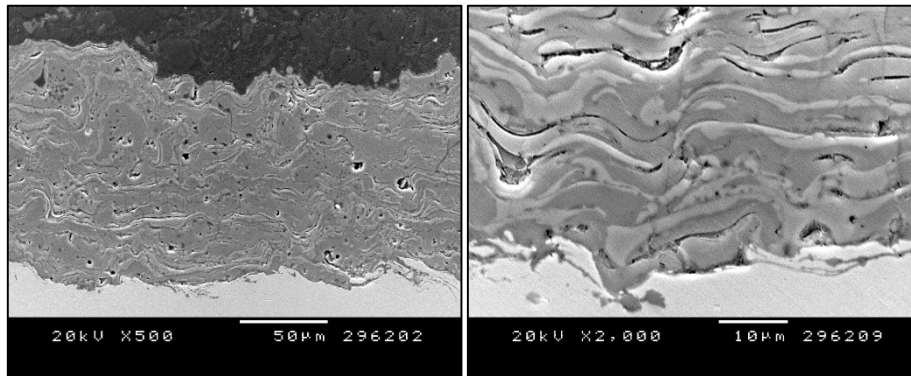


Figura V.1. Sección transversal del caso 1, a 90 mm, con detalle de la interfase

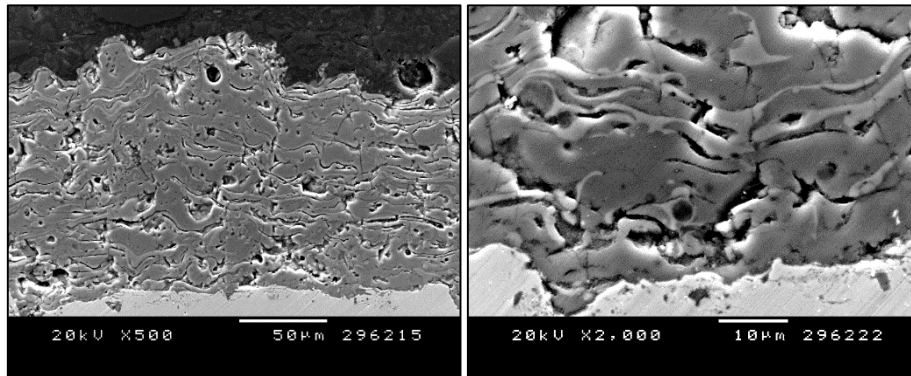


Figura V.2. Sección transversal del caso 1, a 110 mm, con detalle de la interfase

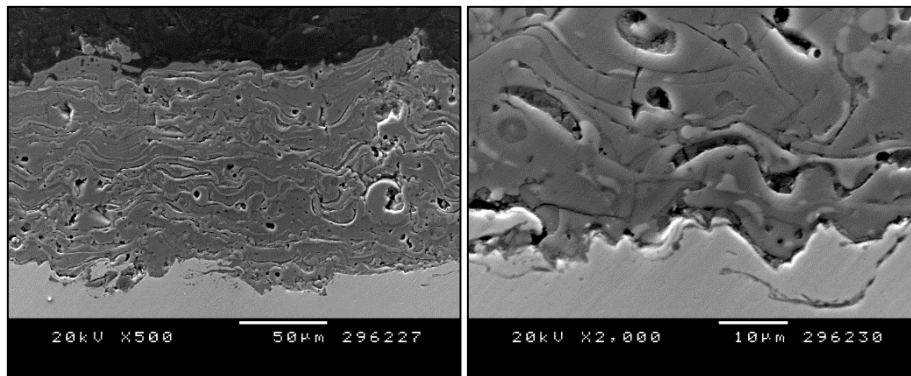


Figura V.3. Sección transversal del caso 1, a 130 mm, con detalle de la interfase

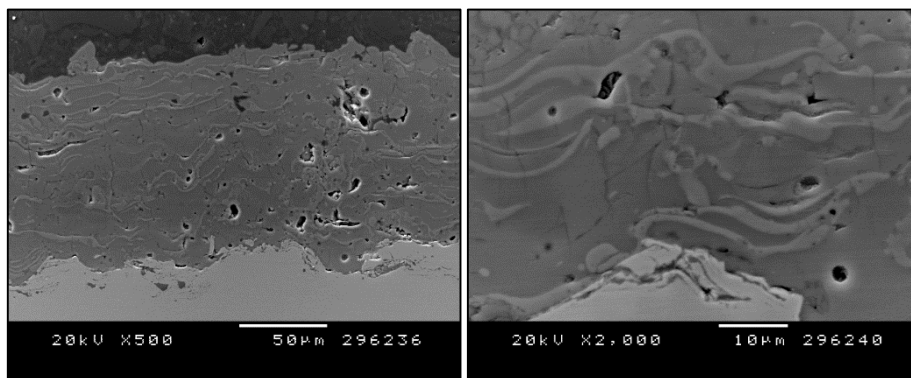


Figura V.4. Sección transversal del caso 1, a 150 mm, con detalle de la interfase

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Los recubrimientos obtenidos para el caso 1 presentan descohesión para distancias bajas. En cambio, para 150mm, la microestructura tiene menos defectos, y las capas están mucho más cohesionadas entre ellas. Asimismo, la interfaz recubrimiento-sustrato es continua y sin defectos, al contrario de los que ocurre a bajas distancias.

Caso 2

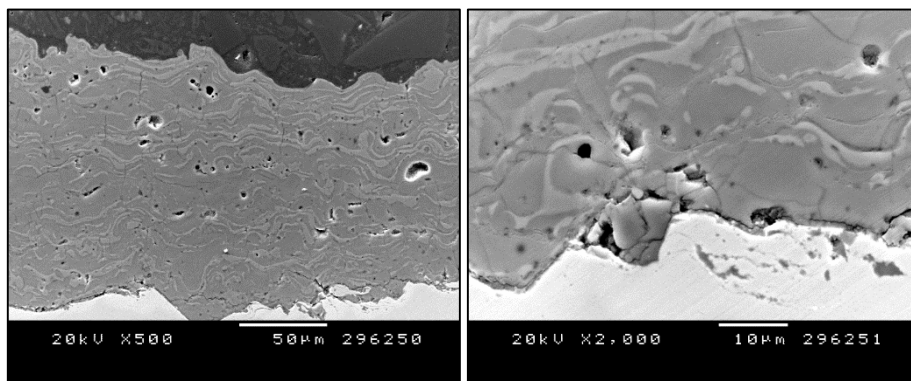


Figura V.5. Sección transversal del caso 2, a 90 mm, con detalle de la interfase

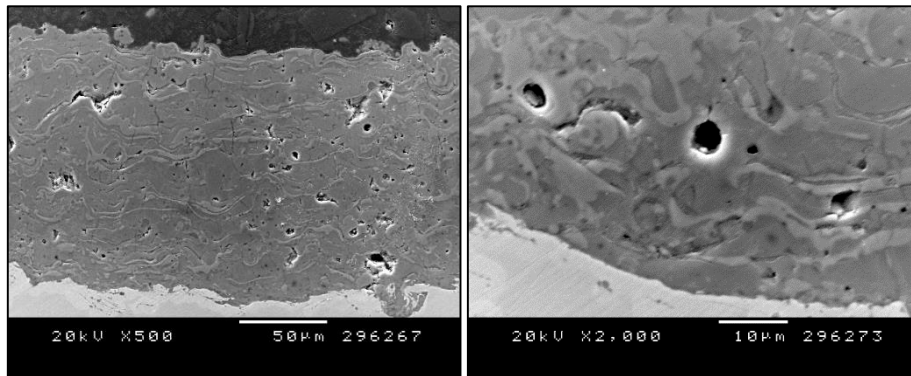


Figura V.6. Sección transversal del caso 2, a 110 mm, con detalle de la interfase

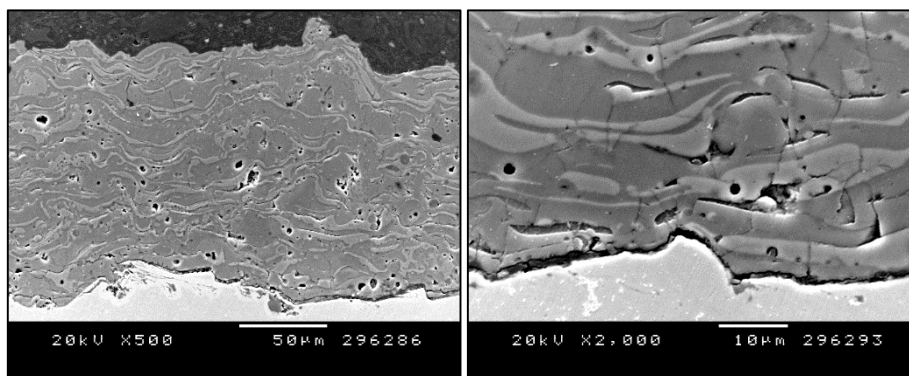


Figura V.7. Sección transversal del caso 2, a 130 mm, con detalle de la interfase

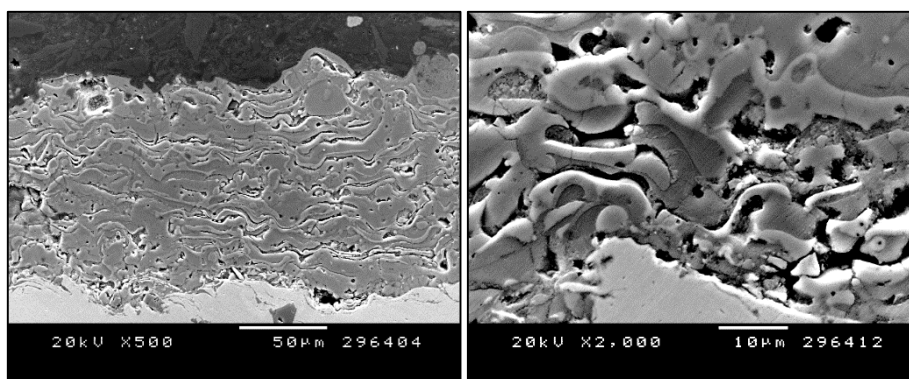


Figura V.8. Sección transversal del caso 2, a 150 mm, con detalle de la interfase

El caso 2 presenta también descohesiones, en este caso para distancias mayores que en el caso 1. A 90 y 110 mm, el recubrimiento es compacto y la interfase sustrato-recubrimiento buena. En cambio, a 130 y, especialmente, a 150 mm, el óptimo parece haber quedado atrás, y los recubrimientos tienen una microestructura con más defectos (poros y descohesión).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Caso 3

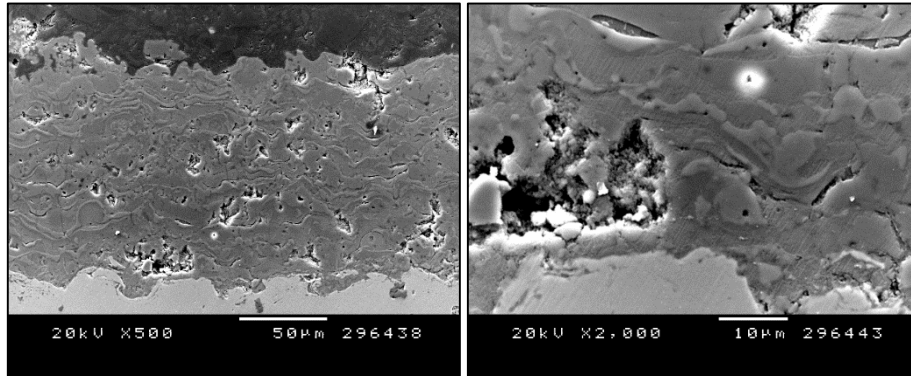


Figura V.9. Sección transversal del caso 3, a 90 mm, con detalle de la interfase

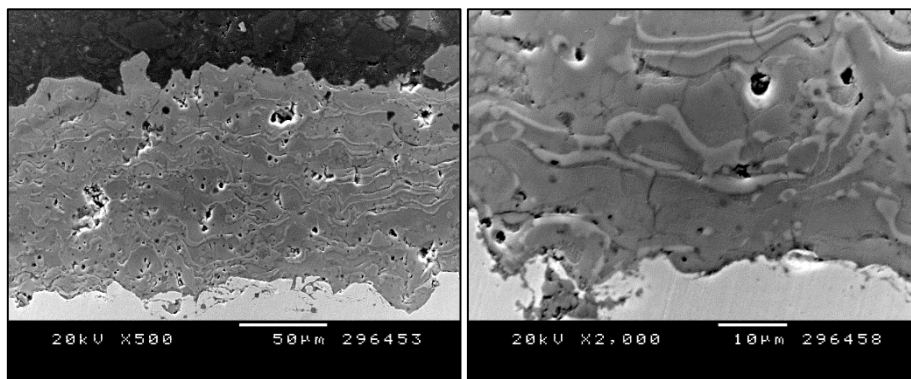


Figura V.10. Sección transversal del caso 3, a 110 mm, con detalle de la interfase

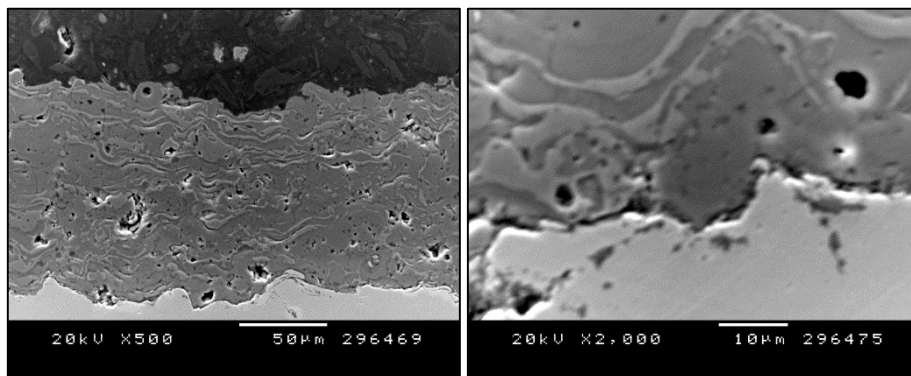


Figura V.11. Sección transversal del caso 3, a 130 mm, con detalle de la interfase

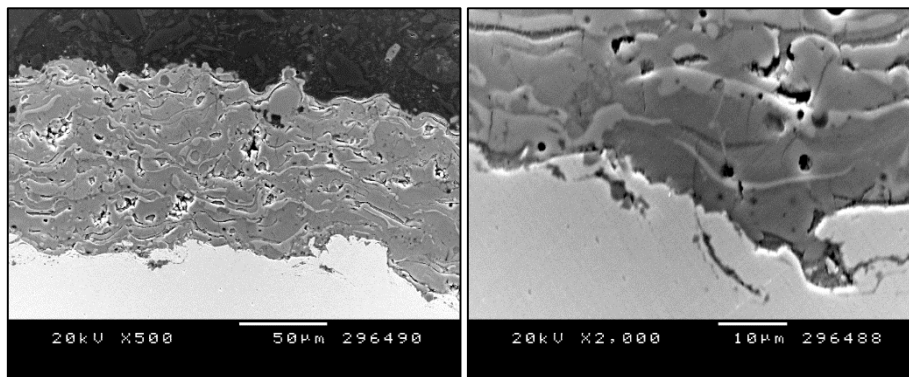


Figura V.12. Sección transversal del caso 3, a 150 mm, con detalle de la interfase

En términos generales, el caso 3 presenta poca descohesión, lo cual podría estar relacionado con la mayor temperatura del plasma. El óptimo para este caso, desde el punto de vista estructural, parece encontrarse en las distancias de 110 y 130 mm. Para la distancia de 90 mm, se producen arranques muy fácilmente en el proceso de preparación, posiblemente porque se trata de la distancia a la que se alcanza mayor temperatura y mayor presencia de fases amorfas en la interfaz por la degradación térmica, y para la distancia de 150 mm, se detecta más descohesión entre capas que en las otras distancias, posiblemente por el mayor enfriamiento de las partículas al estar más tiempo en el aire, que resulta excesivo para asegurar la cohesión entre capas.

En ninguno de los tres casos se observan partículas sin fundir. La temperatura alcanzada, por tanto, ha sido suficiente para asegurar la fusión prácticamente total del material de partida.

Si se comparan los casos entre ellos, el caso 1 presenta, en general, más descohesión, exceptuando la distancia mayor. Dado que la velocidad de

**Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)**

desplazamiento de la pistola sobre la superficie de la probeta es menor que en el caso 2, a la segunda pasada, las partículas que se han proyectado en la pasada anterior han tenido más tiempo de enfriar. De ahí que en el caso 1 las partículas se adhieran peor a la capa anterior, y la eficiencia en la deposición de las partículas sea menor que en el caso 2. Por ello, también, este último caso presenta mayores espesores de recubrimiento que el caso 1 (los valores exactos se pueden ver en el apartado V.3.3.). El caso 3 es el que presenta menores espesores de recubrimiento, mayor cohesión entre capas y mayor porosidad (valor cualitativo) de los tres casos. Esto se debe a la combinación de unas condiciones más energéticas y una mayor velocidad de pistola respecto a los casos 1 y 2. Las partículas llegan más fundidas y a mayor velocidad, con lo cual se adhieren mejor, se comprimen más por su mayor velocidad y temperatura, lo que facilita la conformabilidad, produciendo una menor descohesión. Sin embargo, se ha encontrado una mayor porosidad por el enfriamiento rápido de las partículas proyectadas.

V.3.2. Rugosidad superficial de los recubrimientos

Los resultados promedio de rugosidad, medidos por perfilometría, se muestran en la Tabla V.2..

| | Caso 1 (μm) | Caso 2 (μm) | Caso 3 (μm) |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 90 mm | 5,7 \pm 0,5 | 6,0 \pm 0,1 | 5,9 \pm 0,3 |
| 110 mm | 5,6 \pm 0,6 | 4,6 \pm 0,3 | 4,9 \pm 0,3 |
| 130 mm | 4,7 \pm 0,3 | 5,4 \pm 0,5 | 4,9 \pm 0,3 |
| 150 mm | 4,8 \pm 0,5 | 5,6 \pm 0,1 | 5,3 \pm 0,7 |

Tabla V.2. Valores de rugosidad promedio (R_a)

Se observa un cierto patrón en la distribución de las rugosidades obtenidas para los distintos casos y distancias, en el cual las menores rugosidades coinciden con las mejores microestructuras (y, tal y como se comprueba con los ensayos de “bond strength”, las mejores adherencias). Esto se podría atribuir a la combinación entre velocidad y temperatura. La velocidad de las partículas alcanza su máximo a la mínima distancia y disminuye progresivamente, pero la temperatura de partícula alcanza su máximo tras un tiempo de vuelo, que varía según las condiciones de proyección. El hecho de que se encuentren mejores microestructuras y adherencia para una distancia determinada en cada caso indica que esta distancia corresponderá a la de mayor temperatura de partícula, que según lo encontrado en este apartado es a la que se obtienen menores rugosidades. Esto puede deberse a que, al haber llegado a su óptimo de fusión, las partículas lleguen más ablandadas y se expandan más sobre la superficie (menor rugosidad), mientras que a otras distancias la temperatura alcanzada no permita tanto ablandamiento de la partícula y esta mantenga más su forma que en el caso de mayor temperatura (mayor rugosidad)..

V.3.3. Espesores

Los espesores promedio, calculados por análisis de imagen, se muestran en la Tabla V.3..

**Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)**

| | Caso 1 (μm) | Caso 2 (μm) | Caso 3 (μm) |
|--------|-------------|-------------|-------------|
| 90 mm | 104 ± 1 | 125 ± 11 | 107 ± 11 |
| 110 mm | 107 ± 14 | 122 ± 8 | 106 ± 12 |
| 130 mm | 108 ± 9 | 118 ± 10 | 97 ± 9 |
| 150 mm | 103 ± 7 | 112 ± 10 | 81 ± 8 |

Tabla V.3. Valores de espesor promedio

En el caso de los espesores se puede detectar una tendencia análoga a la de la rugosidad, especialmente en los caso 2 y 3. En el caso 1, en cambio, no se detectan diferencias entre las distancias. En los casos 2 y 3 los espesores mayores se obtienen a menores distancias, lo cual concuerda con la teoría expuesta previamente en la que, para estos casos, se alcanza el óptimo de fusión a menores distancias, de ahí que las partículas tiendan a adherirse más y se forme un recubrimiento más espeso para distancias cortas.

V.3.4. Identificación de fases presentes en los recubrimientos

Se ha realizado una difracción de rayos X para todos los recubrimientos estudiados. Teniendo en cuenta que las diferencias entre distancias no se aprecian en los difractogramas, se muestra únicamente un difractograma por caso, el correspondiente a la distancia que, de acuerdo con las micrografías era la mejor para cada caso (150 mm para el Caso 1, 110 para los casos 2 y 3), en las Figuras V.13-15.

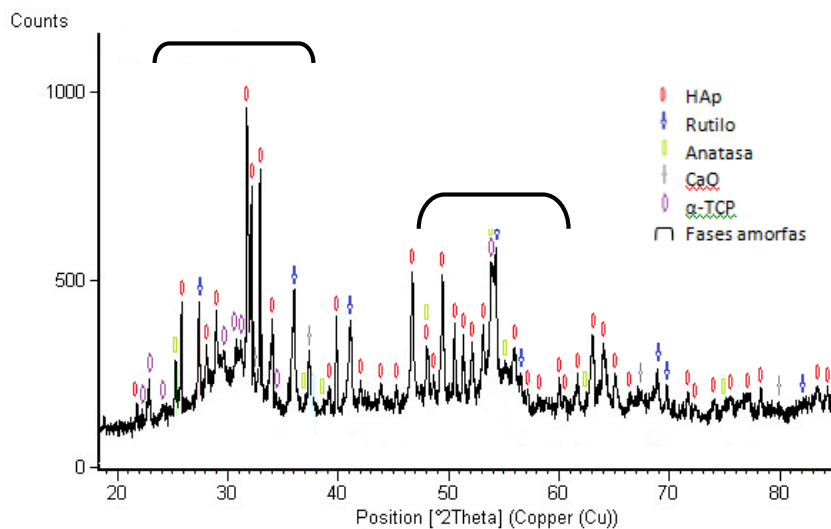


Figura V.13. Difractograma de un recubrimiento del caso 1, 150 mm

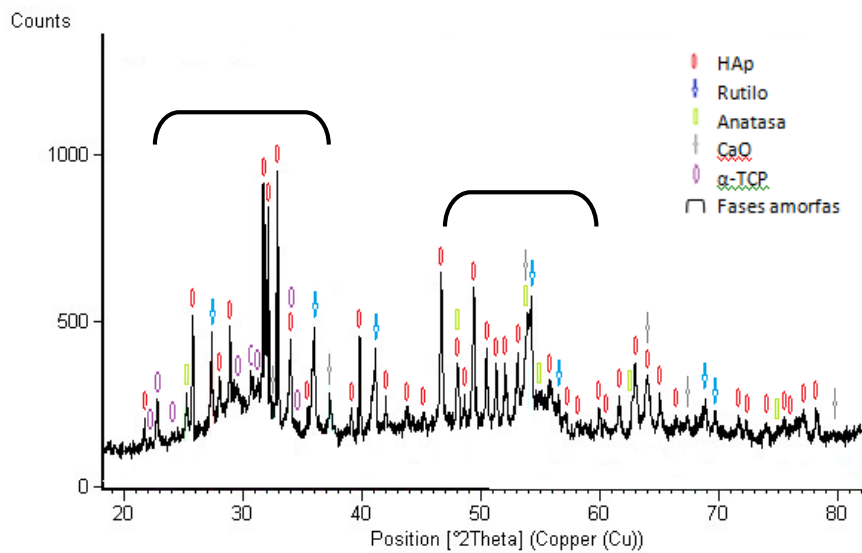


Figura V.14. Difractograma de un recubrimiento del caso 2, 110 mm

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

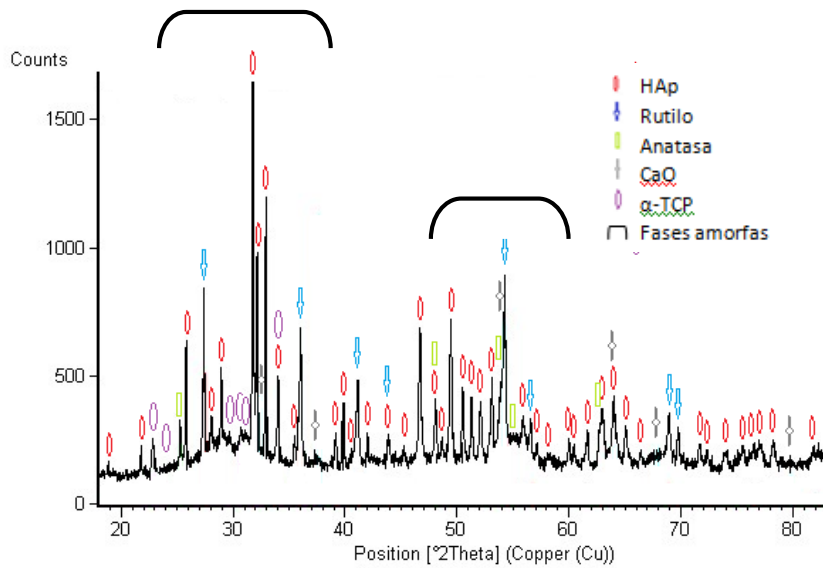


Figura V.15. Difractograma de un recubrimiento del caso 3, 110 mm

No hay diferencias entre los tres casos. Hidroxiapatita y rutilo continúan siendo las fases mayoritarias, derivadas del polvo de partida, pero además se ha formado un fosfato tricálcico α y una pequeña proporción de anatasa. Además se aprecia la presencia de óxido de calcio, lo cual constituye un problema, tanto por los efectos nocivos que éste puede tener en el cuerpo humano [5] como por su velocidad de disolución contribuyendo a la descohesión del recubrimiento [6]. Asimismo, se pueden apreciar bandas anchas en los picos de difracción debidas a la formación de fases amorfas, tanto por parte de la hidroxiapatita (en torno al pico principal de la misma), como por parte del rutilo (también en torno a su pico principal), que son las que llevarán a una rápida disolución de la interfaz del recubrimiento y su consecuente descohesión en condiciones fisiológicas [7].

V.3.5. Adherencias

Los valores de adherencia se han obtenido mediante “bond strength test”. Al igual que para los espectros de difracción de rayos X, únicamente se han listado los valores de los recubrimientos que, a partir del análisis de las micrografías y los respectivos ensayos de bond strength test, se revelaban como los mejores de cada caso (150 mm para el caso 1, y 110 mm para los casos 2 y 3). Los resultados se muestran en la Tabla V.4..

| | Caso 1 | Caso 2 | Caso 3 |
|------------------|--------|--------|--------|
| Adherencia (MPa) | 44±8 | 47±9 | 50±7 |

Tabla V.4. Valores de adherencia por bond strength test

Estudios anteriores en el caso de recubrimientos realizados sólo con HAp, también por plasma, muestran máximos en torno a 40 MPa [3], lo cual indica que la adición de TiO₂ provoca un aumento de la adherencia del recubrimiento.

Una observación de la superficie de rotura revela que el porcentaje de rotura adhesiva es total en el caso 1, mientras que el caso 2 y, más aún, el caso 3 presentan una parte del recubrimiento que ha quedado sobre el sustrato, produciéndose, por tanto, un cierto porcentaje de rotura cohesiva además de la adhesiva.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

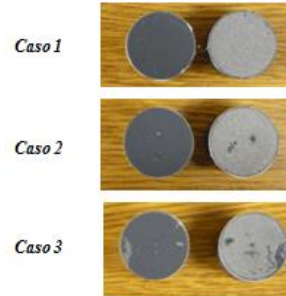


Figura V.16. Superficies de rotura tras bond strength test para los tres casos

V.3.6. Ensayo de inmersión en fluido fisiológico simulado

Para las condiciones y distancias consideradas en los ensayos de adherencia, se volvieron a medir estos valores tras 24h de inmersión en solución Hanks en condiciones fisiológicas. Los resultados se muestran en la Tabla V.5. Aunque este ensayo no esté establecido en normas, se emplea ampliamente para evaluar la pérdida de adherencia del recubrimiento una vez colocado el implante en el cuerpo humano.

| | Caso 1 | Caso 2 | Caso 3 |
|------------------|--------|--------|--------|
| Adherencia (MPa) | 12±7 | 13±5 | 13±6 |

Tabla V.5. Valores de adherencia por bond strength test tras 1d en condiciones fisiológicas

En trabajos anteriores, para recubrimientos sólo de HAp, se obtienen valores post-1 día de inmersión en SBF inferiores, de 7-8MPa [3], lo cual demuestra que el TiO₂ ha tenido una influencia positiva en el aumento de la adherencia aún después de someterlo a condiciones fisiológicas. Asimismo, se corrobora

lo observado en los difractogramas, ya que se ha visto que se ha producido una disminución de la cantidad de fase amorfa en la interfaz entre el recubrimiento y el sustrato, y, se sabe que esta fase amorfa se disuelve rápidamente cuando está en contacto con el medio fisiológico [7], produciendo una pérdida de la adherencia del recubrimiento.

V.3.7. Ataque con ácido nítrico

La inmersión en ácido nítrico ha permitido una localización de la fase amorfa presente en el recubrimiento [8]. Se ha realizado para los recubrimientos mejores para cada caso, al igual que en los ensayos de adherencia, (150 mm para el caso 1, y 110 para los casos 2 y 3), y las micrografías resultantes se pueden ver en las Figuras V.17. a V.19.

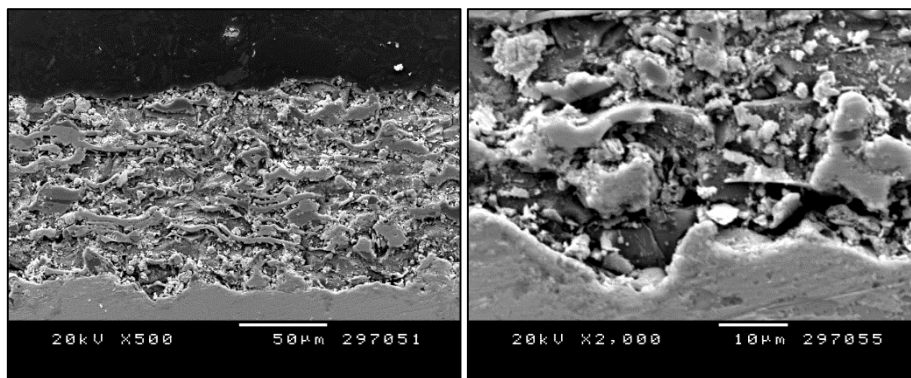


Figura V.17. Sección transversal del caso 1, 150 mm, tras ataque ácido

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

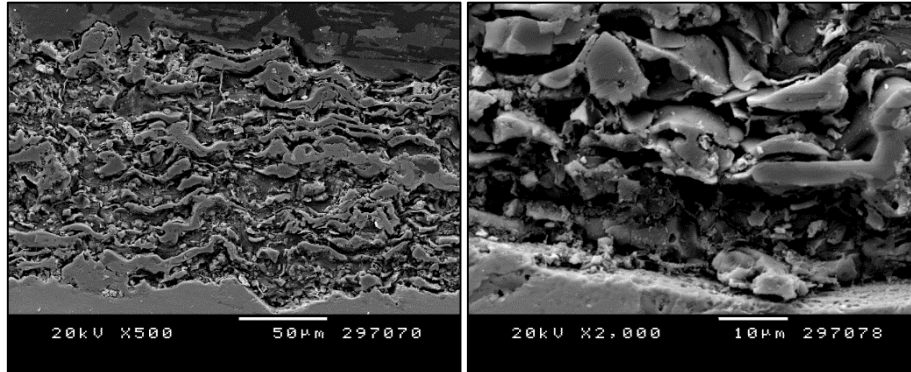


Figura V.18. Sección transversal del caso 2, 110 mm, tras ataque ácido

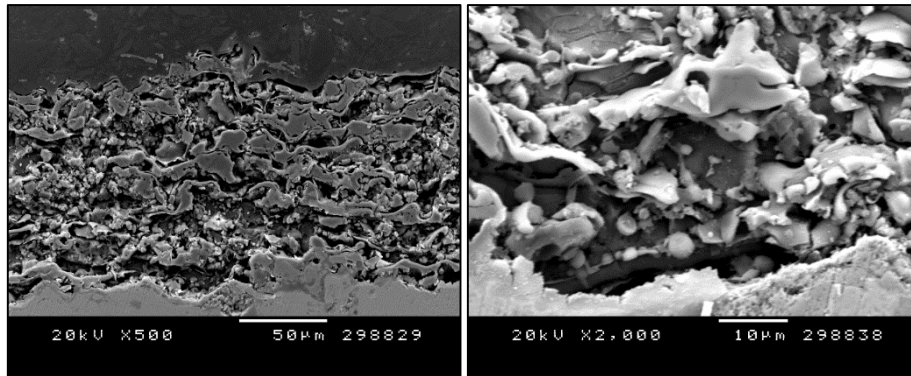


Figura V.19. Sección transversal del caso 3, 110 mm, tras ataque ácido

Tras el ataque ácido, la observación primera que se puede hacer, en todos ellos, es que la interfaz recubrimiento-sustrato está totalmente atacada, y ha desaparecido el contacto entre uno y otro salvo en algunos tramos que corresponden a zonas de titania o hidroxiapatita no amorfa, que han mantenido su consistencia y funcionalidad. En los tres casos es, además, evidente que se pueden observar las diferentes capas proyectadas, debido al ataque concentrado no sólo en la interfaz recubrimiento-sustrato, sino también en la interfaz entre capas, lo que indica que también las partículas fundidas que se van depositando entre capas se enfrían rápidamente

produciendo fase amorfa en la superficie de las partículas depositadas capa a capa.

V.4. Conclusiones

Los recubrimientos de HAp-TiO₂ obtenidos por proyección plasma han supuesto una mejora respecto a los recubrimientos de HAp por la misma técnica si se consideran tanto los valores de adherencia as-sprayed como tras inmersión en una solución de fluidos corporales (solución Hanks). Estos resultados de adherencia tras inmersión en fluidos corporales han permitido observar una bajada brusca de la adherencia del recubrimiento como consecuencia de la disolución de las fases amorfas. Esto se hace evidente tras el ataque ácido, que permite ver la localización de las fases amorfas del recubrimiento. Aunque la fase amorfa se distribuye por todo el recubrimiento, debido al rápido enfriamiento entre capas, es notoria su presencia en la interfaz recubrimiento-sustrato. Este hecho es bastante indicativo de lo que ocurriría en condiciones fisiológicas tras algunos días. Por ello, se plantea como realmente necesario un cambio de técnica de proyección térmica.

V.5. Referencias

- [1] J Weng, X Liu, X Zhang, K de Groot, Integrity and thermal decomposition of apatite in coatings influenced by underlying titanium during plasma spraying and post-heat-treatment. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 30 (1996) 5-11.
- [2] Introduction to thermal spray processing. *Handbook of thermal spray technology*. ASM International (2004).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- [3] M Gaona. Recubrimientos biocompatibles obtenidos por proyección térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona (2007).
- [4] P Fauchais, Understanding plasma spraying. J. Phys. D: Appl. Phys. 37 (2004) 86-108.
- [5] KJ Anusavice, Degradability of dental ceramics. Adv. Dent. Res. 6 (1992) 82-89.
- [6] KA Gross, CC Berndt, Thermal processing of hydroxyapatite for coating production. J. Biomed. Mater. Res. Part A 39 (1998) 580-587.
- [7] KA Gross, CC Berndt, H Herman, Amorphous phase formation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. J. Biomed. Mater. Res. Part A 39 (1998) 407-414.
- [8] S Somrani, C Rey, M Jemal, Thermal evolution of amorphous tricalcium phosphate. J. Mater. Chem. 13 (2003) 888-892.

Capítulo VI.

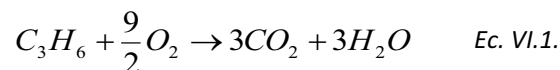
Elección de las condiciones de proyección térmica de alta velocidad

VI.1. Introducción

Vistas las limitaciones de las proyecciones plasma, se ha planteado la obtención de recubrimientos por proyección térmica de alta velocidad. Este capítulo se ha centrado en la elección de las condiciones de proyección mediante esta técnica. Para ello, en primer lugar se describirán cuáles son estas condiciones, qué lógica siguen, y cuál ha sido la elección del rango de distancias.

VI.2. Condiciones de proyección

Para escoger las condiciones de proyección, se ha partido, al igual que en el caso de las proyecciones plasma, de trabajos realizados con anterioridad. El gas combustible utilizado ha sido el propileno, y la reacción de combustión que tiene lugar se muestra en la Ecuación VI.1.



El estequiométrico para la reacción del propileno con el oxígeno es de 4,5. Las condiciones que se escojan no deberán tener por tanto una relación oxígeno/propileno superior a la estequiométrica, ya que el exceso de oxígeno llevará a un enfriamiento de la llama.

Se han elegido cuatro condiciones base, tomando en consideración temperaturas y velocidades *teóricas* del haz de proyección. Se han escogido dos niveles de temperatura (a partir de la relación oxígeno/propileno), y dos niveles de velocidad a partir del caudal de aire comprimido, quedando así cuatro casos combinando estos niveles.

Las condiciones se pueden ver detalladas en la Tabla VI.1.

| | Caso A | Caso B | Caso C | Caso D |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Caudal oxígeno (l/min) | 253 | 240 | 278 | 265 |
| Caudal propileno (l/min) | 81 | | | |
| Caudal aire comprimido (l/min) | 203 | 264 | 203 | 264 |
| Relación oxígeno/propileno | 3,65 | | 3,96 | |
| Dosificación (g/min) | 25 | | | |
| Avance de la pistola (mm/s) | 500 | | | |
| Número de capas | 5 | | | |

Tabla VI.1. Condiciones de proyección

Como se puede deducir, los casos A y C corresponderán a un nivel menor de velocidad por el menor caudal de aire comprimido (V_0) y los casos B y D a un nivel mayor de velocidad (V_1) por un mayor caudal de aire comprimido. Por otro lado, al tratarse de una llama reductora, los casos con una mayor relación oxígeno/propileno tendrán una mayor temperatura de llama que los que tienen un valor menor para esta relación. Así, A y B tendrán un nivel menor de

temperatura (T0) y los casos C y D un nivel mayor de temperatura (T1). Por esta razón, en varios de los artículos incluidos al final de esta tesis se han sustituido las denominaciones A, B, C y D por T0V0, T0V1, T1V0, T1V1, respectivamente.

VI.3. Elección del rango de distancias de proyección

La primera elección del rango de distancias de proyección fue amplia, desde 160 mm hasta 280 mm. Sin embargo, pronto se pudo acotar este intervalo debido a dos razones fundamentales:

- Para distancias menores a 200 mm, se obtenía una eficiencia muy baja, que se puede ver reflejada en el bajo espesor obtenido para estas distancias (Figura VI.1.). Aunque el espesor no sea una medida directa de la eficiencia, el hecho de que la bajada sea tan drástica (como se verá en el capítulo VII) respecto a las otras distancias sí es una indicación casi directa de la disminución de la eficiencia.

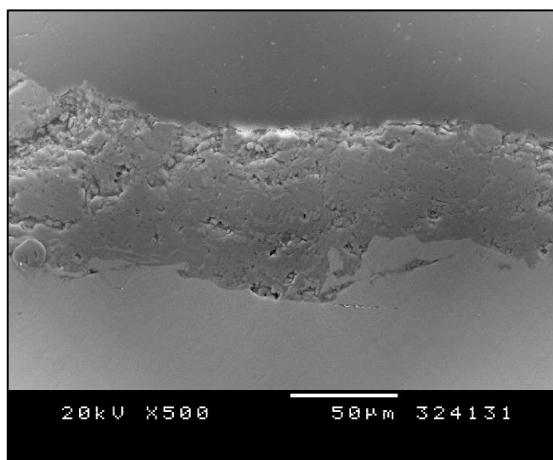


Figura VI.1. Sección transversal a distancias inferiores a 200 mm (caso B, distancia 180 mm).

Asimismo, este hecho se ve corroborado por el aspecto de una probeta tras la proyección (Figura VI.2.).



Figura VI.2. Superficie de una probeta tras la proyección (caso C, distancia 180 mm).

El salto entre pasadas es muy visible, cosa que no ocurre para distancias superiores, indicador de que la eficiencia de deposición de, como mínimo, uno de los dos polvos de partida, se ha visto mermada.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- La segunda razón es que para distancias superiores a 240 mm, los recubrimientos obtenidos presentan malas interfaces recubrimiento-sustrato, con muchas imperfecciones que indican que la adherencia del recubrimiento al sustrato será baja (Figura VI.3.).

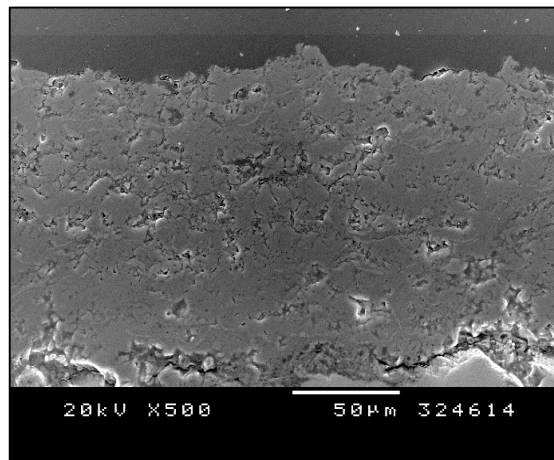


Figura VI.3. Sección transversal de un recubrimiento a distancias superiores a 240 mm (caso C, distancia 260 mm)

Además de la baja calidad de la interfaz recubrimiento-sustrato, el recubrimiento aparece descohesionado, con una baja compactación de las capas (presencia de poros), y un consecuente elevado espesor, consecuencia de la menor velocidad de las partículas tras tiempos más largos en la llama.

Por tanto, se toma, para los cuatro casos, un rango de distancias de entre 200 y 240 mm (es decir, unas distancias de trabajo de 200, 220 y 240 mm).

VI.4. Conclusiones

En este capítulo han quedado han quedado definidas las condiciones de proyección por alta velocidad que se utilizarán para el polvo 80%HAp-20%TiO₂, tanto en los parámetros del equipo para conferir temperatura y velocidad a las partículas, como en las distancias de proyección a ensayar.

Capítulo VII.

Recubrimientos obtenidos por alta velocidad. Microestructura y estudio de fases.

VII.1. Introducción

Una vez definidas las condiciones de proyección por alta velocidad, el primer paso para caracterizar los recubrimientos es estudiar su microestructura y composición de fases. Este capítulo se ha estructurado a tal efecto. En primer lugar, se analizaron las secciones transversales de los recubrimientos estudiados; posteriormente, sus valores de rugosidad superficial y espesor; luego los resultados obtenidos por DRX; y finalmente las secciones transversales tras ataque ácido.

VII.2. Microestructura de los recubrimientos obtenidos

En las Figuras VII.1. a VII.12. se pueden observar las secciones transversales de los recubrimientos obtenidos, acompañadas de un detalle de la interfase.

Caso A:

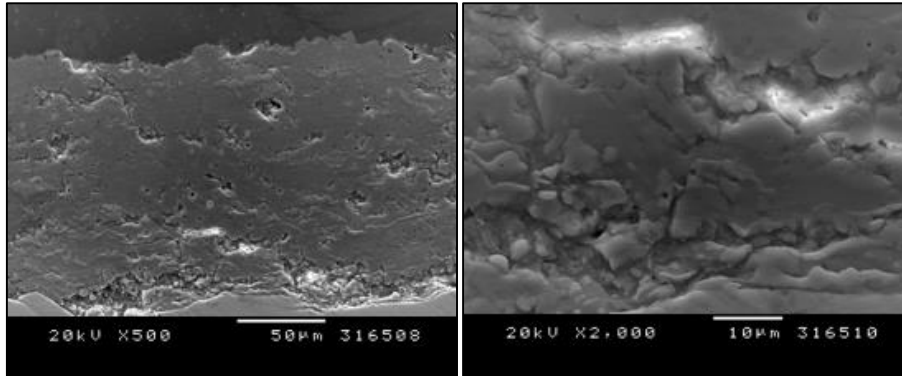


Figura VII.1. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso A, 200 mm

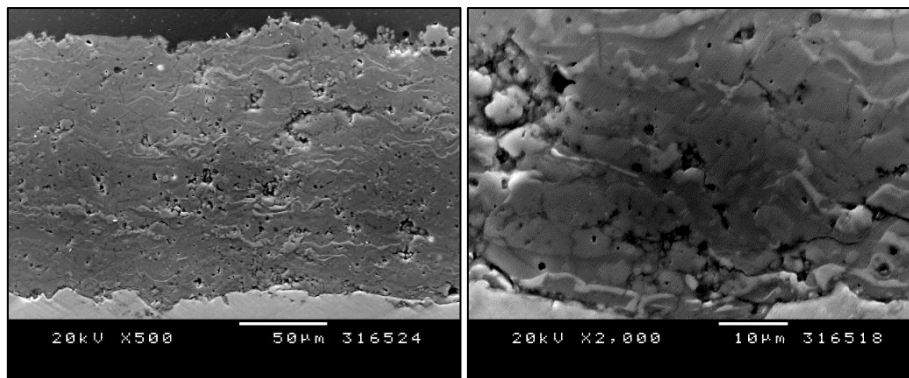


Figura VII.2. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso A, 220 mm

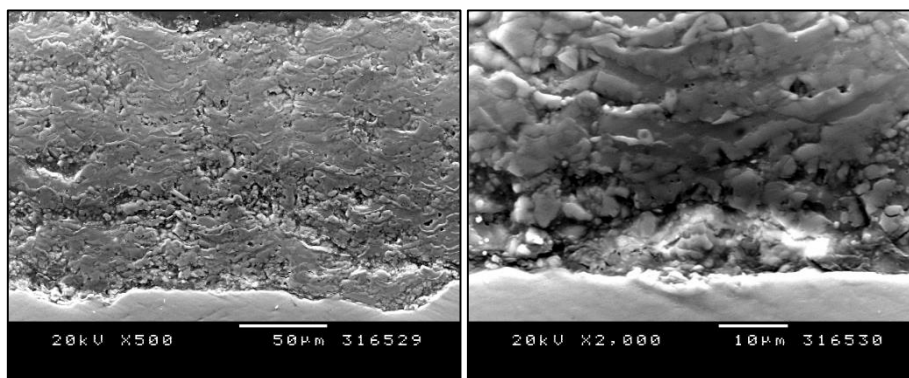


Figura VII.3. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso A, 240 mm

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

El caso A presenta una importante descohesión para la distancia mayor, 240 mm. Asimismo, la adherencia con el sustrato no es óptima. También a la distancia menor, 200 mm, la cohesión entre capas es baja, observándose zonas de no adhesión recubrimiento-sustrato en la interfaz. La mejor microestructura, con mayor cohesión y una interfaz más continua, se obtiene para la distancia intermedia, 220 mm.

Caso B:

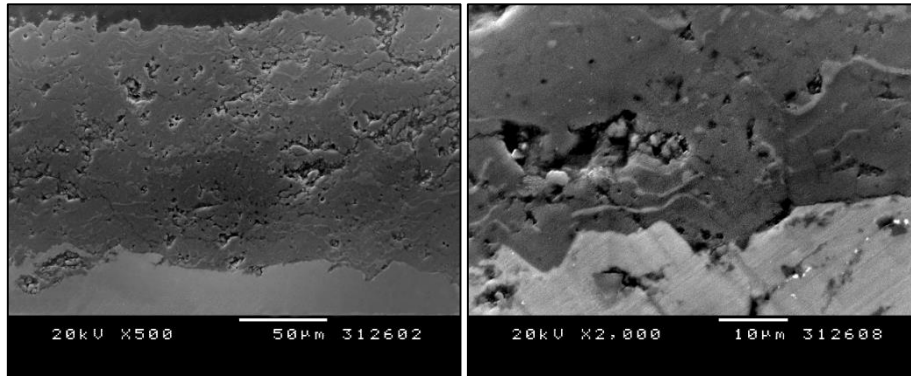


Figura VII.4. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso B, 200 mm

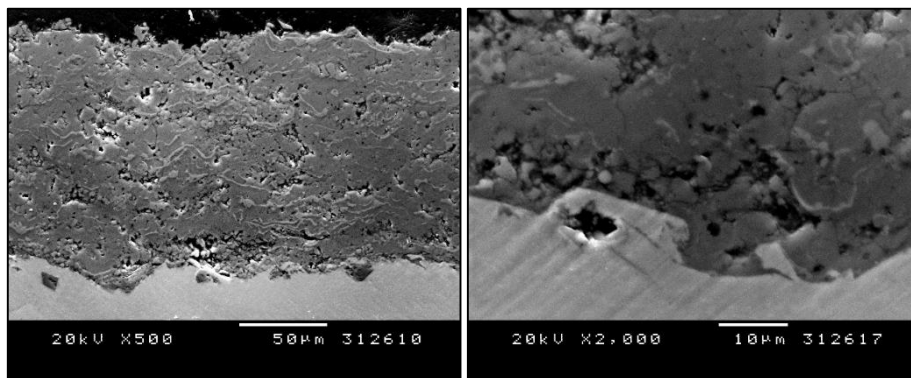


Figura VII.5. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso B, 220 mm

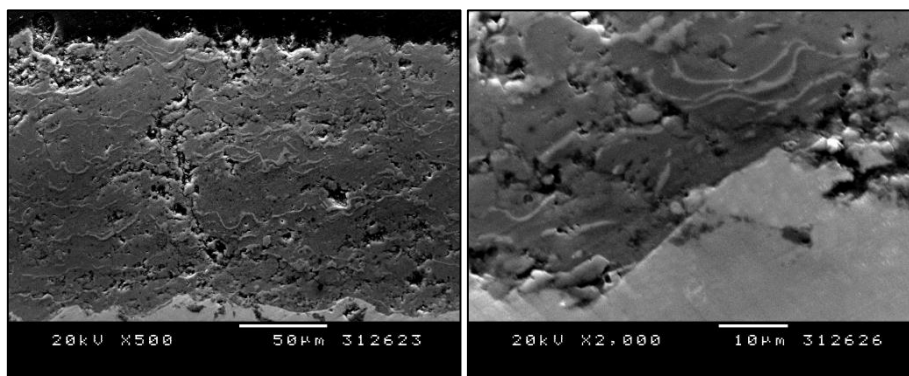


Figura VII.6. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso B, 240 mm

El caso B presenta pocas diferencias entre las microestructuras obtenidas para diferentes distancias, aunque es para la mayor distancia para la que se obtiene mayor descohesión y grietas. Los recubrimientos obtenidos para 200 y 220 mm presentan microestructuras muy similares. Sin embargo, es la distancia menor (200 mm) la que lleva a recubrimientos más compactos y con menos porosidad y defectos. La interfaz es bastante continua para las tres distancias, y no observan defectos en ella.

Caso C:

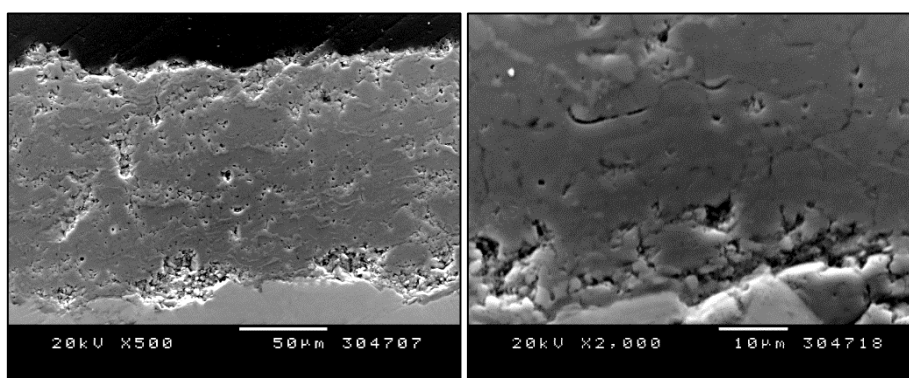


Figura VII.7. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso C, 200 mm

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

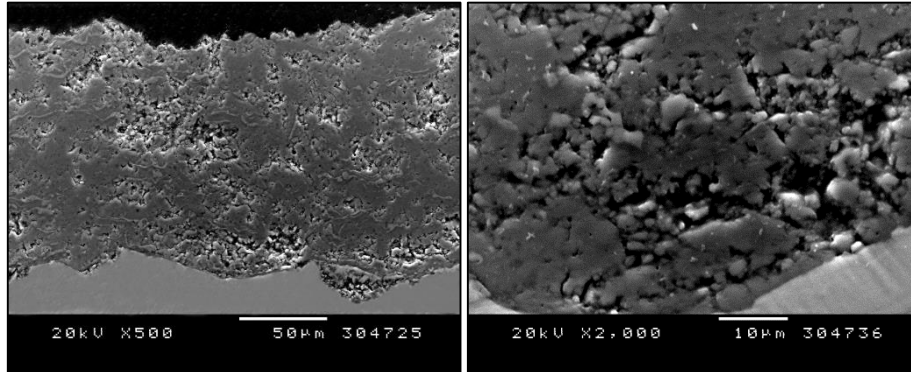


Figura VII.8. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso C, 220 mm

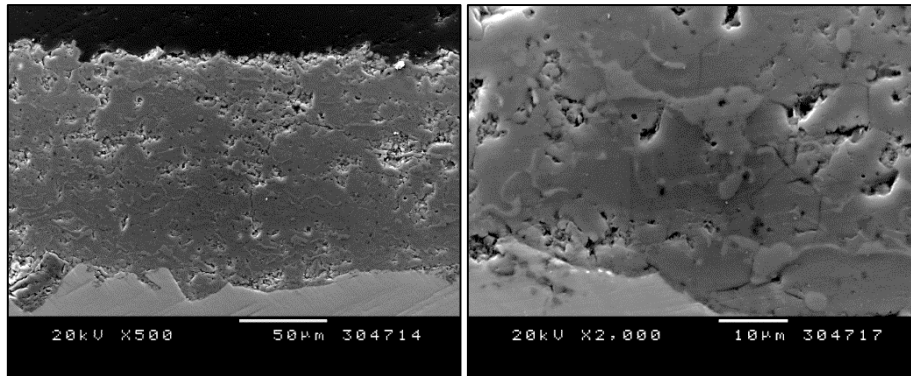


Figura VII.9. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso C, 240 mm

El caso C presenta la mejor microestructura para la distancia mayor, 240 mm, siendo ésta compacta con una interfaz continua. Entre las distancias 200 y 220 mm, la primera presenta microestructuras más compactas, aunque la interfaz concentra muchos defectos; en cambio, a 220 mm, la microestructura presenta defectos (poros y descohesión) por todo el recubrimiento, si bien la interfaz es más continua.

Caso D:

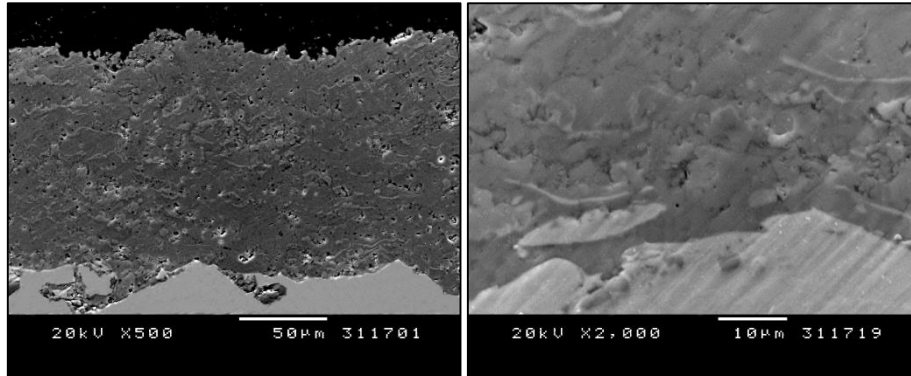


Figura VII.10. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso D, 200 mm

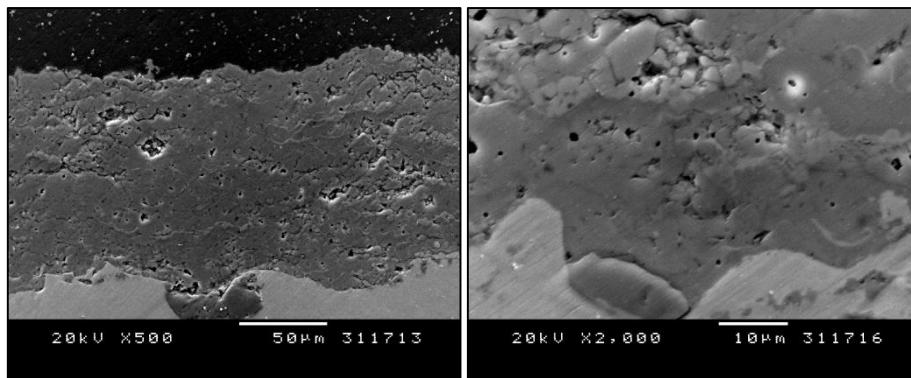


Figura VII.11. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso D, 220 mm

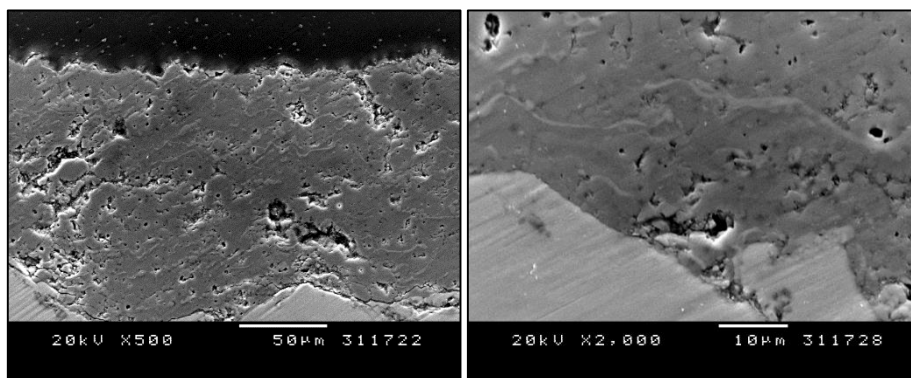


Figura VII.12. Sección transversal y detalle de la interfaz del caso D, 240 mm

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Para el caso D, la microestructura que presenta más grietas y poros, se obtiene a distancias de proyección mayores (240 mm). A 200 y 220 mm, la microestructura obtenida es similar, aunque la distancia 220 mm presenta más defectos, mientras que a 200 mm, el recubrimiento aparece continuo, con poros pequeños y regulares, sin apenas presencia de grietas y con una interfaz continua.

En general, la primera observación que se puede hacer es que se trata de recubrimientos compactos, comprimidos, con poca porosidad. Se detecta una menor fusión del polvo que en el caso de la proyección por plasma, de ahí que en muchas de las micrografías se aprecie una cierta descohesión entre capas. Este detalle se puede apreciar a partir de un dato característico; así como en los recubrimientos obtenidos por plasma, las capas tienen una forma ondulante, están muy bien cohesionadas, y debido al enfriamiento más importante, la porosidad es mayor en general, en los recubrimientos obtenidos por HVOF las capas se observan horizontales, formando un todo más compacto aunque menos fusionado, con menor porosidad.

Es complicado comparar los cuatro casos entre ellos, ya que existen muchas diferencias entre distancias, pero globalmente se podría decir que las mejores microestructuras se obtienen para los casos D y B, posiblemente por la mayor velocidad de haz y la consecuente compactación (y menor porosidad), y las peores para los casos A y C.

VII.3. Rugosidad superficial de los recubrimientos

Los resultados promedio de rugosidad se muestran en la Tabla VII.1..

| | Caso A (μm) | Caso B (μm) | Caso C (μm) | Caso D (μm) |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 200 mm | $3,4\pm 0,2$ | $3,6\pm 0,3$ | $3,7\pm 0,2$ | $3,7\pm 1,1$ |
| 220 mm | $3,4\pm 0,1$ | $3,3\pm 0,1$ | $3,8\pm 0,3$ | $3,8\pm 0,6$ |
| 240 mm | $3,4\pm 0,3$ | $3,5\pm 0,4$ | $3,9\pm 0,2$ | $4,0\pm 0,2$ |

Tabla VII.1. Valores de rugosidad obtenidos para los cuatro casos

En este caso no se observa un patrón claro en la distribución por casos y distancias de las rugosidades obtenidas. Lo que sí es notable es que los valores de rugosidad superficial son menores que los obtenidos en el caso de plasma, posiblemente debido al efecto de la elevada velocidad del haz en esta técnica y la consecuente compactación, lo cual da fe de la mayor influencia en este aspecto del aumento de la velocidad frente al descenso de la temperatura con el cambio de técnica.

VII.4. Espesor de los recubrimientos

Los espesores promedio se muestran en la Tabla VII.2..

**Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)**

| | A (μm) | B (μm) | C (μm) | D (μm) |
|--------|---------|---------|----------|----------|
| 200 mm | 124 ± 6 | 110 ± 8 | 122 ± 10 | 122 ± 15 |
| 220 mm | 117 ± 7 | 116 ± 6 | 126 ± 10 | 106 ± 9 |
| 240 mm | 137 ± 8 | 137 ± 8 | 117 ± 9 | 114 ± 7 |

Tabla VII.2. Valores de espesor obtenidos para los cuatro casos

Los valores promedio por experimento son relativamente similares, exceptuando el caso D (ver distancia de 220 mm) que, tal y como se podía observar en las micrografías correspondientes, tiene un espesor menor, ya sea por una menor eficiencia en la deposición, porque se estén adhiriendo partículas con otro tamaño de partícula, o porque, como es bien posible, la conjunción de la elevada temperatura (que permite una mayor fusión) con la elevada velocidad (que permite una mayor compactación) lleva a recubrimientos más densos y con menos porosidad, y por tanto más finos.

También se ve reflejado, al menos en los casos A y B, el hecho de que al aumentar la distancia de proyección, se ve una tendencia al aumento del espesor del recubrimiento, posiblemente por una mayor descohesión entre capas del recubrimiento. Esto podría atribuirse a que para estos casos, con menor temperatura de haz, la mayor distancia de proyección permite que, al estar más tiempo en el haz, la partícula llegue a una temperatura más alta y por tanto se adhiera mejor. No es así para los casos C y D, con mayor temperatura de haz, donde puede que la mayor permanencia en el haz haga superar el punto mayor de calentamiento y conduzca a un enfriamiento de las partículas para mayores distancias.

VII.5. Composición de los recubrimientos

VII.5.1. Difracción de rayos X y cálculos de Rietveld

A continuación se pueden ver los resultados de difracción. Al haber detectado a partir del análisis microestructural cuál es la distancia a la que se obtienen los mejores recubrimientos para cada caso (datos refrendados por los ensayos de adherencia detallados en el capítulo VIII), se toman éstas para el análisis de fases.

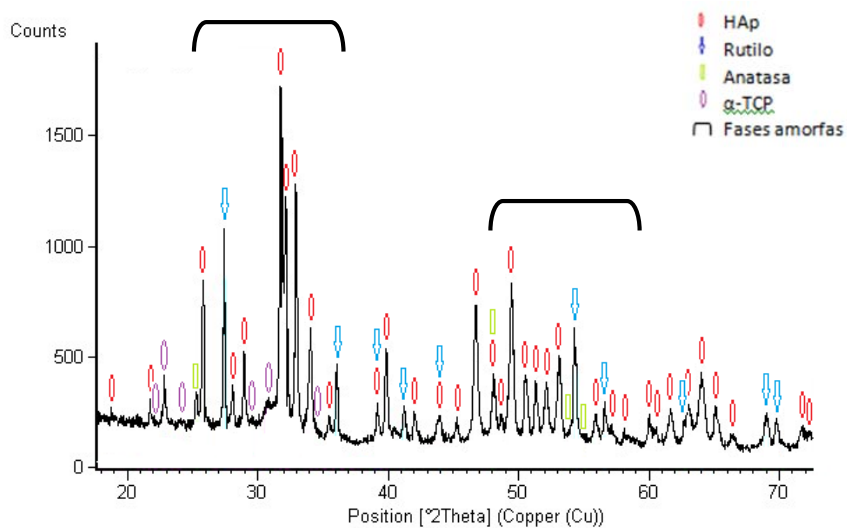


Figura VII.13. Espectro de DRX correspondiente al caso A, 220 mm

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

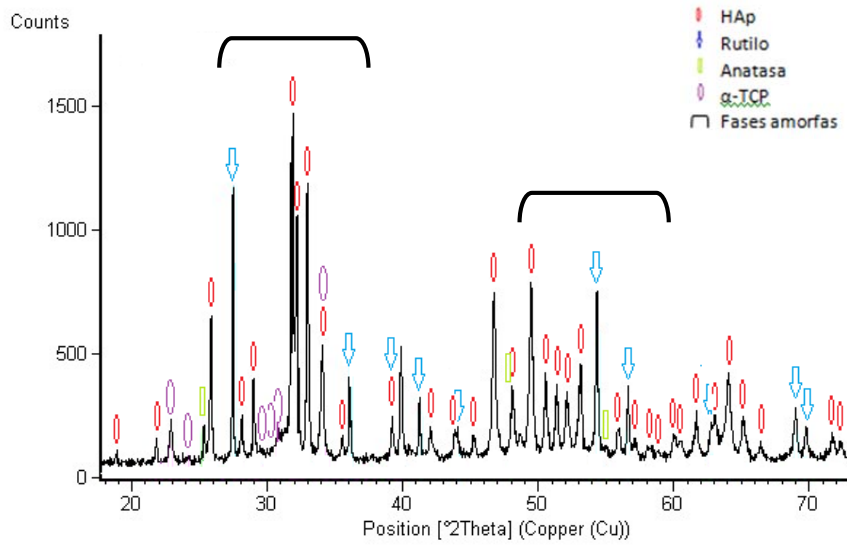


Figura VII.14. Espectro de DRX correspondiente al caso B, 200 mm

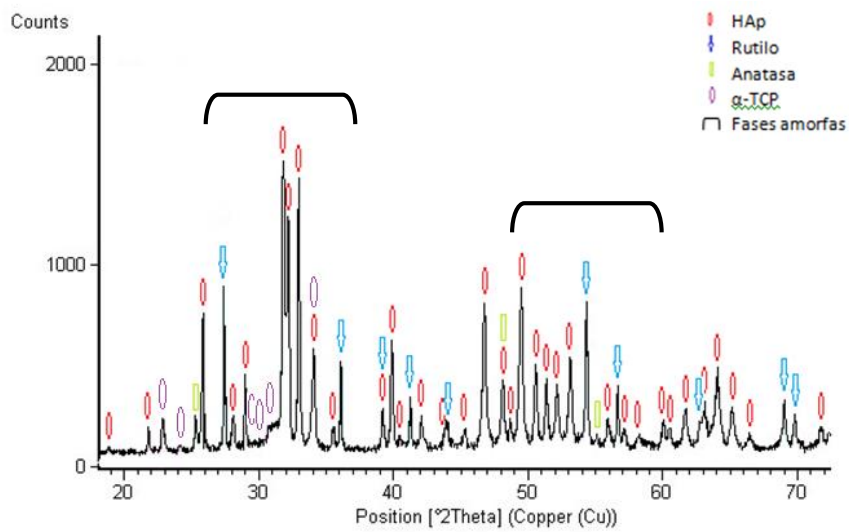


Figura VII.15. Espectro de DRX correspondiente al caso C, 240 mm

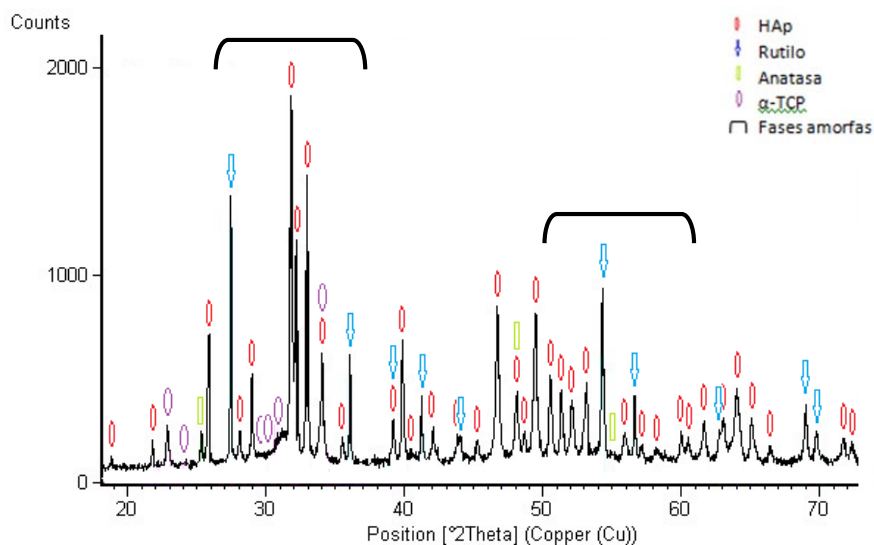


Figura VII.16. Espectro de DRX correspondiente al caso D, 200 mm

La primera observación que se puede hacer es que el número de fases secundarias que aparecen en estos recubrimientos es mucho menor que en el caso de plasma, debido a las menores temperaturas que se alcanzan. Las fases mayoritarias siguen siendo la hidroxiapatita y el rutilo de los polvos de partida, y aparecen también picos atribuibles a la presencia de anatasa y α -TCP (en menor cuantía que en el caso de plasma). Es notable, también, el tamaño mucho menor de las bandas anchas correspondientes a las fases amorfas, debido a las menores temperaturas que se alcanzan. Se pueden observar alrededor del pico principal de la hidroxiapatita, mientras que son prácticamente ilocalizables en el caso de la titania. Es, por tanto, un avance respecto a la proyección plasma que no se detecten fases como CaO, de gran velocidad de disolución [1] y nociva para los tejidos circundantes [2], o que se detecten menos fases amorfas, cuya rápida disolución puede llevar a una descohesión del recubrimiento respecto al sustrato [3].

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Cálculos mediante el método de Rietveld, cuyos resultados se pueden ver en la Tabla VII.3., han permitido una cuantificación de las fases para estos cuatro casos.

| Fase presente (%) | HAp | Rutilo | Anatasa | α -TCP | Amorfo y no considerado |
|-------------------|------|--------|---------|---------------|-------------------------|
| Caso A | 49,2 | 9,8 | 1,3 | 11,2 | 28,5 |
| Caso B | 48,9 | 10,4 | 1,2 | 16,7 | 22,8 |
| Caso C | 44,8 | 8,7 | 1,3 | 10,9 | 34,3 |
| Caso D | 53,4 | 10,7 | 1,5 | 20,3 | 14,1 |

Tabla VII.3. Resultados de los cálculos por Rietveld

A partir de estos cálculos, se puede ver que la mayor cantidad de fase amorfa aparece para el caso C, seguido de los casos A y B. El caso D es el que presenta la menor cantidad de fase amorfa. Esta relación entre las diferentes cantidades de fase amorfa se da por los respectivos tiempos de residencia de partícula en el haz y la temperatura del mismo. El caso C, con un nivel de temperatura de haz superior y el mayor tiempo de residencia junto con el del caso A, será el que permita que la partícula llegue más caliente al recubrimiento, y por tanto provocará que haya una mayor cantidad de fase amorfa en el mismo. El caso A es el segundo, por su elevado tiempo de residencia en llama aunque tiene una temperatura de llama menor. Los casos B y D, que corresponden a un menor tiempo de residencia de partícula en la llama (menor para el caso D) presentan los menores porcentajes de fase amorfa.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos para recubrimientos similares, se encuentra que la adición de TiO₂ al polvo ha permitido que el

óptimo (caso D, con un 14% de fase amorfa) mejore, ya que los recubrimientos de 100%HAp obtenidos por HVOF tienen óptimos de un 18% [4]). También es importante añadir que, aunque las fases amorfas estén derivadas tanto de la hidroxiapatita (en su mayoría) como de la titania (en menor medida), las derivadas de la segunda, tal y como se ha comprobado con ensayos de ICP, no son solubles. De esto se deduce que el porcentaje de fase amorfa soluble será incluso menor al 14% calculado.

Asimismo, como apunte indicativo de la influencia de la técnica empleada en la degradación térmica del recubrimiento, se puede comentar que resultados de análisis de Rietveld con recubrimientos de HAp por plasma dan valores de contenido de fase amorfa óptimos de un 38% [5].

VII.5.2. Análisis por EDX y microsonda electrónica

De acuerdo con el grupo de Khor [6], se debería detectar un compuesto resultado de la interacción de los dos polvos de partida, ya que a 1410°C se produce una reacción que da lugar a CaTiO_3 , detectada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Aunque es cierto que esta reacción se produce en un calorímetro (se comprobó experimentalmente), no se encuentra esta fase en los recubrimientos, lo cual es lógico ya que se trata de dos situaciones completamente diferentes. En un calorímetro los dos polvos están en contacto permanente por un lapso de tiempo largo, mientras que en el proceso de proyección las partículas vuelan separadas y sólo se encuentran al chocar contra el sustrato, además de enfriarse de manera instantánea.

Se analizaron, las secciones transversales mediante EDX y microsonda electrónica para averiguar si se encontraba alguna zona donde se detectara tanto calcio como titanio, no encontrándose ninguna.

VII.5.3. Análisis de Raman

Mediante análisis de espectroscopía Raman, se determinaron cuáles eran las fases presentes en el recubrimiento (Figuras VII.17. a 19.) Como no se detectan diferencias importantes entre casos, se han añadido únicamente espectros de Raman de un caso, el D. Las tres figuras corresponden a tres puntos diferentes del recubrimiento, y muestran la zona del espectro indicativa del compuesto detectado.

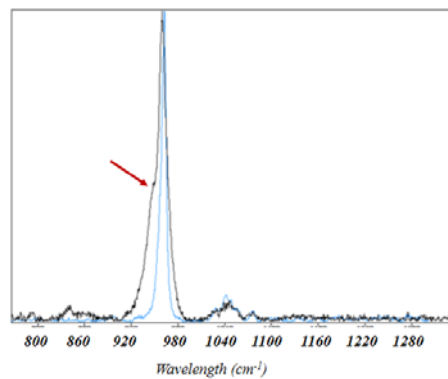


Figura VII.17. Espectro de Raman de un recubrimiento (negro), zona HAp, con patrón de referencia superpuesto (azul)

En la Figura VII.17. se detecta claramente la presencia de HAp y, de acuerdo con el solapamiento de pico señalado por la flecha roja, se detectan también fases amorfas y algún fosfato tricálcico, lo que cuadra con los resultados obtenidos por DRX.

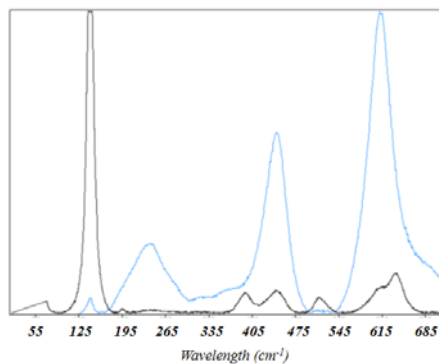


Figura VII.18. Espectro de Raman de un recubrimiento (negro), zona titania, con patrón de rutilo superpuesto (azul).

De acuerdo con la Figura VII.18., se detecta la presencia de rutilo en pequeña cantidad, sin ser la fase mayoritaria en esa zona.

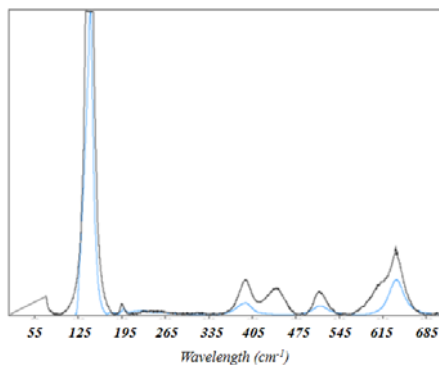


Figura VII.19. Espectro de Raman de un recubrimiento (negro), zona titania, con patrón de anatasa superpuesto (azul).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

En las zonas de titania, se puede ver (Figura VII.19.) que la fase mayoritaria es, contrariamente a lo encontrado por DRX, anatasa, y no rutilo. La explicación para ello es que, por el enfriamiento diferente de las partículas del centro del recubrimiento y las de la superficie, la anatasa, detectada en muy pequeñas cantidades por DRX (Rietveld), esté concentrada en la superficie, de ahí que la técnica de Raman, que está hecha en superficie y penetra pocas micras en las condiciones aplicadas detecte en su mayoría la anatasa de la superficie.

VII.6. Ataque con ácido nítrico

Estos recubrimientos (los cuatro casos definidos) se atacaron también con ácido nítrico para localizar la fase amorfa presente [7].

En las Figuras VII.20. a VII.23. se pueden ver los resultados.

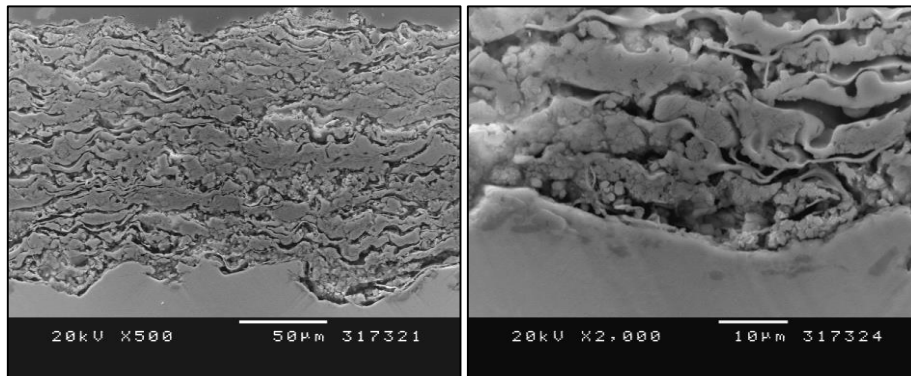


Figura VII.20. Sección transversal de un recubrimiento del caso A, 220 mm atacado

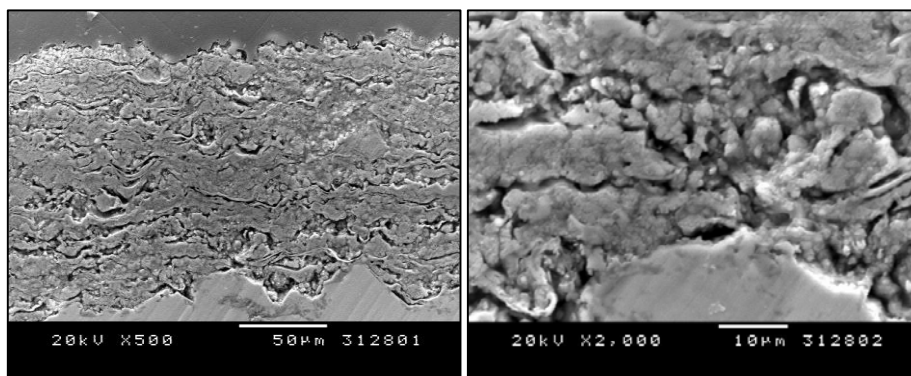


Figura VII.21. Sección transversal de un recubrimiento del caso B, 200 mm atacado

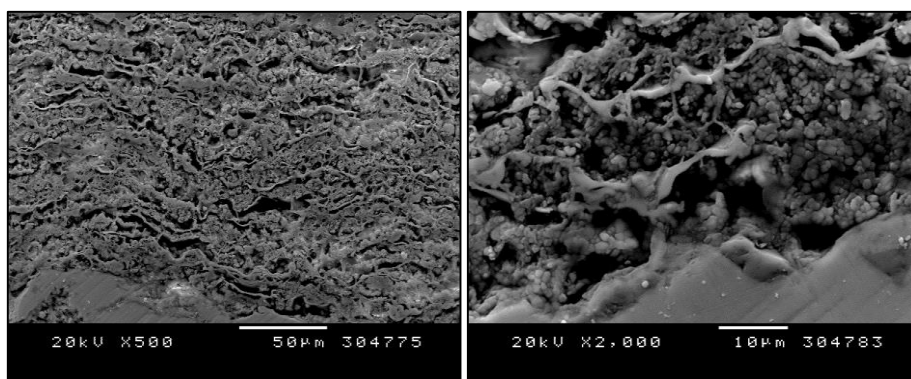


Figura VII.22. Sección transversal de un recubrimiento del caso C, 240 mm atacado

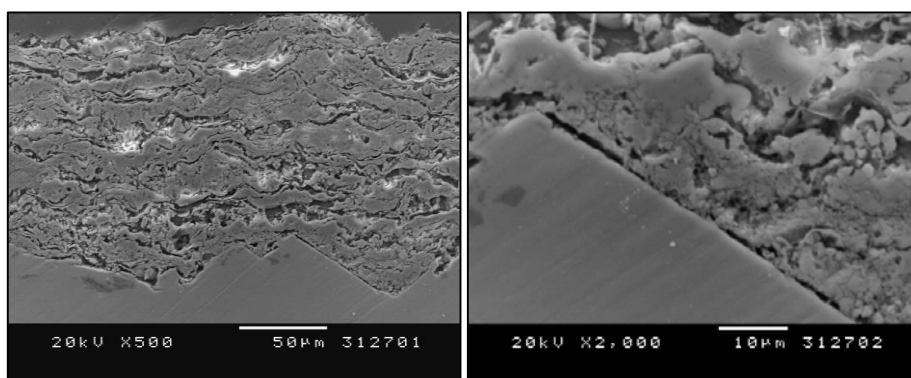


Figura VII.23. Sección transversal de un recubrimiento del caso A, 200 mm atacado

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La primera observación que se puede hacer es que en los casos A, B y D el recubrimiento está mucho menos atacado que en el caso de plasma, debido a las menores temperaturas alcanzadas en el proceso de proyección y, por tanto, a la menor cuantía de fase amorfa presente en el recubrimiento. El ataque en todos los casos está muy repartido en todo el recubrimiento. La cantidad de fase amorfa presente en la interfaz recubrimiento-sustrato no es mayor que la presente entre capas sucesivas.

El caso C es, con diferencia, el más atacado, lo cual concuerda con la mayor cantidad de fase amorfa calculada por Rietveld. Entre los casos A y B no hay demasiadas diferencias, son prácticamente iguales. Es visible por otra parte que el caso D (con menor fase amorfa de acuerdo con el cálculo de Rietveld) es el menos atacado y presenta una interfaz recubrimiento-sustrato muy poco atacada.

VII.7. Conclusiones

Ha quedado establecido la mejora que ha supuesto la sustitución de la proyección plasma por la proyección HVOF, con mucha menor degradación de las fases. Asimismo, y como consecuencia de ello, no se detectan fases nocivas en el recubrimiento que puedan impedir la funcionalidad de las prótesis –CaO– ni grandes cantidades de fases amorfas. Han quedado definidos los cuatro casos de estudio (la mejor distancia de cada uno de las cuatro condiciones de proyección) que se considerarán en el resto de la tesis, y quedarán caracterizados en los capítulos siguientes.

VII.8. Referencias

- [1] KA Gross, CC Berndt, Thermal processing of hydroxyapatite for coating production. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 39 (1998) 580-587.
- [2] KJ Anusavice, Degradability of dental ceramics. *Adv. Dent. Res.* 6 (1992) 82-89.
- [3] KA Gross, CC Berndt, H Herman, Amorphous phase formation in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 39 (1998) 407-414.
- [4] J Fernández, M Gaona, JM Guilemany, Effect of heat treatments on HVOF hydroxyapatite coatings. *J. Therm. Spray Technol.* 16 (2007) 220-228.
- [5] M Gaona, Recubrimientos biocompatibles obtenidos por proyección térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona, España (2007).
- [6] H Li, KA Khor, P Cheang, Titanium dioxide reinforced hydroxyapatite coatings deposited by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray. *Biomaterials* 23 (2002) 85-91.
- [7] S Somrani, C Rey, M Jemal, Thermal evolution of amorphous tricalcium phosphate. *J. Mater. Chem.* 13 (2003) 888-892.

Capítulo VIII.

Estudio de las propiedades mecánicas de los recubrimientos obtenidos mediante HVOF

VIII. 1. Introducción

Tal y como se ha dicho en la parte introductoria, uno de los principales problemas que tienen los recubrimientos de HAp empleados industrialmente como recubrimientos de prótesis metálicas es la falta de propiedades mecánicas [1]. Ya sea por la descohesión del recubrimiento y el sustrato [2], como por la formación de residuo sólido que pueda comprometer la funcionalidad de la prótesis [3], es importante considerar la evaluación de diferentes propiedades mecánicas, para asegurar que los recubrimientos estudiados tienen un correcto comportamiento en todas ellas.

Los cuatro casos definidos en el capítulo previo se considerarán en la evaluación de las propiedades mecánicas, comparándolos en los casos que se considere necesario con recubrimientos de otras composiciones.

La primera propiedad en ser evaluada será la adherencia por “bond strength test” del recubrimiento, pre- y post-inmersión en solución fisiológica simulada. A partir de ahí, y una vez establecida la mejora que suponen los

recubrimientos estudiados, se procederá a caracterizarlos mecánicamente mediante otros ensayos considerados necesarios. Se ha hecho una evaluación de la adherencia por “scratch test”, ensayos de desgaste, cálculos de tenacidad a fractura por indentación e interfaciales, y evaluación de las tensiones residuales.

La relación entre los resultados de adherencia, tenacidad a fractura y scratch test se ha descrito también en el artículo titulado “Mechanical performance of bioceramic coatings obtained by high-velocity oxy-fuel spray for biomedical purposes” H Melero, G Fargas, J Fernández, JM Guilemany, en proceso de publicación en la revista “Surface and Coatings Technology” (añadido en el anexo Anexo 2). En cuanto a los resultados de desgaste, también se pueden ver en el Anexo 3, en el artículo titulado “Tribological characterization of biocompatible HAp-TiO₂ coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray” HMelero, M Torrell, J Fernández, JR Gomes, JM Guilemany, publicado en la revista Wear.

VIII. 2. Bond strength de los recubrimientos

La adherencia, de entre todas las propiedades mecánicas, es la que presenta más problemas en dispositivos como los que nos ocupan [4]. De ahí que sea la propiedad que primero se evaluó; que se tomaran como referencia para posteriores ensayos los casos que dieron los mejores valores; y que se haya evaluado también tras inmersión en solución fisiológica simulada.

VIII.2.1. Valores de adherencia pre-inmersión

Tal y como se ha comentado en el capítulo VII, para el análisis de fases se escogió la distancia a la que se obtenía el mejor recubrimiento para cada condición de proyección, pero esta elección fue verificada realizando ensayos de adherencia mediante “bond strength test” a las tres distancias consideradas. Los resultados muestran en la Tabla VIII.1.

Se consideraron distancias óptimas las que presentaban mejor microestructura y mayores valores de adherencia, por lo cual se tomaron éstas, no sólo para el análisis de fases sino para el resto de ensayos de esta tesis.

| Distancias (mm) | Caso A (MPa) | Caso B (MPa) | Caso C (MPa) | Caso D (MPa) |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 200 | 46 ± 8 | 57 ± 9 | 36 ± 2 | 64 ± 8 |
| 220 | 54 ± 8 | 46 ± 9 | 46 ± 1 | 48 ± 5 |
| 240 | 45 ± 9 | 46 ± 8 | 52 ± 9 | 51 ± 10 |

Tabla VIII.1. Valores de adherencias para el rango de distancias considerado

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en capítulos previos para recubrimientos obtenidos por proyección plasma (entre 45 y 50 MPa), son del mismo orden de magnitud o superiores a éstos. El análisis de los resultados de adherencia en la tabla permite identificar que, para el rango de temperatura de llama menor (casos T0: A y B), se obtiene el óptimo de adherencia para distancias más cortas (especialmente en el caso B).

Para velocidades bajas (V0: casos A y C), parece que el mayor tiempo en la llama ha permitido un mejor calentamiento, de manera que los mejores

valores de adherencia se han obtenido para mayores distancias. En cambio, para velocidades de llama elevadas, el mayor tiempo en la llama no parece aportar una mejora en la adherencia; sin embargo, sí parece que la elevada velocidad a distancias cortas tiene una gran influencia, y permite una mejor adherencia del recubrimiento. De hecho, de los cuatro casos, es el caso D, el caso con mayor velocidad de haz (ya que es algo superior que en el caso B) el que permite obtener una mayor adherencia, lo que recalca la gran importancia de la velocidad del haz frente a la temperatura, especialmente para temperaturas de llama superiores.

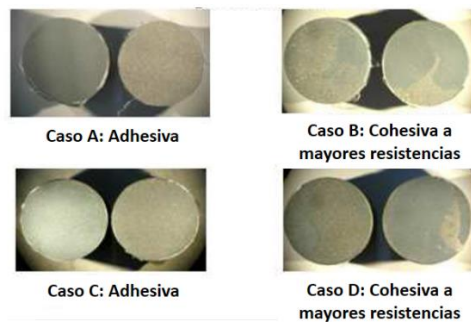


Figura VIII.1. Superficies de rotura

Las superficies de rotura se pueden ver en la figura VIII.1..

En los casos A y C, con menor cohesividad del recubrimiento por menor velocidad del haz, la rotura es adhesiva, mientras que a mayor velocidad del haz es cohesiva, por la mejor adhesión del recubrimiento al sustrato, de hecho los máximos de adherencia alcanzados corresponden a los casos con V1; es decir, B y D).

Asimismo, se puede ver que se obtienen mejores valores de adherencia para las distancias a las que se obtenía mejor microestructura aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas en muchos casos.

Una vez definidas las distancias óptimas en cuanto a adherencias del recubrimiento, se estudiarán únicamente éstas para el resto de ensayos, y

**Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)**

cada vez que se mencionen los casos A, B, C y D, cada uno de ellos corresponderá a su distancia óptima, lo cual deja la tabla VIII.2.

| Valor de adherencia (MPa) | Caso A (220 mm) | Caso B (200 mm) | Caso C (240 mm) | Caso D (200 mm) |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 54 ± 8 | 57 ± 9 | 52 ± 9 | 64 ± 8 |

Tabla VIII.2. Valores óptimos de adherencia por bond strength test

Los valores obtenidos para los cuatro óptimos son significativamente superiores a otros referenciados: M. Gaona et al. [5] obtuvieron valores promedio de 45 MPa para recubrimientos de HAp obtenidos por HVOF y de 40 MPa usando proyección plasma. Estos resultados indican el efecto positivo de la adición de titania, con mejores propiedades mecánicas que la hidroxiapatita y menores tensiones residuales [6,7], lo cual contribuye a mejorar la adherencia del recubrimiento. Este efecto es particularmente evidente en estudios como el realizado por Lima et al. [8], en los cuales se obtienen valores de adherencia de alrededor de 70MPa en recubrimientos con elevados porcentajes de titania (80-90%) obtenidos por HVOF.

La diferencia en la adherencia por bond strength test usando un 20 o un 40% de titania en el polvo inicial es despreciable, y los máximos obtenidos son similares, de acuerdo con los estudios realizados por Ferrer et al. [9]. Por esta razón, la mezcla con un menor porcentaje de TiO₂ (20%) se considera preferible, ya que presentará unas mejores propiedades biológicas por la mayor bioactividad de la HAp. Las regulaciones de la FDA [10] establecen una adherencia mínima de 51MPa para recubrimientos de fosfatos cálcicos empleados en aplicaciones ortopédicas y dentales, lo cual hace que los valores obtenidos con el 20 o el 40% de titania sean suficientes para esta aplicación.

El caso D, con una microestructura más densa, una menor proporción de defectos y una menor cantidad de fase amorfa presenta los mejores valores de adherencia por bond strength test, como era de esperar.

VIII.2.2. Valores de adherencia tras inmersión

Se tomó como fluido fisiológico simulado la solución comercial Hanks por cuestiones prácticas y similitud de resultados.

Los resultados de adherencia después de distintos tiempos de inmersión se pueden ver en la Tabla VIII.3., para las distancias definidas como óptimas para cada caso.

| Adherencia (MPa) | Caso A | Caso B | Caso C | Caso D |
|------------------|--------|--------|--------|--------|
| Inmersión 1d | 17 ± 5 | 18 ± 3 | 17 ± 3 | 21 ± 4 |
| Inmersión 7d | 16 ± 3 | 18 ± 4 | 15 ± 1 | 19 ± 5 |

Tabla VIII.3. Valores de adherencia post-inmersión en solución Hanks

Se obtienen máximos tras 1 día de inmersión en torno a 20 MPa, y prácticamente idénticos tras 7 días de inmersión. Por otra parte, el caso para el que se obtienen los mejores valores de adherencia post-inmersión es el caso D, con menor cuantía de fase amorfa, lo cual corrobora el hecho de que el caso D se revela como el que menos problemas de descohesión presentará. La ausencia de pérdida de adherencia entre 1 y 7 días indica que toda o la mayor parte de la HAp amorfa, presente en la interfaz de unión sustrato-recubrimiento, se ha disuelto.

VIII.3. Tenacidad a fractura y scratch test.

Como un peligro de este tipo de recubrimientos es que se expandan grietas de forma paralela a la interfaz sustrato-recubrimiento ya que esta dirección es mucho más débil que la perpendicular por el proceso de deposición de capas [11], se ha considerado necesario evaluar la tenacidad a fractura tanto en mitad del recubrimiento, en sentido paralelo a la interfaz, como en la propia interfaz. Asimismo, los ensayos de scratch test complementarán esta información.

Se tomaron tres tipos de muestras obtenidas en diferentes condiciones para evaluar sus propiedades con medidas de tenacidad a fractura y ensayos de scratch test y relacionarlas con los resultados del análisis de fases: las muestras estudiadas en esta tesis (80%HAp-20%TiO₂), y dos más a modo comparativo, para evaluar la importancia del TiO₂ en la mezcla: de 100% HAp y con una combinación de 60%HAp-40%TiO₂. Las condiciones de proyección se pueden ver en la Tabla VIII.4..

| | 100%H Ap | 80%HAp-20%TiO ₂ | | | | 60%HAp- 40%TiO ₂ |
|-------------------------|-------------|----------------------------|------|------|------|--------------------------------|
| | | A | B | C | D | |
| O ₂ (l/min) | 278 | 253 | 240 | 278 | 265 | 253 |
| Propileno (l/min) | 81 | | | | | |
| Aire comprimido (l/min) | 203 | 203 | 264 | 203 | 264 | 203 |
| Oxígeno/Propileno | 3.96 | 3.65 | 3.65 | 3.96 | 3.96 | 3.65 |
| Número de capas | 7 | 5 | | | | 5 |
| Distancias (mm) | 240 | 200-220-240 | | | | 200 |

Tabla VIII.4. Condiciones de proyección de todos los casos

Asimismo, un resumen de los detalles microestructurales de puede ver en la Tabla VIII.5., acompañado por una imagen-resumen de la microestructura de los diferentes casos estudiados (Figura VIII.2.).

| Casos estudiados | Espesor (μm) | Porosidad (%) | Presencia de grietas |
|------------------|--------------|---------------|------------------------------|
| HAp | 114±4 | 8-12% | Detectable |
| A | 117±7 | 8-12% | Superpuestas con porosidad |
| B | 110±8 | 5-8% | Detectable |
| C | 117±9 | 5-8% | Detectable |
| D | 122±15 | <5% | Casi indetectable |
| 60-40 | 110±5 | 5-8% | Superpuestas con descohesión |

Tabla VIII.5. Detalles microestructurales

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

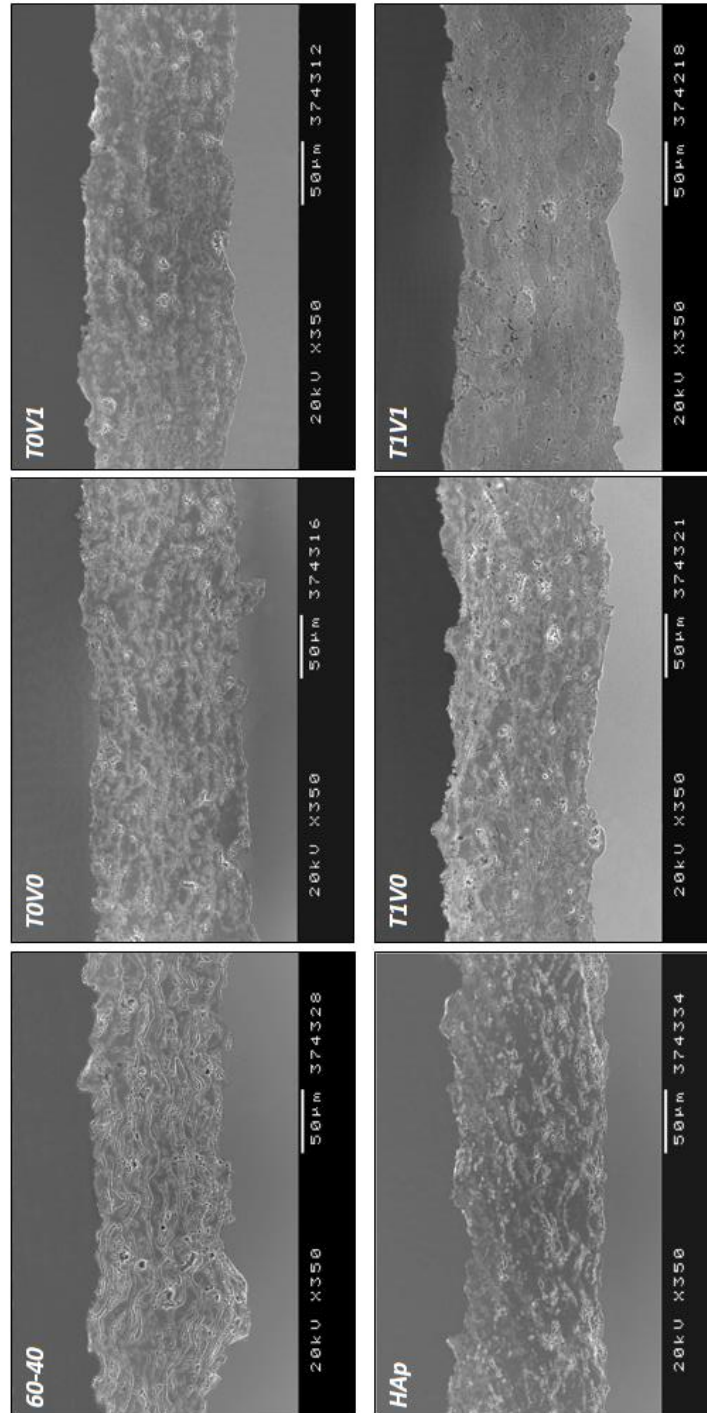


Figura VIII.2. Sección transversal de los recubrimientos estudiados

VIII.3.1. Tenacidad a fractura

Los cálculos del módulo de Young (E) y la tenacidad a fractura (K_{Ic}) se determinaron en dirección paralela a la interfaz sustrato-recubrimiento (la dirección más débil), dando una medida de las propiedades cohesivas del recubrimiento. Los resultados se pueden observar en las Figuras VIII.3. y VIII.4..

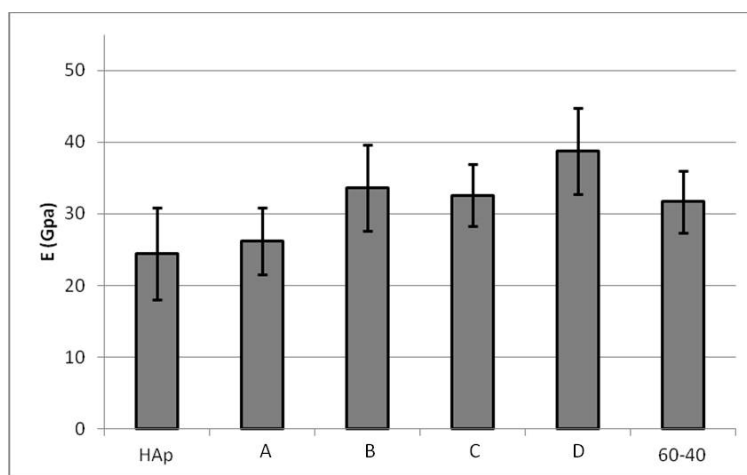


Figura VIII.3. Módulo de Young para los diferentes casos

La presencia de TiO_2 aumentó el módulo de Young (Figura VIII.3.) de las muestras correspondientes, aunque su variación entre las muestras 80-20 con valores más altos y las 60-40 no es trascendente. Otros autores [6] ya habían detectado una mejora de las propiedades mecánicas con la mera adición de TiO_2 , y una menor influencia de la cantidad añadida. Se puede atribuir el aumento de E con la presencia de TiO_2 a los cambios en las tensiones residuales [6,7], ya que éste último tiene un coeficiente de expansión térmica menor que el de la hidroxiapatita, lo cual permite reducir las tensiones residuales del recubrimiento durante la proyección y posterior enfriamiento del recubrimiento obtenido. Si se comparan los cuatro casos 80-20 entre ellos,

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

se encuentra que, aunque las diferencias no sean significativas, se obtienen mayores valores de E (alrededor de 40MPa) para el caso D, con la menor cantidad de fase amorfa. Esto se puede relacionar con la mayor dureza y resistencia mecánica de la fase cristalina del recubrimiento, de ahí que se obtengan menores valores de E para los casos con mayores cantidades de fase amorfa, A y C (entre 25 y 32 MPa).

Con los resultados de K_{Ic} (Figura VIII.4.) ocurre lo mismo que para E y los valores de adherencia: es notable la presencia de TiO₂, pero no lo es el cambio de un 20% a un 40% de TiO₂: se puede observar un aumento del K_{Ic} con la presencia de TiO₂, lo que se atribuye al aumento de energía necesario para extender una grieta cuando hay una segunda fase presente [12], ya que debe atravesar un mayor número de interfaces para propagarse, pero el hecho de que esta mejora no sea lineal con la cantidad de TiO₂ en la mezcla es un indicio de la influencia de otros factores como grietas, poros, etc. en esta propiedad (así como en el módulo de Young y el valor de adherencia, donde también se producía este fenómeno).

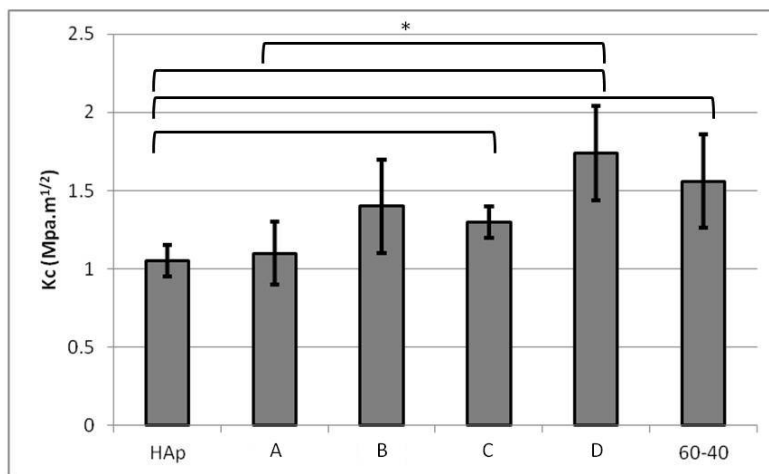


Figura VIII.4. Valores de tenacidad a fractura (K_{Ic}) para los diferentes casos

Si se comparan los cuatro casos 80-20, se obtienen valores mayores de K_{Ic} para el caso D (casi $2 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$), con una menor cantidad de fase amorfa; y valores menores para los casos A y C (por debajo de $1,5 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$), con mayores cantidades de fase amorfa. Esto se contradice con la creencia (presente en bibliografía [13]) de que la fase amorfa mejoraría los valores de K_{Ic} , pero se ha atribuido esta discrepancia al hecho de que los casos con mayor fase amorfa son también los de mayor velocidad de haz y por tanto mayor compactación, lo cual provocaría que la propagación de la grieta se dificultara por la menor porosidad y la mayor compactación de interfaces partícula-partícula. Por tanto, de acuerdo con los valores superiores obtenidos para los casos con menor cantidad de fase amorfa pero mayor compactación, ésta última tendría una mayor influencia en el calor de K_{Ic} de estos recubrimientos. Se pueden identificar en la Figura VIII.5. varios mecanismos de refuerzo típicos de matrices cerámicas.

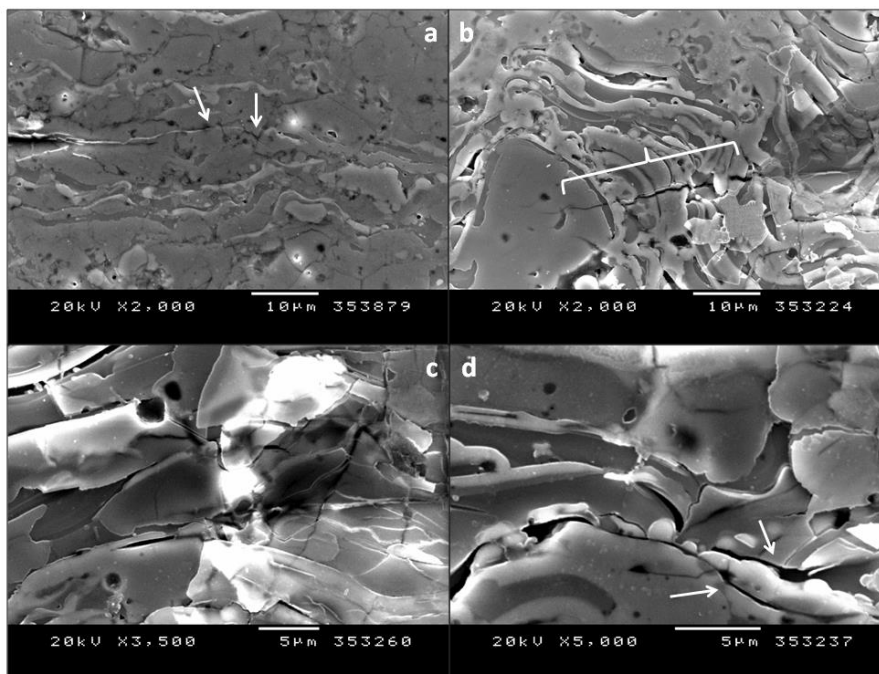


Figure VIII.5. Crack propagation

Un ejemplo es la deflexión de las grietas (Figura VIII.5.d) [14]. Cuando una grieta que se está propagando encuentra una interfaz con una partícula de TiO₂, únicamente tiene dos posibilidades: cruzar la partícula, que requiere un aporte de energía, o deflejar su trayectoria. Ésta es la razón de que muchas grietas rodeen las partículas de TiO₂. También es notable la presencia de microgrietas en la estructura [15], un efecto típico en los recubrimientos obtenidos por proyección térmica, debido al rápido enfriamiento y a la diferencia entre el coeficiente de expansión térmica del recubrimiento y el sustrato. Estas microgrietas pueden absorber parte de la energía de propagación de las grietas (Figuras VIII.5.a y b), pero de cualquier modo, como en el proceso de proyección térmica la formación, distribución y orientación de grietas no es un proceso controlado, no se puede asegurar que el papel de estas microgrietas sea positivo.

Algunos autores [16,17] apuntan a un posible mecanismo de endurecimiento por transformación con las fases derivadas de la HAp. Específicamente, se ha dicho que, en presencia de tensiones derivadas de la propagación de grietas, la HAp transforma a fase TCP, con mayores volúmenes específicos, y por tanto se requeriría una mayor energía para su propagación. Este efecto podría también influir en la trayectoria de la grieta, aunque ensayos de micro-Raman deberían realizarse para clarificar si efectivamente se produce este fenómeno en este caso o no.

VIII.3.2. Tenacidad a la fractura interfacial

En el test IIF se observó en primer lugar que la interfaz recubrimiento-sustrato se podía considerar tenaz, ya que sólo el 30-40% de las indentaciones hechas con el máximo ángulo que podía causar grietas llegaban realmente a la

interfaz y causaban una cierta descohesión entre el recubrimiento y el sustrato (Figuras VIII.6.a y b).

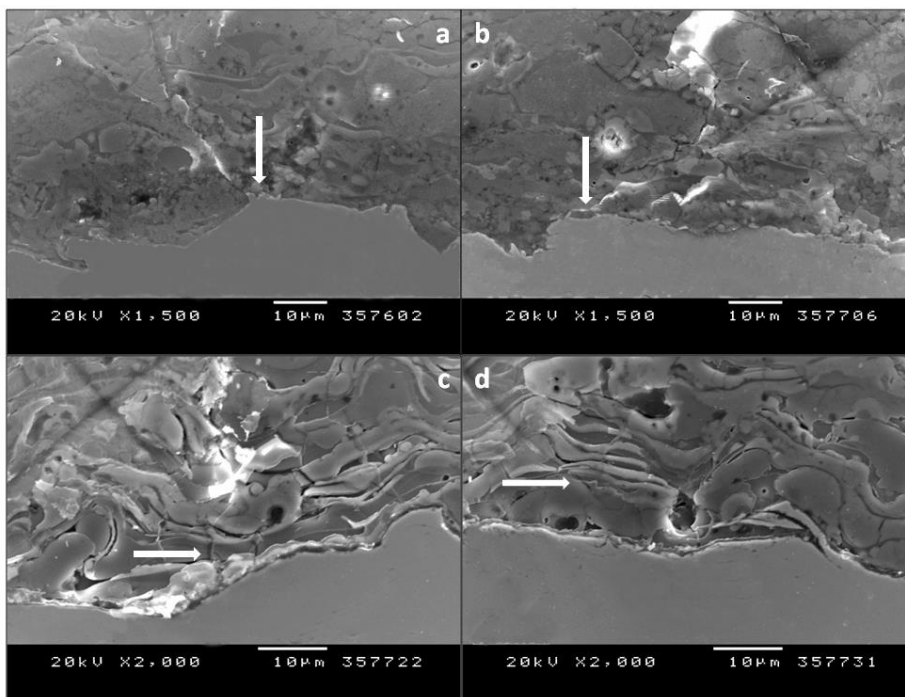


Figura VIII.6. Propagación de grietas en la interfaz

Como consecuencia de la baja cantidad de grietas que llegaban a la interfaz, en lugar de graficar la longitud de la descohesión l_{db} vs. el ángulo de incidencia, que es el procedimiento estándar, sólo se listó el ángulo máximo que podía causar descohesión (Tabla VIII.6.).

| | | | | | |
|---------|------|---|---|------|---------|
| 100-0 | A | B | C | D | 60-40 |
| ≈70-80° | ≈70° | | | ≈60° | ≈45-50° |

Tabla VIII.6. Ángulo máximo que causa una cierta descohesión en la interfaz

Como se explica en el método experimental, los casos que requieren ángulos de incidencia inferiores (es decir, grietas más paralelas a la interfaz, de más fácil propagación hasta ella) para inducir la pérdida de adherencia en la

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

interfaz corresponden a los casos con una mayor tenacidad a fractura de sus interfaces. Los ángulos medidos (Tabla VIII.6.) son consistentes con los resultados de K_{Ic} calculados previamente. El recubrimiento de HAp muestra el ángulo mayor ($\approx 80^\circ$), lo cual está lógicamente relacionado con el valor más bajo de K_{Ic} encontrado previamente; en cambio, el ángulo menor obtenido para la muestra de 60-40 ($\approx 50^\circ$) está relacionado con el aumento de la presencia de TiO₂.

Esta mayor cantidad de partículas de TiO₂ reduce el porcentaje de grietas que causan la pérdida de adherencia, debido a la pérdida de energía de propagación antes de que las grietas alcancen el sustrato, y aumenta el ángulo de descohesión. Las muestras 80-20 presentan un comportamiento intermedio. No se encontraron diferencias significativas en los resultados de tenacidad interfacial para A, B y C, con ángulos similares; y sólo D presentaba valores diferentes, con ángulos ligeramente menores y una consiguiente mayor tenacidad a fractura de la interfaz. Como se argumentó para los valores K_{Ic} , el hecho de que el caso D presente la mayor tenacidad a fractura interfacial teniendo el menor contenido de fase amorfa se atribuye a la gran influencia de la compacidad del recubrimiento (debido a la mayor velocidad de las partículas del caso D, la mayor de los cuatro casos).

Se mantiene la relación entre los valores de K_{Ic} y de tenacidad a la fractura interfacial para casi todos los casos (100, 80-20 y 60-40), principalmente debido a que la fase amorfa en estos recubrimientos no se encuentra sólo en la interfaz, sino muy distribuida en el recubrimiento [18]: si la fase amorfa se concentrara en la interfaz, el efecto sobre la tenacidad a la fractura interfacial sería posiblemente muy importante. Sin embargo, es evidente que las indentaciones cerca del sustrato producen menos daño en la zona circundante que las realizadas en otras zonas de los recubrimientos, lo cual es un signo de una tenacidad a fractura más elevada. La conclusión es que, aunque la relación

entre las muestras se mantiene con respecto a la K_{Ic} calculada, hay una compacidad mayor cerca del sustrato que puede causar una tenacidad a la fractura más elevada.

VIII.3.3. Scratch test

El promedio de las cargas críticas y sus desviaciones estándar obtenidos en ensayos de rayado (scratch test) se dan en la Figura VIII.7..

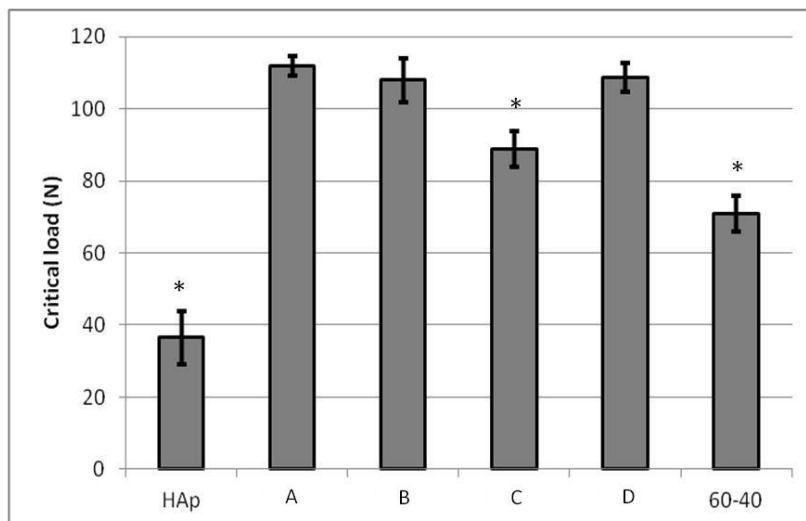


Figura VIII.7. Cargas críticas para las condiciones estudiadas

No se encontraron diferencias significativas entre las muestras A, B y D (alrededor de 110 N), que mostraron las mayores cargas críticas. Sólo la muestra con mayor cantidad de fase amorfa, C, presentaba un valor menor de carga crítica (en torno a los 90N). Esto podría explicarse por el hecho de que la fase amorfa tiene propiedades mecánicas muy bajas, lo que podría hacer más fácil alcanzar el sustrato con una carga menor. Un material más maleable puede ser fácilmente arrastrado por el indentador. Las muestras de 100%HAp presentaron una carga crítica extremadamente baja: las menores durezas y

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

propiedades mecánicas de la HAp (así como la mayor cantidad de fase amorfa de acuerdo con bibliografía) pueden facilitar el arrastre del material con una carga menor. La ausencia de partículas de TiO₂ y, como consecuencia, de las interfaces material-material en la estructura permitió que el indentador alcanzara el sustrato más fácilmente. Sin embargo, en el caso 60-40, la carga crítica fue menor que en las muestras de la A a la D (80-20). El aumento de una segunda fase en la matriz de HAp, que debería impedir la propagación de grietas y el avance del indentador, conduciendo a una necesidad de mayores cargas, se compensa por el hecho de que la fase de TiO₂ es más dura y quebradiza. Esto hace que la propagación de las grietas y el avance del indentador sea más fácil en las zonas de TiO₂, y explica que la carga crítica sea menor que en la mezcla de 80-20. Esta disminución de las propiedades mecánicas con un mayor porcentaje de TiO₂ también fue observada por Khor et al. [6], que la atribuyó a la formación de nuevos compuestos que no se observaron en este trabajo.

Todas las condiciones mostraron la formación de grietas que empezaron a bajas cargas (4-10 N) y se desarrollaron hasta la descohesión del recubrimiento y el sustrato, como se puede observar en la Figura VIII.8..

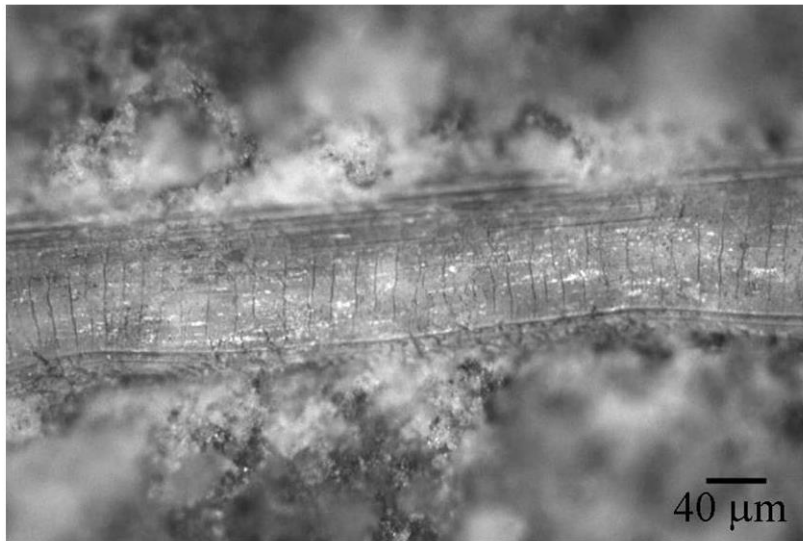


Figura VIII.8. Camino causado por el ensayo de rayado

VIII.3.4. Tensiones residuales

Como es bien sabido que la tenacidad a fractura está muy relacionada con las tensiones residuales [19], se consideró la posibilidad de evaluarlas.

Se intentó hacer mediante DRX, y se obtuvieron resultados en los que se observaban diferencias entre los distintos casos. Estos resultados se presentan a continuación, en la Tabla VIII.7., donde se indican las tensiones residuales en las dirección principal de 90° o paralela a la pasada de proyección. Aunque se consideraron cuatro direcciones, sólo se ha incluido esta dirección porque es la que se consideró en los cálculos de tenacidad a la fractura. No se han indicado las tensiones de cizalla porque estadísticamente eran equivalentes a cero.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

| $\Phi=90^\circ$ | Tensiones residuales (MPa) |
|-----------------|----------------------------|
| Caso A | -63,8±4,3 |
| Caso B | -51,4±4,9 |
| Caso C | -64,0±5,9 |
| Caso D | -35,5±4,9 |

Tabla VIII.7. Resultados de tensiones residuales a $\Phi=90^\circ$

La primera observación que se puede realizar es que existen diferencias entre los distintos casos, que indican que el caso D sería el que presenta menor tensión residual, siendo ésta de compresión, lo cual está posiblemente relacionado con la menor degradación térmica que se produce en este caso. También en el resto de casos los valores de tensiones residuales que se obtienen son de compresión. Asimismo se puede ver que el caso C es el que presenta mayores tensiones residuales por la razón contraria (mayor degradación térmica), aunque el valor obtenido es equivalente al presentado por el caso A, el segundo con mayor degradación térmica.

A pesar de estas diferencias observadas, los resultados se valoraron con relatividad por varias razones. Una de ellas es la poca linealidad del conjunto de puntos resultante del acercamiento asintótico al ángulo analizado, especialmente marcada en algunos casos, que hacen de la medida resultante de esta aproximación un valor poco preciso, y son un claro indicio de que las limitaciones de la técnica para medirlos [20]. La falta de linealidad indica la gran influencia de otros factores como los gradientes de tensiones interior-exterior o la rugosidad de la superficie, que no se han tenido en cuenta en la medida [20], así como la posible superposición del pico estudiado con otros. Otra razón importante es el hecho de que la medida apenas penetra unas pocas micras hacia el interior del recubrimiento [21], y las tensiones residuales

que nos preocupan se sitúan preferentemente en el centro o en la zona de la interfaz de los recubrimientos [22]. De hecho, se espera que las tensiones residuales en el interior sean de tracción [23]. Los valores de tensión a compresión obtenidos para los cuatro casos pueden considerarse una indicación de la tendencia que seguirán los valores de tensión a tracción cerca de la interfaz. Se puede esperar que la distribución de tensiones a un lado y otro de la fibra neutra del recubrimiento sea simétrica, y por tanto que el caso C, con mayor degradación térmica y mayores tensiones a compresión en la superficie del recubrimiento, sea el que mayores tensiones a tracción presenta en la interfaz recubrimiento-sustrato, lo cual concuerda perfectamente con lo esperado y con las peores propiedades mecánicas obtenidas para este caso. Y lo mismo ocurriría con los otros casos.

Se consideró la posibilidad de desbastar el recubrimiento hasta llegar a las capas interiores, pero se desechó esta idea tanto por la posibilidad de, a pesar de emplear un pulido suave y de la presencia en literatura de artículos que emplean esta técnica para evaluar tensiones residuales en el interior de recubrimientos, inducir nuevas tensiones que enmascararan las reales (según lo encontrado por Kruszynski y Wojcik [24]), así como por el hecho de que la redistribución de las tensiones al eliminar una parte del recubrimiento falseara los resultados.

VIII.4. Desgaste de los recubrimientos

Una propiedad poco estudiada para recubrimientos de estas características es el desgaste. Hay multitud de artículos centrados en el desgaste en juntas ortopédicas [25,26], pero casi ninguno centrado en el desgaste desde el momento de la implantación hasta la completa estabilización de éste. Así

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

pues, se ha decidido enfocar esta sección como una primera evaluación de cuál de los cuatro casos 80-20 estudiados presentaría las mejores propiedades a desgaste.

Los tests de deslizamiento muestran un régimen de fricción en estado estacionario a los 15 min del inicio de la prueba (Figura VIII.9.).

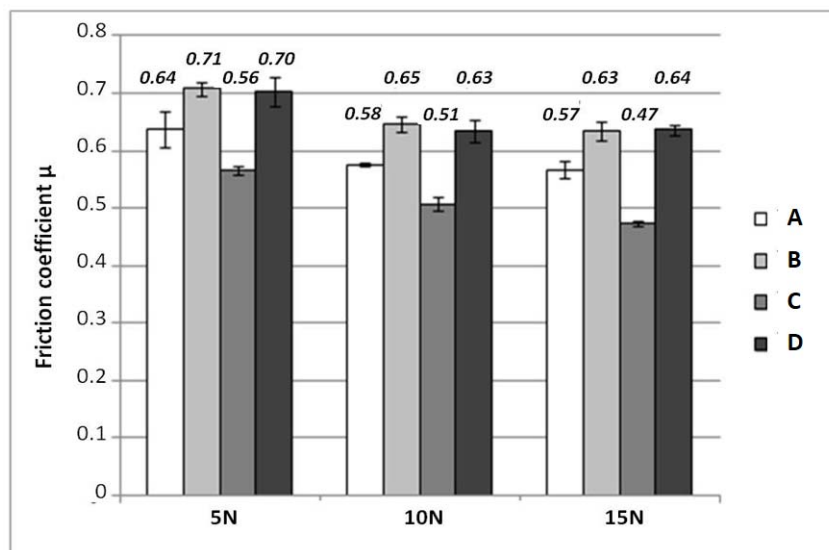


Figure VIII.9. Valores del coeficiente de fricción

Existen muy pocos estudios enfocados en el comportamiento a desgaste de los recubrimientos de hidroxiapatita, y la mayoría de ellos se concentran en el comportamiento a “fretting” [27,28], los recubrimientos articulares [29] o los recubrimientos simulando esmalte [30]. Sólo se encontró un artículo que reportara el comportamiento a desgaste de recubrimientos de hidroxiapatita en el momento de la implantación [31], y éste hacía hincapié en la influencia de la rugosidad en su comportamiento. En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de rugosidad superficial de las cuatro condiciones estudiadas ($R_a \approx 3-4$ micras), y dado que

el coeficiente de fricción se estabilizó después tras unos minutos de ensayo, se consideró más útil estudiar las diferencias entre los valores medios del coeficiente de fricción en el régimen estacionario, ya que estos supondrían unos resultados más significativos para la caracterización de la respuesta a fricción de los recubrimientos. La tendencia general del coeficiente de fricción es una disminución al aumentar la carga normal. Esto es especialmente pronunciado entre 5 N y 10 N, posiblemente debido a la elevada influencia, en estas cargas bajas, de la rugosidad inicial de la superficie del recubrimiento. Además, la disminución progresiva en el coeficiente de fricción puede estar afectada por el aumento de la temperatura con la carga [32,33], que podría facilitar el deslizamiento y disminuir la fricción. Entre 10N y 15N, la disminución no es significativa, y se puede concluir que una vez que se supera una carga crítica, la rugosidad inicial de la superficie y el aumento de la temperatura de la interfaz no tienen ninguna influencia significativa, y el coeficiente medio de fricción en estado estacionario se mantiene constante.

Cuando se analizaron las diferencias entre condiciones, los casos B y D presentaban los coeficientes de fricción más elevados, mientras que C tenía el coeficiente de fricción más bajo y A un valor intermedio. Como las diferencias entre los valores de rugosidad superficial de las diferentes muestras no eran significativos, y las muestras ya no presentaban esta rugosidad inicial tras el ensayo, los resultados se interpretaron como una consecuencia de la microestructura y la composición de cada caso. B y especialmente D presentan la microestructura más compacta y los valores de dureza más altos, lo que podría haber interferido con el deslizamiento de la bola en la superficie. En contraste, A presenta la peor microestructura de las cuatro. La presencia de grietas y poros da una dureza general inferior, y, como consecuencia, una menor resistencia al deslizamiento de la bola. C presenta una microestructura similar a la de B, pero su valor de dureza es menor, lo que podría explicar su

comportamiento intermedio. Además, según los cálculos de Rietveld, D y B presentan los porcentajes más bajos de fase amorfa, mientras que C y A presentan los mayores. Esto podría estar relacionado con los valores de dureza y los coeficientes de fricción, por el hecho de que la fase cristalina, que es mecánicamente más resistente que la fase amorfa, dota al sistema con mayor resistencia al desgaste, y tiene una interacción más fuerte con la bola de alúmina, una disipación de energía más elevada debido a la fricción y, como consecuencia, un coeficiente de fricción más alto. De hecho, la literatura corrobora la afirmación de que las zonas cristalinas son las principales contribuyentes a las fuerzas de inserción y la abrasión resultante, mientras que las áreas más blandas son fácilmente arrancadas durante la abrasión [31]. Por consiguiente, la condición C, con un mayor porcentaje de fase amorfa, presenta una menor resistencia al deslizamiento de la bola y un menor coeficiente de fricción, mientras que en contraste, las condiciones más cristalinas, B y D, muestran coeficientes de fricción superiores. Como se ha mencionado más arriba, A tiene una cantidad intermedia de fase amorfa y un coeficiente de fricción intermedio.

De acuerdo con la literatura [34], un coeficiente de fricción más alto puede facilitar la fijación del implante una vez situado en su ubicación, a la vez que proporcionar la estabilidad necesaria para el crecimiento óseo, por lo que se puede concluir que, en este sentido, los coeficientes de fricción más altos serían preferibles. Sin embargo, la respuesta a la fricción estudiada corresponde a los valores de coeficientes de fricción dinámica, y se necesitarían otros estudios para determinar los coeficientes de fricción estática, indicativos de la fijación en condiciones estáticas, con el fin de corroborar el comportamiento descrito en este trabajo.

La Figura VIII.10. muestra los resultados del coeficiente de desgaste para cada condición y carga.

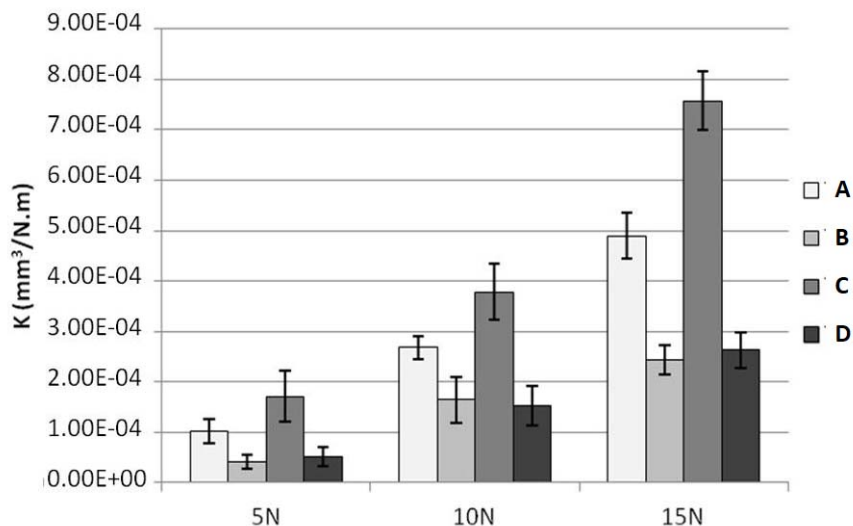


Figura VIII.10. Coeficiente de desgaste para cada condición y carga

Se observa un aumento de volumen de desgaste con la carga -una de las leyes básicas de desgaste, ya que una mayor carga normal implica más tensión de contacto y un aumento de la pérdida de volumen [35]. Un análisis de las diferencias entre las condiciones muestra que para las tres cargas normales, se obtiene el mayor volumen de desgaste para el caso C, seguido por el caso A, mientras que los volúmenes más bajos se obtienen para los casos D y B. Relacionando este comportamiento con la microestructura y las fases presentes en los recubrimientos, es posible concluir que la condición con el más alto porcentaje de fase amorfa, una microestructura intermedia y una menor dureza consecuente (caso C) presenta el volumen de desgaste más elevado, mientras que los menores volúmenes de desgaste se obtienen con las condiciones de mayor compactación, menor porosidad y presencia de grietas, menor cantidad de fase amorfa y mayor dureza (D y B). Esto se puede explicar utilizando el mismo argumento dado para los coeficientes de fricción:

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

los defectos en el recubrimiento (poros y grietas) facilitan la pérdida de recubrimiento con el deslizamiento de la bola de ensayo, mientras que la fase amorfa tiene menor resistencia mecánica y se desgasta fácilmente como resultado de la interacción con la bola de alúmina. Por tanto, los casos con poros, grietas y/o una cantidad importante de fase amorfa (A, C) tienen una dureza inferior, y se pierde un volumen mayor con el deslizamiento de la bola, incluso con un menor coeficiente de fricción. Por el contrario, los casos con una microestructura más compacta y homogénea, sin tantos poros o grietas, y/o una menor cantidad de fase amorfa (D, B), presentan valores de dureza más altos, y un ratio de desgaste inferior, pero un coeficiente de fricción más elevado.

Para fines biomédicos es importante evitar daños en el recubrimiento durante la implantación, con el fin de mantener la funcionalidad [36]. Por tanto, un volumen de desgaste inferior es preferible, ya que esto asegurará una mejor condición del recubrimiento. El hecho de que los volúmenes de desgaste más bajos se obtengan para las condiciones que presentan coeficientes de fricción más elevados indica que estas condiciones podrían ser las mejores para esta aplicación.

Es de esperar que los principales mecanismos de desgaste cambien con la presión de contacto, lo cual es coherente con el aumento en el coeficiente de desgaste observado en la Figura VIII.10.. De acuerdo con la literatura, esto es de hecho lo que se produce con frecuencia [35], corroborando la idea de que "el desgaste se acelera con la carga", pero siempre acompañado de un aumento en la acción de los mecanismos de desgaste existentes y la intervención de otros nuevos. El análisis por SEM de las superficies permite el estudio de estos mecanismos (Figura VIII.11.).

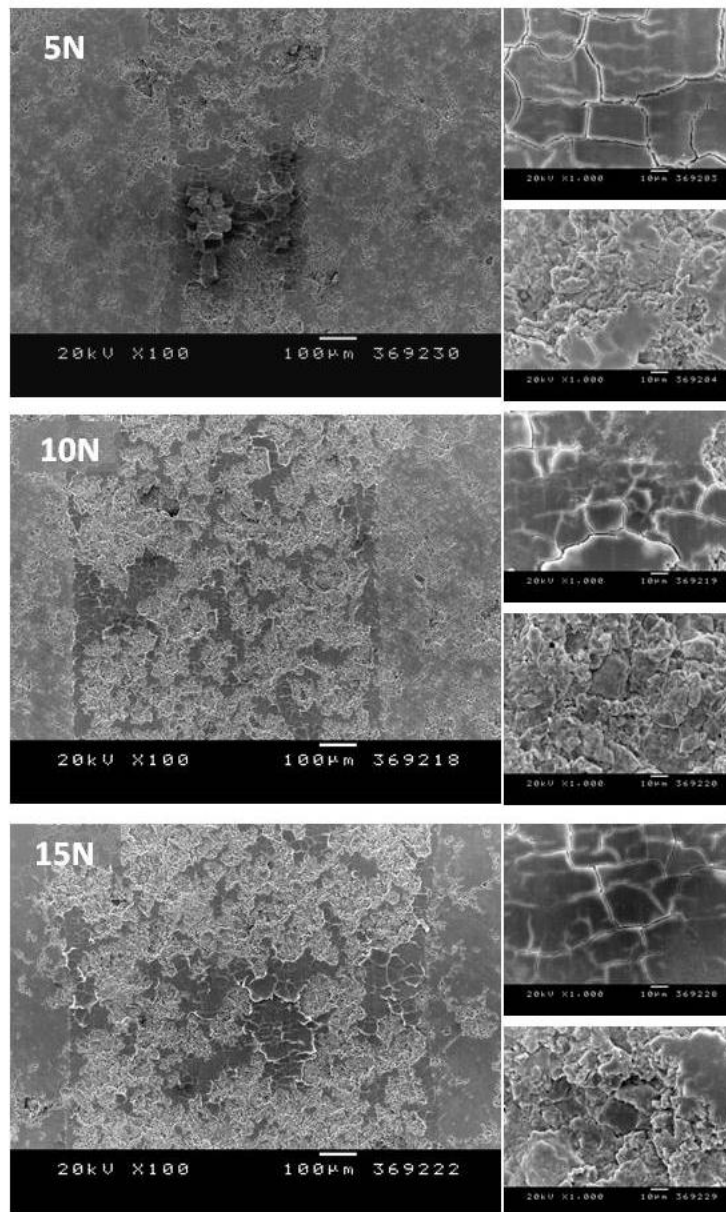


Figura VIII.11. Micrografías SEM del camino de desgaste a 5, 10 y 15N. Detalles de las zonas de microgrietas y delaminación para cada carga.

La primera observación es que la superficie de contacto de la bola no muestra signos de desgaste, y no se encontraron residuos de alúmina en los extremos de la pista, donde se hubieran acumulado de haberse desgastado la bola. Las

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

diferencias identificadas a través de la observación de las cuatro superficies no son significativas, pero las diferencias entre las cargas sí son más pronunciadas.

Para todas las cargas, la pista tiende a presentar zonas delaminadas, y la incidencia de estas zonas es más frecuente a mayores cargas. Otros estudios también han corroborado la aparición de delaminación en hidroxiapatitas sometidas a desgaste, debido a un proceso de fractura a pequeña escala que se produce con frecuencia durante el desgaste abrasivo de los materiales frágiles policristalinos [37,38]. Sin embargo, a cargas más bajas, aparecen zonas con grietas (derivadas del comportamiento a fatiga) y no hay evidencia de delaminación. Este comportamiento era esperado en términos generales, debido a que una carga más alta implica más energía para inducir la aparición de otros mecanismos de desgaste, tales como abrasión a tres cuerpos -con restos de revestimiento, por ejemplo- que provoca delaminación, aparte de la fatiga y agrietamiento de la superficie que se produce a cargas más bajas. El aumento del coeficiente de desgaste también puede ser explicado por las micrografías de la Figura VIII.11., ya que las cargas más altas promueven la delaminación frente a las grietas de fatiga. Otras referencias [37], sin embargo, encuentran que ambas zonas (grietas y delaminación) son, de hecho, una capa de transferencia de residuo del recubrimiento, con diferentes estructuras para cargas elevadas y bajas.

Como puede verse en la Figura VIII.11., el daño causado en el camino de desgaste por cargas más elevadas induce un aumento de la rugosidad de la superficie, lo que podría conducir a un aumento en el coeficiente de fricción. Sin embargo, de acuerdo con los resultados anteriores, se ha demostrado que éste no es el caso. Esto puede ser debido a diferentes causas: en primer lugar, las diferencias entre las cargas son notables pero no exageradas, ya que ambos mecanismos de desgaste aparecen en todas las condiciones; en segundo lugar,

la influencia de la carga puede ser eclipsada por la influencia de un aumento de la temperatura, como se ha mencionado en la sección sobre el coeficiente de fricción. Una posible acción de “rellenado de huecos” por el residuo del recubrimiento puede ser propuesto como explicación alternativa, ya que de acuerdo a los artículos sobre materiales similares, una capa de transferencia compuesta de partículas de desgaste compactadas se produce [37]. Otra posibilidad es que la solución Hanks tenga influencia en ello [31]. Es posible que la presencia de esta solución ablande algunas áreas del recubrimiento, disuelva material y facilite la delaminación y la pérdida de volumen sin un aumento en el coeficiente de fricción. Este proceso de disolución, llamado wash-out, provocaría una pérdida de 7% del peso total de un recubrimiento cristalino al 65% después de una hora de inmersión [31]. Las imágenes SEM no muestran evidencia de este proceso de disolución, pero esto podría ser considerado lógico dado que el desgaste en la disolución es un proceso continuo.

VIII.5. Conclusiones

Tras el amplio análisis de las propiedades mecánicas de estos recubrimientos, se ha podido llegar a una serie de conclusiones importantes. Tanto la adición de TiO_2 como la sustitución de la proyección plasma por proyección térmica de alta velocidad suponen una mejora en las propiedades mecánicas de los recubrimientos obtenidos. Concretando ensayo por ensayo, se puede decir que la presencia de TiO_2 mejora tanto la adherencia como la tenacidad a fractura de los recubrimientos, con una menor influencia de la cantidad presente. Sin embargo, en los ensayos de rayado, sí se ha detectado que la cantidad de TiO_2 es importante: existe un compromiso entre la adición de una segunda fase a la matriz de HAp, que dificulta la propagación de grietas, y el

hecho de que esta segunda fase es frágil y facilita la propagación de grietas dentro de las zonas de TiO₂. Un 20% incrementa la carga crítica en este ensayo, pero un 40% resulta excesivo y disminuye este valor. Por otra parte, de los cuatro casos 80-20, es el caso D, con mayor compactación y menor cantidad de fase amorfa, el que mejores resultados presenta en los tres ensayos. En cuanto a los ensayos de desgaste, éstos revelan un mecanismo de desgaste en algunas zonas del camino (presencia de grietas), pero también se detecta un mecanismo de abrasión que se intensifica a cargas elevadas. Los resultados muestran un elevado coeficiente de fricción y un menor volumen perdido para las condiciones con menos imperfecciones y menor cantidad de fases amorfas, que las hacen preferibles (D y B).

Por tanto, y como resumen, se puede decir que la combinación 80-20 da mejores propiedades mecánicas que las alternativas 100% HAp y 60-40; y que de los cuatro casos estudiados, uno de ellos, el caso D, se revela como el que mejor funcionalidad mecánica tiene y, por tanto, el que se comportará mejor mecánicamente una vez implantado en el cuerpo.

VIII.6. Referencias

[1] GJ Cheng, C Ye, Experiment, thermal simulation, and characterizations on transmission laser coating of hydroxyapatite on metal implant. J. Biomed. Mater. Res. Part A 92 (2010) 70-79.

[2] I Iordanova, V Antonov, CM sprecher, HK Skulev, B Gueorguiev, Plasma-sprayed bioceramic coatings on Ti-based substrates: methods for investigation

of their crystallographic structures and mechanical properties. En: H Jazi, editor. Advanced Plasma Spray Applications. InTech, available from: <http://www.intechopen.com/books/advanced-plasmaspray-applications/plasma-sprayed-bioceramic-coatings-on-ti-based-substrates-methods-for-investigation-oftheir-crystal> (2012).

[3] JT Ninomiya, JA Struve, CT Stelloh, JM Toth, KE Crosby, Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *J. Orthop. Res.* 19 (2001) 621-628.

[4] H Wie, H Hero, T Solheim, E Kleven, AM Rorvik, HR Haanaes, Bonding capacity in bone of HIP-processed HA-coated titanium: mechanical and histological investigations. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 29 (1995) 1443-1449.

[5] J Fernández, M Gaona, JM Guilemany, Effect of heat treatments on HVOF hydroxyapatite coatings. *J. Therm. Spray Technol.* 16 (2007) 220-228.

[6] H Li, KA Khor, P Cheang, Titanium dioxide reinforced hydroxyapatite coatings deposited by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray. *Biomaterials* 23 (2002) 85-91.

[7] DS Metsger, MR Rieger, DW Foreman, Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 10 (1999) 9-17.

[8] M Gaona, RS Lima, BR Marple, Nanostructured titania/hydroxyapatite composite coatings deposited by high velocity oxy-fuel (HVOF) spraying. *Mater. Sci. Eng. A-Struct. Mater. Prop. Microstruct. Process.* 458 (2007) 141-149.

[9] A Ferrer, IG Cano, J Fernández, JM Guilemany, On the Adhesion Relationship of Hydroxyapatite-Titania Coatings Obtained by HVOF. *Adv. Mater. Forum V* 636-637 (2010) 82-88.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- [10] FDA. Calcium phosphate (Ca-P) coating draft guidance for preparation of FDA submissions for orthopedic and dental endosseous implants. Food and Drug Administration (1992) 1–14.
- [11] H Li, KA Khor, P Cheang, Adhesive and bending failure of thermal sprayed hydroxyapatite coatings: effect of nanostructures at interface and crack propagation phenomenon during bending. *Eng. Fract. Mech.* 74 (2007) 1894-1903.
- [12] CB Carter, MG Norton, editores. *Ceramic Materials: Science and Engineering*. Springer, New York, USA (2007).
- [13] S Saber-Samandari, KA Gross, Amorphous calcium phosphate offers improved crack resistance: A design feature from nature? *Acta Biomater.* 7 (2011) 4235-4241.
- [14] JB Wachtman, WR Cannon, MJ Matthewson, editores. *Mechanical properties of Ceramics*. Wiley, New Jersey, USA (2009).
- [15] DJ Green, editor. *An introduction to the mechanical properties of ceramics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK (1998).
- [16] MA Lopes, FJ Monteiro, JD Santos, Glass Reinforced Hydroxyapatite composites: Fracture toughness and hardness dependance on microstructural characteristics. *Biomaterials* 20 (1999) 2085-2090.
- [17] MA Lopes, JD Santos, FJ Monteiro, JC Knowles, Glass-reinforced hydroxyapatite: A comprehensive study of the effect of glass composition on the crystallography of the composite. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 39 (1998) 244-251.
- [18] H Melero, J Fernández, S Dosta, JM Guilemany, Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante

Proyección Térmica de Alta Velocidad. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr. 50 (2011) 59-64.

[19] TL Panontin, MR Hill, The effect of residual stresses on brittle and ductile fracture initiation predicted by micromechanical models. Int. J. Fract. 82 (1996) 317-333.

[20] C Aparicio. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España (2005).

[21] A Juy, M Anglada, Aumento de las propiedades mecánicas de Y-TZP producido por tensiones residuales. VIII Congreso Nacional de propiedades mecánicas de sólidos. Gandia, España (2002).

[22] B Cofino, P Fogarassy, P Millet, A Lodini, Thermal residual stresses near the interface between plasma-sprayed hydroxyapatite coating and titanium substrate: finite element analysis and synchrotron radiation measurements. J. Biomed. Mater. Res. Part A 70 (2004) 20-27.

[23] F Otsubo, K Kishitake, T Terasaki, Residual stress distribution in thermally sprayed self-fluxing alloy coatings. Mater. Trans. 46 (2005) 2473-2477.

[24] BW Kruszynski, R Wojcik, Residual stress in grinding. J. Mater. Process. Technol. 109 (2001) 254-257.

[25] VM Tiainen, Amorphous carbon as a bio-mechanical coating – mechanical properties and biological applications. Diam. Relat. Mat. 10 (2001) 153-160.

[26] MT Raimondi, R Pietrabissa, The in-vivo wear performance of prosthetic femoral heads with titanium nitride coating. Biomaterials 21 (2000) 907-913.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- [27] Y Fu, AW Batchelor, Y Wang, KA Khor, Fretting wear behaviours of thermal sprayed hydroxyapatite (HA) coating under unlubricated conditions. *Wear* 217 (1998) 132–139.
- [28] Y Fu, AW Batchelor, KA Khor, Fretting wear behaviour of thermal sprayed hydroxyapatite coating lubricated with bovine albumin. *Wear* 230 (1999) 98–102.
- [29] M Younesi, ME Bahrololoom, Optimizations of wear resistance and toughness of hydroxyapatite nickel free stainless steel new bio-composites for using in total joint replacement. *Mater. Des.* 31 (2010) 234–243.
- [30] HM Rootare, JM Powers, RG Craig, Sintered hydroxyapatite ceramic for wear studies. *J. Dent. Res.* 57 (1978) 777–783.
- [31] KA Gross, M Babovic, Influence of abrasion on the surface characteristics of thermally sprayed hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 23 (2002) 4731–4737.
- [32] NP Suh, An overview of the delamination theory of wear. *Wear* 44 (1977) 1–16.
- [33] S Bahadur, The development of transfer layers and their role in polymer Tribology. *Wear* 245 (2000) 92–99.
- [34] JD Bobyn, KK Toh, SA Hacking, M Tanze, JJ Krygier, Tissue response to porous tantalum acetabular cups. A canine model. *J. Arthroplast.* 14 (1999) 347–354.
- [35] GW Stachowiak, AW Batchelor, editores. *Engineering Tribology*. Elsevier Buterworth-Heinemann, Oxford, UK (2005).

[36] I Önsten, AS Carlsson, L Sanzén, J Besjakov, Migration and wear of a hydroxyapatite-coated hip prosthesis. *J. Bone Joint Surg.-Br.* Vol. 78-B (1996) 85–91.

[37] M Kalin, S Jahanmir, LK Ives, Effect of counterface roughness on abrasive wear of hydroxyapatite. *Wear* 252 (2002) 679–685.

[38] HHK Xu, S Jahanmir, Microfracture and material removal in scratching of alumina. *J. Mater. Sci.* 30 (1995) 2235–2247.

Capítulo IX.

Comportamiento a corrosión

IX.1. Introducción

Una de las propiedades más importantes a analizar en recubrimientos que van a trabajar en condiciones fisiológicas es el comportamiento a corrosión. La destrucción del recubrimiento, y su consecuente pérdida de funcionalidad; la formación de especies dañinas para el organismo; o la migración de iones metálicos hacia los tejidos son algunas de las razones que hacen esencial el estudio de esta propiedad [1 - 5].

El capítulo se estructurará en dos partes: en la primera se detallarán todos los ensayos de corrosión realizados; en la segunda, se detallará la consecución de un dispositivo adecuado para la realización de ensayos en condiciones fisiológicas, necesario para algunos de los ensayos.

Los resultados de los ensayos también se pueden ver en el Anexo 4, en el artículo titulado "Corrosion resistance evaluation of HVOF-sprayed bioceramic coatings under simulated physiological conditions" H Melero, RT Sakai, PH Suegama, C Vignatti, AV Benedetti, J Fernández, JM Guilemany, enviado a la revista *Journal of Applied Electrochemistry*.

IX.2. Ensayos de corrosión

Esta parte se ha planteado como una comparación entre el recubrimiento que dio las mejores propiedades mecánicas (el caso D), un recubrimiento optimizado previamente con una composición del 100% de HAp (se pueden ver las condiciones de proyección en la Tabla VIII.4., y el sustrato granallado de TiAlV, realizando tanto ensayos de corrosión convencionales como ensayos de impedancia.

IX.2.1. Ensayos convencionales

Los primeros ensayos realizados fueron los convencionales, empezando por los potenciales de circuito abierto, seguidos de estudios de polarización.

Aunque la mayoría de los estudios de la bibliografía emplean únicamente períodos cortos de circuito abierto antes de iniciar las mediciones electroquímicas, se ha considerado más apropiado en este caso esperar durante 24 horas, ya que los materiales estudiados no mostraron una estabilización de la interfaz electrodo/solución para tiempos más cortos de inmersión. Las curvas de potenciales de circuito abierto vs. tiempo de la aleación Ti-6Al-4V con y sin recubrimiento (de 100%HAp y 80-20) en contacto con la solución de Hanks con y sin BSA se muestran en la Figura IX.1..

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

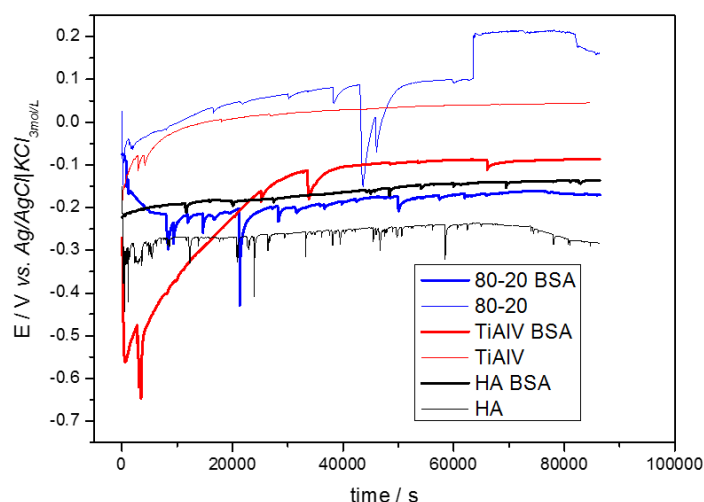


Figura IX.1. Medidas de potencial de circuito abierto adquiridas durante las primeras 24h de inmersión para las diferentes muestras con y sin BSA.

El primer comentario que se puede hacer sobre las curvas obtenidas es que todas las muestras presentan algunas oscilaciones de potencial que normalmente se asocian a la formación de picaduras o a la presencia de una película porosa. De acuerdo con la literatura [6], los recubrimientos de HAp de elevados espesores muestran amplias variaciones de potencial, que, de hecho, también se pueden observar en la Figura IX.1., lo cual se atribuye a la existencia de un “camino” de difusión en el interior del recubrimiento debido a la porosidad interconectada [7]. Por otra parte, el elevado número de puntos registrados, 1 punto/s, hizo que se detectaran fenómenos que ocurren en tiempos muy cortos (lo cual probablemente esté relacionado con la interacción del electrolito con el sustrato, produciendo activación-repasivación en la parte inferior de los poros).

El TiAlV sin recubrir presenta el valor más positivo de E_{oc} cuando el BSA está ausente: esto se puede atribuir a la formación de una capa de óxido entre el

proceso de granallado y la medición de OCP. La deposición de los recubrimientos sobre el sustrato de Ti-6Al-4V cambió el Eoc a valores más activos en el siguiente orden: TiAlV sin recubrir > 80-20 > HA. Sería esperable que la HAp, un material inerte, al ser aplicada en la superficie del sustrato, moviera el Eoc a valores más nobles, como se observa en muchos estudios [8,9,10-12,6,13,14]. Dos fenómenos se pueden proponer para explicar esta contradicción. El primero de ellos es la disolución de la fase amorfa que se produce en estos recubrimientos durante las primeras 24h [15,16], y la segunda es una consecuencia de la anterior, la porosidad del recubrimiento, mayor conforme pasa el tiempo de ensayo. Al aparecer esta porosidad, el electrolito puede alcanzar el sustrato a través del recubrimiento, formando una celda local [17] que induce la posterior corrosión. Este mecanismo se explica en numerosas referencias [18]: se forman protones por una reacción de corrosión del sustrato (por ejemplo Ti) con el agua en la parte inferior del poro; el pH disminuye localmente debido al hecho de que H^+ está prácticamente atrapado en la interfaz debido a la dificultad para salir de esa zona, y en una segunda etapa el protón disuelve la HAp cerca de la interfaz sustrato/HAp.

Las muestras 80-20 y TiAlV sin recubrir presentaron valores más negativos de Eoc con Hanks + BSA que sólo con Hanks. Como el BSA se adsorbe en la superficie del recubrimiento, es probable que se produzca algún tipo de interacción, y teniendo en cuenta esto, es posible que el potencial de la interfaz electrodo/solución disminuya. Aunque la literatura encuentra que el BSA mueve el Eoc a valores más negativos debido a un efecto quelante de la proteína para los recubrimientos de HAp [19], en este estudio los recubrimientos de HAp mostraron un potencial más noble en presencia de BSA, que puede estar asociado a una inestabilidad del recubrimiento debido a la disolución de la fase amorfa descrita anteriormente (menor para el caso 80-

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

20 que el caso 100%HAp), ya que los valores de E_{oc} y E_{corr} están vinculados a la estabilidad termodinámica de la interfaz recubrimiento/solución [10].

Las curvas de polarización cíclica se realizaron en solución de Hanks con y sin BSA a $5\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. IX.2.) desde $0,2\text{V}/E_{oc}$ hasta $2,0\text{V}$, y luego hasta $-1\text{V}/E_{oc}$.

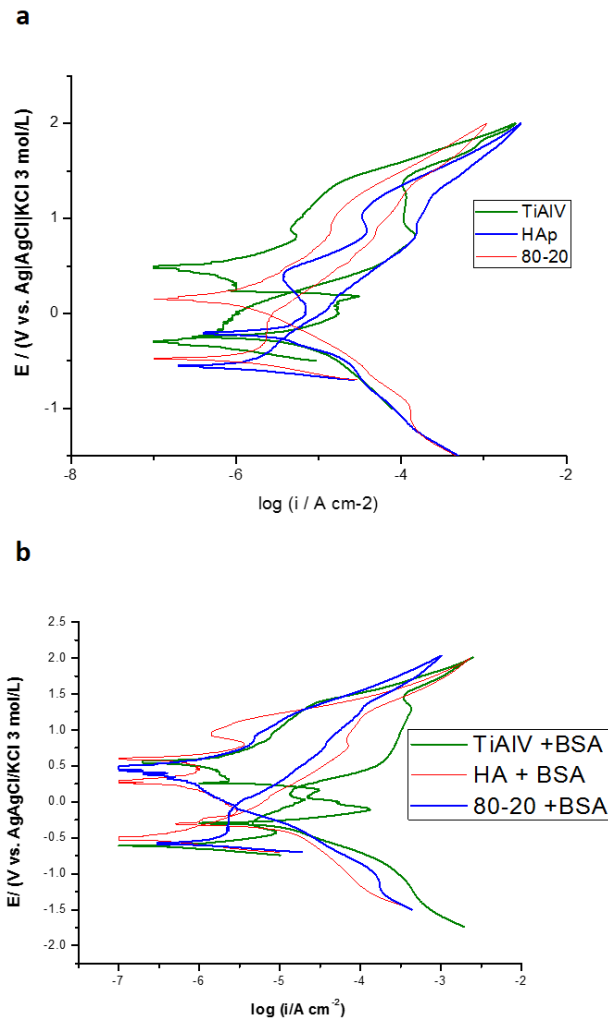


Figura IX.2. Curvas de polarización cíclica para los tres casos estudiados, a) sin BSA y b) con BSA

En primer lugar se analizó el tramo de curva directo (aumento de potencial). Los valores de E_{corr} son de alrededor $-0,50 \pm 0,05V$ para todas las muestras, excepto para el Ti-6Al-4V sin recubrir en ausencia de BSA, y presentan la misma tendencia observada en el circuito abierto, aunque los valores sufren un cierto desplazamiento debido a la elevada velocidad de ensayo [20]. Las tres superficies analizadas no presentaron ninguna diferencia sustancial en la densidad de corriente de corrosión, con y sin BSA. La muestra 80-20 era la única que mostraba una clara región pasiva desde alrededor de $-0,4V$ a $0V$ tanto en presencia como en ausencia de BSA, lo que indica la influencia benéfica de la adición de TiO_2 a la HAp, como ya fue observado por Lee et al. [11]. La muestra de HAp mostró un ligero aumento de la densidad de corriente para potenciales más positivos que E_{corr} , sin presentar zona pasiva, lo que sugiere una cierta disolución. En presencia de BSA, la densidad de corriente es, para todos los casos, mayor que en su ausencia, lo que indica que el BSA facilita el ataque al recubrimiento y/o sustrato debido a su comentada capacidad quelante [21]. En el caso del TiAlV con BSA, se observaron picos característicos de la oxidación del Ti y la corriente pasiva es la más elevada de las medidas para las muestras estudiadas. La superficie del TiAlV sin recubrir sin BSA exhibió un alto potencial de corrosión, lo que sugiere una cierta pasivación, pero la corriente anódica aumentó de manera continua desde alrededor de 0 hasta $0,8V$, probablemente por causa del óxido natural y deficiente formado en la superficie rugosa y activada. Según algunos autores [9], curvas de polarización potenciodinámica de muestras similares a los tres tipos de muestra estudiados mostraron que las recubiertas presentaron mayor E_{corr} y menor i_{corr} que la muestra sin recubrir, lo que corrobora los resultados en este estudio. La presencia de poros puede ser una ventaja para la osteointegración, pero puede representar un problema para luchar contra la corrosión.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

A continuación se consideró el tramo inverso de las curvas. Éstos no mostraron ruptura (breakdown), y sí una histéresis positiva, lo que significa que no se había formado pitting en la superficie del electrodo, lo cual concuerda con referencias varias [8,6] que estudian recubrimientos de HAp. La rama anódica para estas muestras de HAp de las referencias es similar a las mostradas en la Figura IX.2. y de nuevo la muestra 80-20 era la única que presentaba una región pasiva en el rango de bajo potencial, cuando todas las demás mostraron un aumento continuo de la densidad de corriente, con cierta tendencia a pasivar a alrededor de 1V, con menor pendiente en la curva E-log i. Tras este tramo, la dirección de las curvas se invirtió, y el nuevo tramo mostró un perfil E-log i muy diferente, siendo la respuesta casi característica de cada curva. Todas ellas mostraron tanto en presencia como en ausencia de BSA características de repasivación, i.e., al mismo potencial la corriente era menor en el tramo de vuelta que en de ida: el potencial de repasivación (E_{rep}) era siempre superior al de corrosión, pero la presencia de BSA resultó en la aparición de más de un potencial de repasivación, a excepción de la muestra 80-20 en presencia de BSA, que sólo mostraba un valor de E_{rep}. En ausencia de BSA no se observó ninguna diferencia significativa en la icorr estimada: $1,3 \cdot 10^{-6}$ A.cm⁻² para el TiAlV sin recubrir y la HAp, y $0,8 \cdot 10^{-6}$ A.cm⁻² para el caso 80-20; mientras que para la E_{rep} los valores eran +0,49V para el TiAlV sin recubrir, -0,20V para la HAp y +0,15V para el caso 80-20, indicando de nuevo que la presencia de TiO₂ mejora el desempeño del recubrimiento.

En presencia de BSA los valores estimados de icorr y los valores de E_{rep} eran respectivamente de $1 \cdot 10^{-6}$ A.cm⁻² y 0,56 V para el TiAlV sin recubrir; $0,5 \cdot 10^{-6}$ A.cm⁻² y 0,62 V para la HAp; y $1 \cdot 10^{-6}$ A.cm⁻² y 0,48 V para el caso 80-20. Sin embargo, en presencia de BSA, el recubrimiento de HAp mostró dos valores más de E_{rep} a bajos potenciales (+0,25 y -0,27 V), y el TiAlV uno más a -0,32 V, lo que hace difícil establecer una clasificación entre los recubrimientos en

presencia de BSA sobre la base de estos parámetros. Estas curvas también muestran las siguientes características importantes: (a) el TiAlV sin recubrir muestra dos picos de corriente anódicos a 0,8 V y alrededor de 1,7 V, seguidos por un aumento en la corriente hasta llegar a 2,4 mA.cm⁻² a 2,0 V. No se observan picos de corriente en el tramo inverso, y la corriente disminuye rápidamente a cero. Un comportamiento similar se observó para la muestra 80-20, con un menor pico de corriente anódico a 0,8 V y un “codo” a 1,6 V, así como una densidad de corriente en 2,0 V de 2,7 mA.cm⁻²; (b) la HAp no presenta picos de corriente anódicos, pero sí un aumento de la corriente a potenciales más altos que 1,4 V, alcanzando 1,08 mA.cm⁻² a 2,0 V. En el tramo inverso sólo se observa una disminución exponencial de la corriente. En base a estos comentarios la muestra con HAp parece ser la mejor en ausencia de BSA. En general, la presencia de BSA prácticamente no cambia el perfil I-E del sustrato, pero anticipa y ensancha los dos picos de corriente anódica de 0,7 y 1,3 V. En el tramo inverso la corriente disminuye exponencialmente hasta alrededor de cero, y pequeños picos catódicos aparecen desde 0,2 a -0,2 V. La muestra de 80-20 presenta el mismo perfil I-E que se observó en ausencia de BSA. Por otro lado, la presencia de BSA en la solución de Hanks aumenta la densidad de corriente anódica a 2,0 V hasta valores similares a los obtenidos para el TiAlV sin recubrir y el caso 80-20 en su ausencia, y éstos presentan un pico pequeño y ancho de corriente en sentido anódico alrededor de 0,7 V. El caso más afectado por la presencia de BSA es el recubrimiento de HAp.

IX.2.2. Ensayos de impedancia

Tras los ensayos convencionales, se realizaron los ensayos de impedancia para los mismos casos, con y sin BSA. Las Figuras IX.3., 4. y 5. muestran los diagramas experimentales y ajustados de EIS para el TiAlV sin recubrir, la HAp y el caso 80-20, respectivamente, con solución Hanks. Los circuitos

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

equivalentes empleados son discutidos por separado después de la presentación de los diagramas de EIS experimentales.

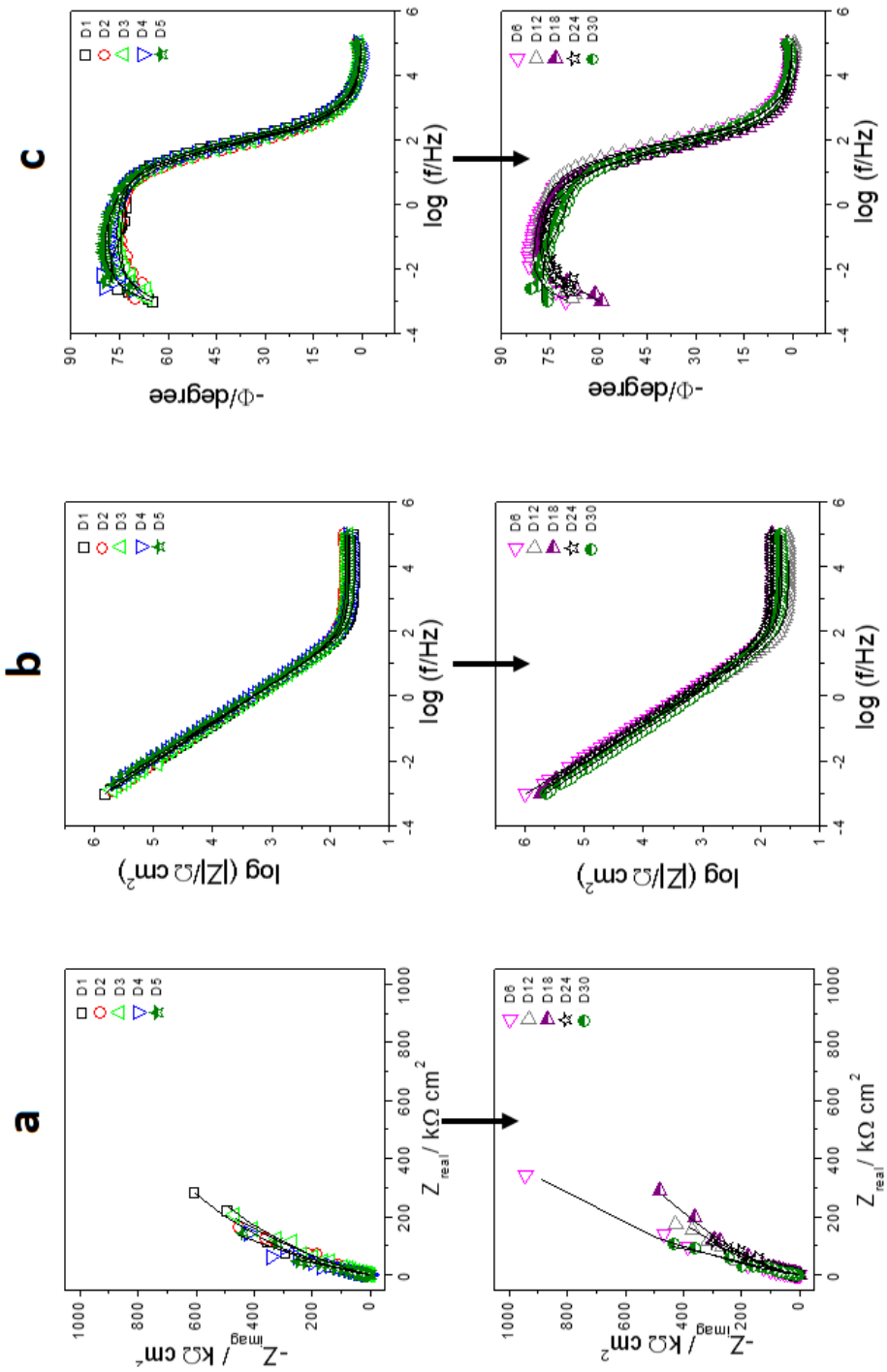


Figura IX.3. (a) Plano complejo, (b) Módulo de impedancia de Bode y (c) ángulo de fase vs. frecuencia para el TiAlV sin BSA.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

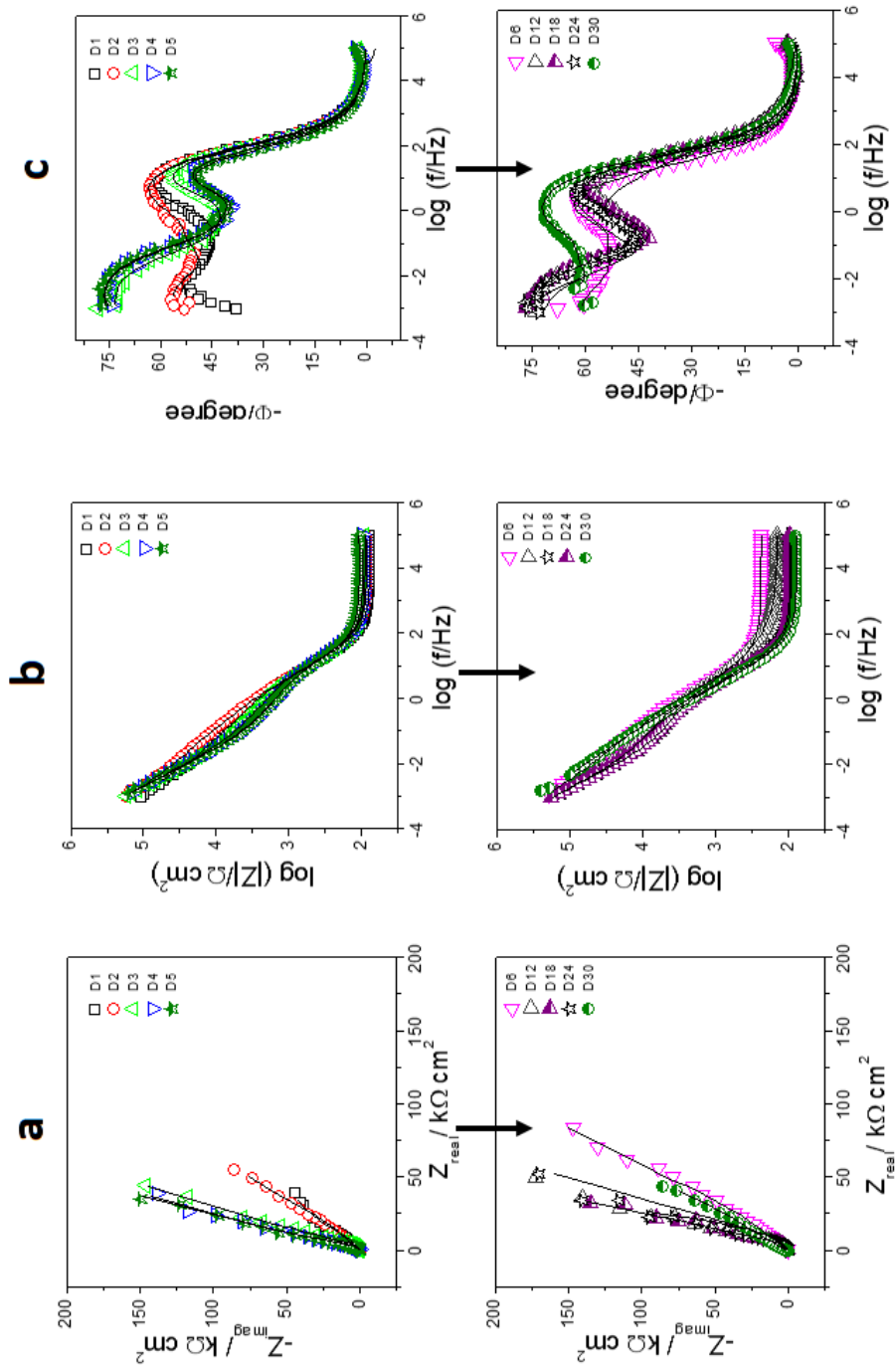


Figura IX.4. (a) Plano complejo, (b) Módulo de impedancia de Bode y (c) Ángulo de fase vs. frecuencia para el recubrimiento de HAp sin BSA.

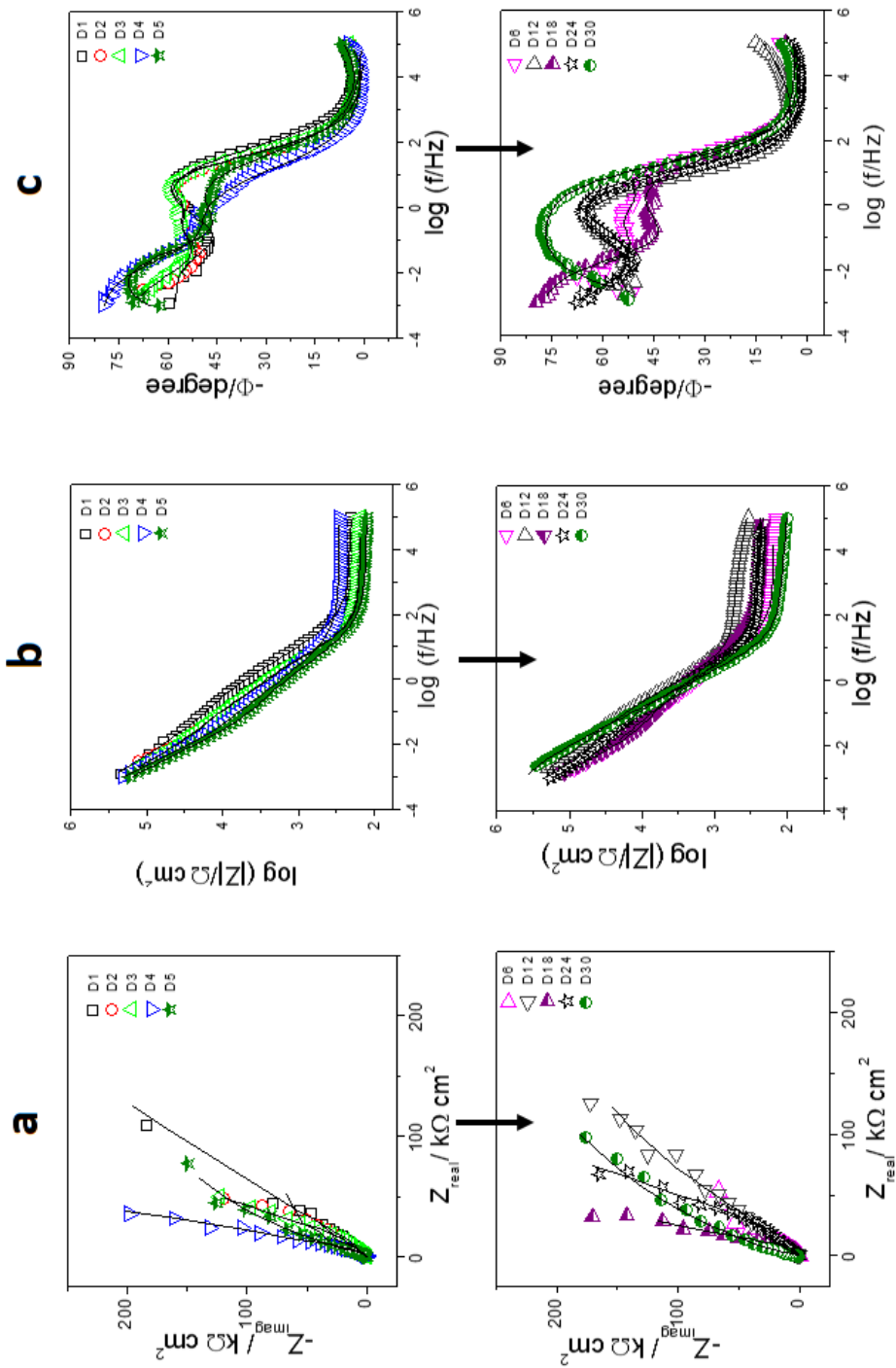


Figure IX.5. (a) Plano complejo, (b) módulo de impedancia de Bode y (c) ángulo de fase vs. frecuencia para el recubrimiento 80-20 sin BSA.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

El TiAlV (Fig. IX.3.a) no muestra cambios significativos en su bucle capacitivo o en su módulo de impedancia. En el diagrama de ángulo de fase (Fig. IX.3.c), presenta constantes de tiempo superpuestas en la región de media a baja frecuencia (MF/LF), indicando procesos interfaciales acelerados. Se puede observar que el sistema muestra un comportamiento capacitivo en una región relativamente amplia de frecuencias, lo cual es típico de los sistemas pasivos. Para tiempos de inmersión más largos, se ve que la respuesta de impedancia evoluciona hacia un sistema más activo. Las gráficas del plano complejo de la muestra de HAp (Fig. IX.4.a) muestran un crecimiento gradual del bucle capacitivo que puede estar relacionado con el desarrollo de óxido en la parte inferior de los poros del recubrimiento. Esto puede verse claramente en los diagramas de Bode (Fig. IX.4.c) en los que en el primero y segundo período la HAp muestra dos constantes de tiempo diferentes: una relacionada con las propiedades dieléctricas del revestimiento en el dominio de HF, y otro en la región LF, relacionado con los procesos interfaciales en la superficie del sustrato metálico. A medida que transcurre el tiempo, el ángulo de fase de esta constante de tiempo a LF aumenta hasta que alcanza valores similares a la respuesta del TiAlV sin recubrir. Al igual que el TiAlV, la muestra 80-20 no presentó cambios sustanciales en su bucle capacitivo (Fig. IX.5.a). También presentó una respuesta similar a la muestra de HAp, con dos constantes de tiempo (Fig. IX.5.c), pero su constante de tiempo LF presentó valores más altos desde la primera inmersión, lo cual podría estar relacionado con la presencia de TiO₂ en su formulación.

Las figuras IX.6. a 8. muestran los diagramas experimentales y ajustados de EIS para el TiAlV sin recubrir, el caso 100%HAp y el caso 80-20, respectivamente, en solución de Hanks con una concentración de 4,2 g.L⁻¹ de BSA.

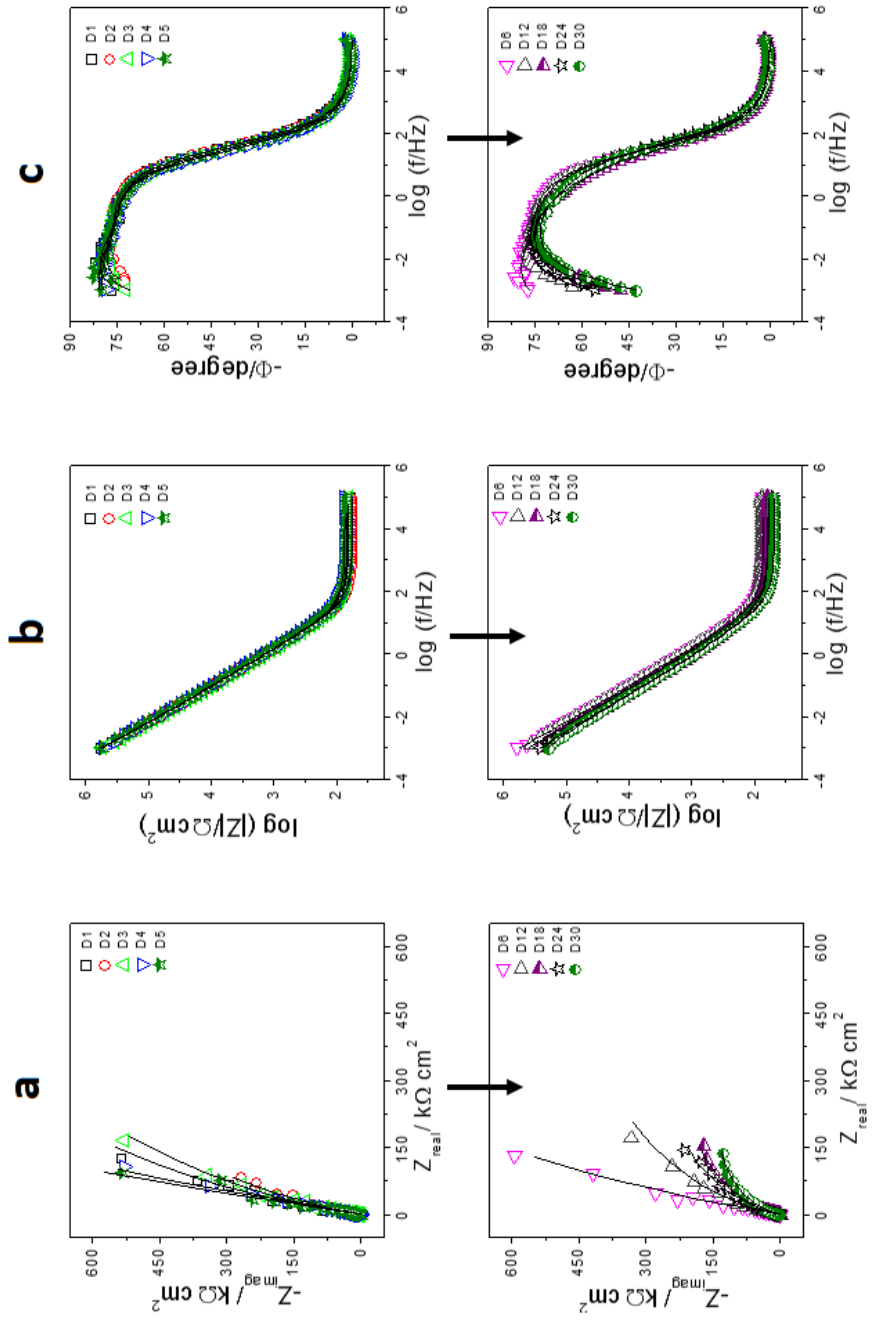


Figura IX.6. (a) Plano complejo, (b) módulo de impedancia de Bode y (c) ángulo de fase vs. frecuencia para el TiAlV con BSA.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

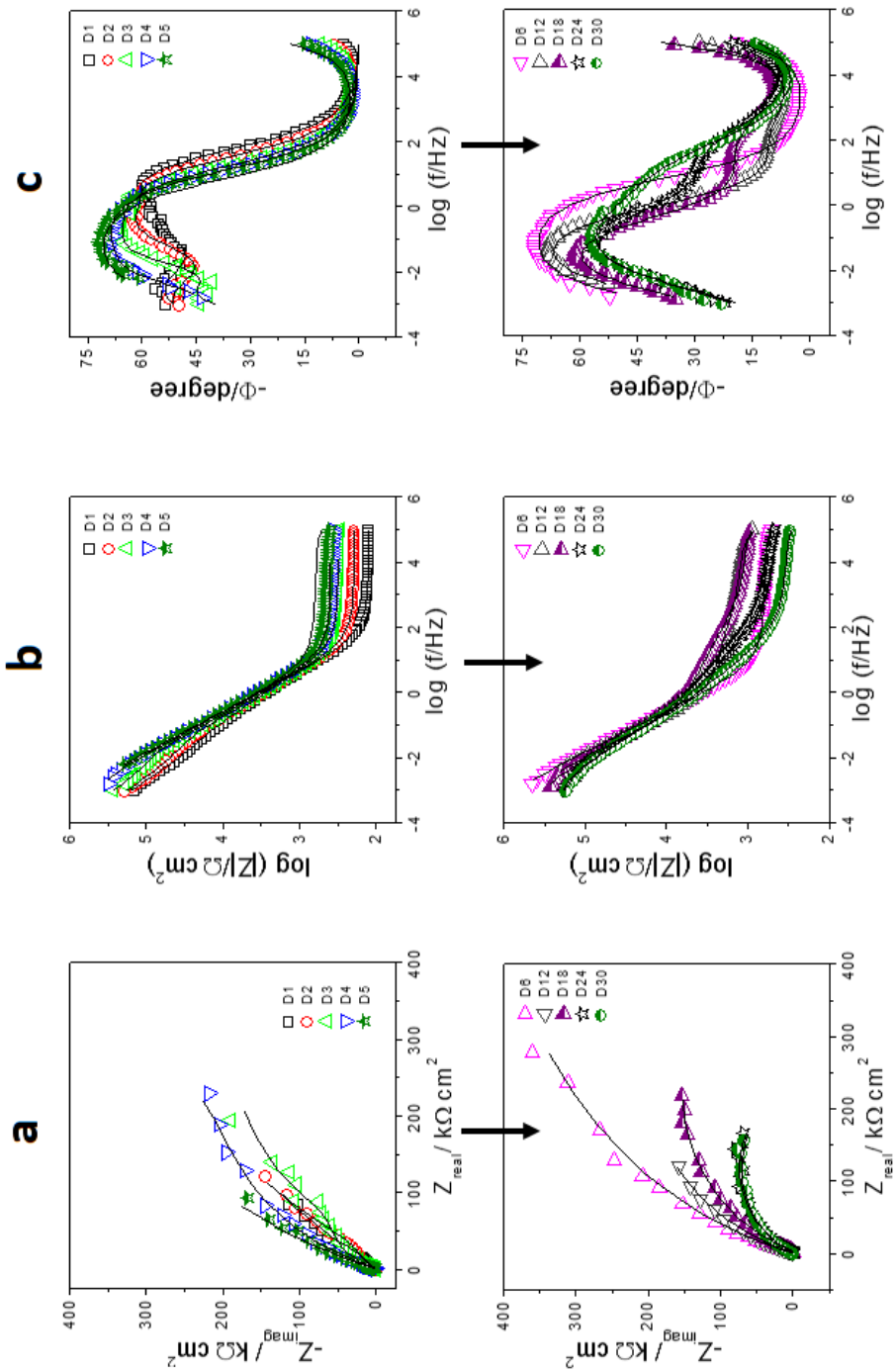


Figura IX.7. (a) Plano complejo, (b) módulo de impedancia de Bode y (c) ángulo de fase vs. frecuencia para el recubrimiento de HAp con BSA.

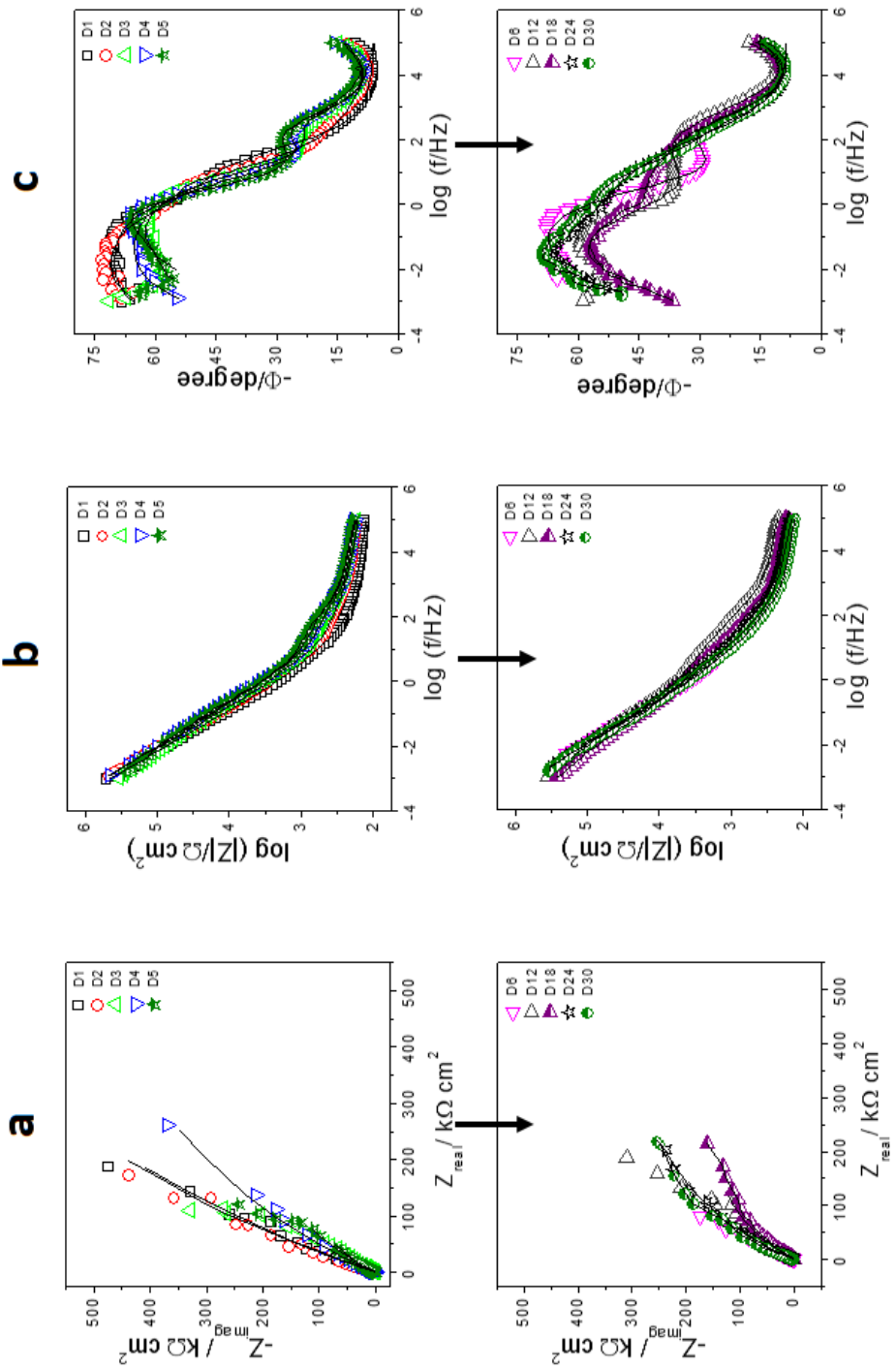


Figura IX.8. (a) Plano complejo, (b) módulo de impedancia de Bode y (c) ángulo de fase vs. frecuencia para el recubrimiento 80-20 con BSA.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La gráfica del ángulo de fase para el sustrato sin recubrir presentó constantes de tiempo superpuestas (Fig. IX.6.c), lo cual apunta a un proceso interfacial acelerado, comportamiento similar al que ocurría sólo con solución Hanks. Sin embargo, se presentó una disminución del bucle capacitivo y el módulo de impedancia (Fig. IX.6.a y b), también después de 14 días de inmersión. El recubrimiento de hidroxiapatita muestra al menos 2 constantes de tiempo, una relacionada con la respuesta del recubrimiento (MF) y otra relacionada con el proceso interfacial en la superficie de metal (LF). Después de 3 días de inmersión evolucionaron hacia constantes de tiempo solapadas, asemejándose a la respuesta del sustrato. Entonces, tras 14 días, el ángulo de fase HF decrece y otra constante de tiempo aparece en MF, indicando que algo podría estar cubriendo el área expuesta. El aumento gradual de la resistencia de la solución presentado en la figura IX.7.b puede estar relacionado con cambios en las fuerzas iónicas [12]. Las Figuras IX.7.b y 8.b, c mostraron al menos 2 constantes de tiempo, una en la región MF/HF, relacionada con el recubrimiento, y otra en LF, correspondiente a la respuesta de la interfaz electrodo/solución.

Para analizar con más detalle la respuesta EIS, el modelo de circuitos eléctricos equivalentes fue utilizado para el tratamiento de los datos experimentales. La Figura IX.9. muestra los diferentes circuitos eléctricos equivalentes (EEC) que se utilizan para ajustar los datos de impedancia electroquímica obtenidos para el TiAlV sin recubrir y las muestras 100% y 80-20 vs. el tiempo de inmersión en solución de Hanks con y sin BSA.

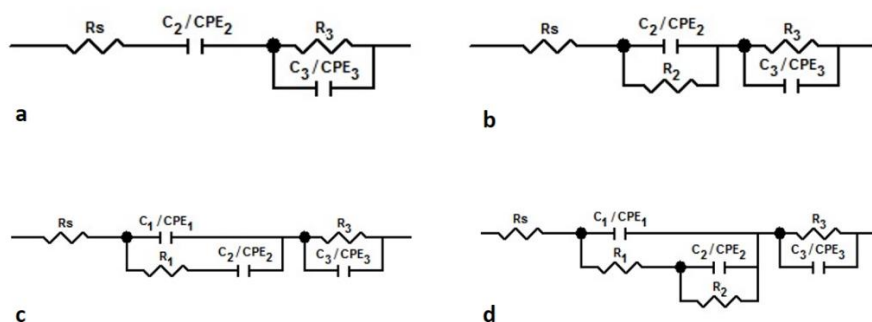


Figura IX.9. EECs usados para ajustar los datos de impedancia electroquímica obtenidos para los tres casos analizados con y sin BSA.

El EEC se escoge de acuerdo con el siguiente modelo físico: el sustrato, en ausencia de BSA, está cubierto por una compacta película de óxido de Ti, Al y V (representado en el EEC por el sub-circuito que contiene los elementos C_2 o CPE_2 para tiempos más cortos de inmersión, y $C_2, CPE_2//R_2$ para tiempos de inmersión más largos), y la reacción de transferencia de carga se produce en la interfaz metal/película de óxido que está representada por el sub-circuito $CPE_3//R_3$. Para tiempos de inmersión más largos, se pueden formar poros dentro de la capa de óxido metálico, y la reacción de transferencia de carga se puede también desarrollar en la parte inferior de estos poros. R_3 es la resistencia de transferencia de carga asociada con el proceso redox. El elemento CPE_3 se asocia con la capacitancia de la doble capa eléctrica. En presencia de BSA, la proteína se adsorbe sobre la película de óxido y modifica la distribución de carga en la superficie del óxido. Para los casos con hidroxiapatita o hidroxiapatita+ TiO_2 , un nuevo sub-circuito $C_1, CPE_1//R_1$ se añadió para dar cuenta de la presencia del revestimiento, que es poroso y se disuelve parcial o completamente a diferentes velocidades en función de la presencia de TiO_2 en el recubrimiento y/o de BSA en la solución de Hanks. En los circuitos, a veces un elemento de fase constante (CPE) se ha sustituido por

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

la capacitancia (C) al aumentar el tiempo de inmersión, o bien, en un principio, una C ha ajustado los datos; esta es la razón por la que ambos elementos se indiquen en los EEC y las tablas. Cuando el exponente (CPE-P o n) aparece en las tablas significa que se usó un elemento de fase constante. El elemento de fase constante representa la desviación del comportamiento capacitivo real. El CPE está constituido por la admitancia CPE-T y el exponente CPE-P o n. Un valor CPE-P de 1 corresponde a la respuesta de un condensador ideal, C; un valor CPE-P de 0,5 sugiere una respuesta de difusión o una respuesta de material poroso (a alta frecuencia), y valores de P de $0,5 < \text{CPE-P} < 1$ se asocian con una distribución de corriente heterogénea en la superficie del electrodo [22].

El EEC de las Figuras IX.9.a y 9.b se utiliza para ajustar los datos obtenidos para el sustrato en ausencia y en presencia de BSA.

El EEC de la Figura 9b ajustó los datos obtenidos para tiempos de inmersión más largos, que se acortaron en presencia de BSA. R_s corresponde a la resistencia de la solución. Ambos EECs se refieren a dos constantes de tiempo que pueden estar representadas por dos sub-circuitos en serie relacionados con la respuesta de los óxidos metálicos y la reacción de transferencia de carga en la interfaz electrodo/solución, principalmente en la interfaz óxido metálico/metal. El sustrato presenta una película de óxido muy compacta, y en ausencia de BSA y para tiempos de inmersión cortos se observa un comportamiento altamente capacitivo, lo que sugiere que la corriente pasa a través del condensador. Por lo tanto, en este caso, el primer sub-circuito está dado por un C_2 asociado a la capacitancia de los óxidos de Ti, Al, V. Para tiempos de inmersión largos, 30 días en ausencia de BSA, el condensador C_2 cambia a un elemento de fase constante CPE_2 , y R_2 debe ser incluida en el sub-circuito. Esto significa que la capa de óxido se está degradando. El segundo sub-circuito $R_3//\text{CPE}_3$ se asoció a la reacción de transferencia de carga que

| *Hortensia Melero Correas*

ocurre en la parte inferior de los poros y/o defectos de la película de óxido. Los parámetros de los EEC para el TiAlV sin recubrir en ausencia y en presencia de BSA están en la Tabla IX.1..

En la ausencia de BSA, el valor de C_2 es casi constante, en torno a $4 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{F}^{-2}$ (Tabla IX.1.). Los $\text{CPE}_3\text{-T}$ y $\text{CPE}_3\text{-P}$ son casi constantes con el tiempo de inmersión, con valores de $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-n}$ y 0,80, respectivamente.

En presencia de BSA, los datos de impedancia también se ajustaron utilizando dos constantes de tiempo en serie. La capa de óxido, que fue ajustada por un elemento C_2 en la ausencia de BSA, se ajustó en este caso mediante un elemento de fase constante (CPE_2) con un valor de $\text{CPE}_2\text{-T}$ casi constante, en torno a $2 \cdot 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-n}$, y uno de $\text{CPE}_2\text{-P}$ de alrededor de 0,80 hasta 6 días después de la inmersión (Tabla IX.1.). Para tiempos de inmersión ≥ 12 días, los sub-circuitos CPE_2 o C cambian a $R_2//\text{CPE}_2$, en el cual el significado de los elementos es el mismo descrito anteriormente para 30 días de inmersión. Los valores de R_2 mostraron cierta oscilación, probablemente debido a la adsorción/desorción de BSA en la superficie del electrodo. El BSA actúa como un agente complejante catiónico y facilita la formación de defectos en la película de óxido, además de causar una distribución de carga heterogénea en la superficie del electrodo [23]. La segunda constante de tiempo se describe por el $R_3//C_3$ en el que R_3 representa la resistencia de transferencia de carga debido a la actividad electroquímica en la parte inferior de los poros (pinholes) presentes en la película de óxido y/o la actividad en la interfaz óxido metálico/metal. C_3 representa la capacitancia de la doble capa eléctrica. La resistencia de transferencia de carga disminuyó y la capacitancia aumentó con el tiempo de inmersión (Tabla IX.1.), lo que sugiere un aumento de la zona atacada, que puede ser debido a la degradación de la capa de óxido y la oxidación de la superficie metálica.

En el caso de los recubrimientos de HAp en ausencia de BSA, un nuevo elemento de fase constante apareció en la región de HF, y se ajustó mediante la adición de un sub-circuito $R_1//\text{CPE}_1$ al EEC empleado para ajustar los datos obtenidos para el TiAlV sin recubrir. En este nuevo circuito (Fig. IX.9.c), R_1

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

representa la resistencia de la capa de HAp y la resistencia de la solución dentro de los poros de esta capa, y el CPE_1-T está relacionado con la capacitancia de la capa de HAp, y el CPE_1-P es el exponente. Este EEC explica los datos experimentales de impedancia hasta 12 días de inmersión. Los valores de CPE_1-P sugieren un proceso de difusión a través de la capa de HAp para los dos primeros días de inmersión, y una distribución de carga heterogénea para tiempos de inmersión más largos. A los 18 días de inmersión el EEC evoluciona al de la Figura IX.9.d, en el cual se añadió la resistencia R_2 , que es similar al observado para el sustrato a los 30 días de inmersión, lo que sugiere que la resistencia a la capa de óxido metálico disminuye y la corriente puede pasar también a través de la película de óxido. A los 24 y 30 días de inmersión, los datos de EIS fueron ajustados con el mismo EEC que se empleó para el TiAlV sin recubrir en ausencia de BSA (Fig. IX.9.b), lo que sugiere que la capa de HAp se ha disuelto o no muestra ninguna influencia en la respuesta de impedancia. La presencia de una fase amorfa de la HAp facilitaría esta disolución. El sistema bajo esta condición se asemeja al comportamiento del sustrato. Los datos obtenidos usando estos diferentes EECs están en la Tabla IX.2..

| Fig. | HA without albumin | | | | | | | | | | | | HA with albumin | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|--|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|--|--|
| | 10c | | | | | | 10d | | | | | | 10b | | | | | | 10c | | | | | |
| EECs | [Circuit Diagrams for HA without albumin] | | | | | | | | | | | | [Circuit Diagrams for HA with albumin] | | | | | | | | | | | |
| Time | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 12d | 18d | 24d | 30d | 30d | 30d | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 12d | 18d | 24d | 30d | | |
| $R_s / \Omega \text{ cm}^2$ | 74 | 81 | 88 | 94 | 104 | 242 | 643 | 48.9 | 925 | 303 | 303 | 114 | 145 | 135 | 189 | 243 | 195 | 234 | 345 | 516 | 325 | | | |
| $R_1 / \Omega \text{ cm}^2$ | 2.4 | 3.4 | 4.2 | 1078 | 952 | 6029 | 76.4 | 50.5 | | | | 11.3 | 11.7 | 11.4 | 11.5 | 11.2 | 945.5 | | | | | | | |
| ${}^*CPE_{1-T} / 10^{-4}$ | 2.0 | 1.3 | 3.4 | 0.83 | 0.89 | 1.2 | 0.62 | 0.69 | | | | 0.44 | 0.59 | 0.58 | 0.12 | 1.4 | 0.06 | | | | | | | |
| CPE_{1-P} or n_1 | 0.57 | 0.58 | 0.80 | 0.84 | 0.85 | 0.89 | 0.78 | 0.25 | | | | 0.60 | 0.43 | 0.43 | 0.33 | 0.60 | 0.32 | | | | | | | |
| *C_2 or $CPE_{2-T} / 10^{-5}$ | 4.8 | 3.0 | 1.0 | 5.2 | 4.9 | 2.9 | 5.1 | 0.91 | 15 | 17 | | 2.7 | 4.8 | 6.8 | 8.8 | 2.7 | 9.6 | 3.3 | 2.9 | 6.6 | 23 | | | |
| CPE_{2-P} or n_2 | | | | | | | | 0.83 | 0.82 | 0.62 | | | | | | | | | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | | |
| $R_2 / \Omega \text{ cm}^2$ | | | | | | | | 5627 | 5770 | 12684 | | | | | | | | | 1320 | 3797 | 2732 | 1640 | | |
| ${}^*CPE_{3-T} / 10^{-4}$ | 1.3 | 2.3 | 0.85 | 4.6 | 3.7 | 1.5 | 0.81 | 0.52 | 3.6 | 1.9 | 1.8 | 1.8 | 1.9 | 1.8 | 1.3 | 2.1 | 1.6 | 0.55 | 0.90 | 0.88 | 0.83 | | | |
| CPE_{3-P} or n_3 | 0.78 | 0.73 | 0.80 | 0.69 | 0.69 | 0.75 | 0.79 | 0.90 | 0.81 | 0.87 | 0.87 | 0.71 | 0.69 | 0.70 | 0.71 | 0.72 | 0.67 | 0.82 | 0.78 | 0.73 | 0.70 | | | |
| $R_3 / 10^4 \Omega \text{ cm}^2$ | 0.26 | 0.34 | 0.20 | 0.33 | 0.32 | 2.8 | 4.0 | 90.4 | 53 | 37 | | 0.08 | 0.09 | 0.09 | 0.87 | 0.57 | 15 | 55 | 43 | 23 | 23 | | | |
| $\chi^2 / 10^{-4}$ | 0.7 | 4.6 | 34 | 9.6 | 7.6 | 9.8 | 30 | 6.7 | 3.3 | 15.7 | 2.8 | 3.2 | 6.1 | 8.3 | 9.6 | 30 | 31 | 9.7 | 12 | 8.1 | 8.1 | | | |

Tabla IX.2. Parámetros EEC obtenidos para el recubrimiento de HAp con y sin BSA (*CPE-T/S.cm⁻²s⁻ⁿ and C/F.cm⁻²)

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Para tiempos de inmersión cortos se obtuvieron valores pequeños de R_1 , probablemente debido a la presencia de fase amorfa y a la consecuente porosidad. El valor de esta resistencia se incrementó entre los 4 y 6 días de inmersión, posiblemente debido a la disolución/precipitación de la HAp que causaría cierto bloqueo de los poros. En día 12 de inmersión, la resistencia disminuyó de nuevo, probablemente debido a la intensa disolución del recubrimiento que predomina sobre su precipitación en el interior de los poros. Los datos de EIS obtenidos en el día 18 de inmersión se ajustaron incluyendo la resistencia R_2 (Fig. IX.9.d), lo que sugiere que el óxido metálico también se está degradando y el recubrimiento de HAp ha perdido prácticamente su influencia. A partir del día 24 de inmersión, se utilizó el mismo EEC utilizado para ajustar los datos del TiAlV sin recubrir (Fig. IX.9.b) para ajustar los datos experimentales de la HAp, indicando que no había ya influencia del recubrimiento.

Para el revestimiento de HAp en presencia de BSA, el comportamiento se ha descrito con dos EECs (Figs. IX.9.c y 9.b), con los elementos teniendo el mismo significado descrito anteriormente, y los parámetros dados en la Tabla IX.2.. El sub-circuito $R_1//CPE_1$ era innecesario para ajustar los datos experimentales después de 12 días de inmersión, y los datos de EIS fueron ajustados con el EEC empleado para el TiAlV sin recubrir a largos tiempos de inmersión. Este comportamiento sólo se observó después de 24 días de inmersión en ausencia de BSA. Por lo tanto, la presencia de BSA acelera la degradación de la capa de HAp debido a su interacción con el propio material. Estos resultados indican claramente que la HAp no tiene ya influencia en la respuesta electroquímica después de 12 días en contacto con la solución de Hanks conteniendo BSA. Los valores de CPE_1-P sugieren un proceso de difusión a través de la capa de HAp del primer al sexto día de inmersión, y la pérdida de influencia del recubrimiento después de 12 días de inmersión. El óxido metálico se simuló

con una capacitancia C_2 , como en ausencia de BSA en solución, y sólo para tiempos de inmersión ≥ 12 días, cuando no se detectó más influencia del revestimiento, se incluyó el elemento R_2 , y la respuesta de EIS fue similar a la del TiAlV sin recubrir. Para todos los tiempos de inmersión el sub-circuito R_3/CPE_3 ajustaba los datos experimentales. Los valores de R_3 fueron de alrededor de $10^4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ y se incrementaron en un orden de magnitud a largos tiempos de inmersión, lo que sugiere un aumento del área atacada del sustrato. Los valores de CPE_3 -P indican una superficie muy heterogénea y en algunos tiempos de inmersión sugieren alguna contribución de difusión, cuando los valores CPE-P son cercanos a 0,5.

Para la muestra 80-20 en ausencia y en presencia de BSA, los EECs de las Figuras IX.9.c, 9.d y 9.b fueron utilizados para ajustar los datos experimentales a medida que el tiempo de inmersión aumentaba. El significado de los elementos del EEC era el descrito anteriormente. En ausencia de BSA, el EEC de la Figura IX.9.c describe los datos hasta los 6 días de inmersión en ausencia y hasta los 12 días en presencia de BSA, respectivamente. El EEC de la Figura IX.9.d se utilizó para tiempos de inmersión de 12 a 24 días en ausencia, y hasta el día 18 en presencia de BSA, respectivamente. Para tiempos más largos de inmersión el EEC de la Figura IX.9.b se utilizó para ajustar los datos experimentales, el mismo EEC empleado para describir en TiAlV sin recubrir. Los parámetros de los circuitos se encuentran en la Tabla IX.3..

**Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)**

| Fig. | 8020 without albumin | | | | | | | | | | 8020 with albumin | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| | 10c | | | | | 10d | | | | | 10b | | | | | 10c | | | | | 10d | | | | | 10b | | | | | | | | | | | | | | |
| Time/ days | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 12d | 18d | 24d | 30 | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 12d | 18d | 24d | 30 | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 12d | 18d | 24d | 30 | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 12d | 18d | 24d | 30 |
| EECs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs | Rs |
| $R_s/\Omega\text{ cm}^2$ | 179 | 138 | 135 | 287 | 132 | 187 | 351 | 212 | 203 | 119 | 74 | 81 | 88 | 94 | 104 | 242 | 643 | 59 | 48 | 30 | 74 | 81 | 88 | 94 | 104 | 242 | 643 | 59 | 48 | 30 | 74 | 81 | 88 | 94 | 104 | 242 | 643 | 59 | 48 | 30 |
| $R_1/\Omega\text{ cm}^2$ | 47 | 32 | 27 | 69 | 39 | 46 | 229 | 82 | 67 | | 2.4 | 3.4 | 4.2 | 1078 | 952 | 6029 | 76.4 | 50.5 | | | 2.4 | 3.4 | 4.2 | 1078 | 952 | 6029 | 76.4 | 50.5 | | | 2.4 | 3.4 | 4.2 | 1078 | 952 | 6029 | 76.4 | 50.5 | | |
| *CPE ₁ - T/10 ⁻⁴ | 4.6 | 9.9 | 8.4 | 9.4 | 10.2 | 7.8 | 3.4 | 14.5 | 4.7 | | 2.0 | 1.3 | 3.4 | 0.83 | 0.89 | 1.2 | 0.62 | 0.69 | | | 2.0 | 1.3 | 3.4 | 0.83 | 0.89 | 1.2 | 0.62 | 0.69 | | | 2.0 | 1.3 | 3.4 | 0.83 | 0.89 | 1.2 | 0.62 | 0.69 | | |
| CPE ₁ -P or n ₁ | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | | 0.57 | 0.58 | 0.80 | 0.84 | 0.85 | 0.89 | 0.78 | 0.25 | | | 0.57 | 0.58 | 0.80 | 0.84 | 0.85 | 0.89 | 0.78 | 0.25 | | | 0.57 | 0.58 | 0.80 | 0.84 | 0.85 | 0.89 | 0.78 | 0.25 | | |
| *C ₂ or *CPE ₂ - T/10 ⁻⁵ | 7.5 | 6.1 | 7.1 | 8.0 | 8.2 | 7.3 | 9.6 | 3.0 | 8.3 | 18.0 | 47.6 | 30.3 | 10.3 | 52.4 | 49.4 | 28.8 | 50.6 | 9.1 | 146.0 | 173.7 | 47.6 | 30.3 | 10.3 | 52.4 | 49.4 | 28.8 | 50.6 | 9.1 | 146.0 | 173.7 | 47.6 | 30.3 | 10.3 | 52.4 | 49.4 | 28.8 | 50.6 | 9.1 | 146.0 | 173.7 |
| *CPE ₂ -P or n ₂ | 0.82 | 0.89 | 0.96 | 0.83 | 0.80 | 0.87 | 0.85 | 0.85 | 0.86 | 0.78 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| $R_2/10^3\Omega$ cm ² | | | | | | | 3.9 | 9.5 | 44.8 | 83.3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *CPE ₃ - T/10 ⁻⁵ | 7.5 | 16.0 | 15.0 | 23.0 | 19.0 | 18.0 | 19.0 | 58.0 | 83.0 | 24.0 | 13.0 | 23.0 | 8.5 | 46.0 | 37.0 | 15.0 | 8.1 | 5.2 | 34.0 | 19.0 | 13.0 | 23.0 | 8.5 | 46.0 | 37.0 | 15.0 | 8.1 | 5.2 | 34.0 | 19.0 | 13.0 | 23.0 | 8.5 | 46.0 | 37.0 | 15.0 | 8.1 | 5.2 | 34.0 | 19.0 |
| *CPE ₃ -P or n ₃ | 0.75 | 0.74 | 0.76 | 0.70 | 0.94 | 0.85 | 0.81 | 0.91 | 0.95 | 0.95 | 0.78 | 0.73 | 0.80 | 0.69 | 0.69 | 0.75 | 0.79 | 0.85 | 0.79 | 0.87 | 0.78 | 0.73 | 0.80 | 0.69 | 0.69 | 0.75 | 0.79 | 0.85 | 0.79 | 0.87 | 0.78 | 0.73 | 0.80 | 0.69 | 0.69 | 0.75 | 0.79 | 0.85 | 0.79 | 0.87 |
| $R_3/10^5\Omega$ cm ² | 0.17 | 0.13 | 0.15 | 0.17 | 0.21 | 0.39 | 7.9 | 75.4 | 0.88 | 0.49 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.27 | 0.39 | 9.04 | 5.24 | 3.68 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.27 | 0.39 | 9.04 | 5.24 | 3.68 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.27 | 0.39 | 9.04 | 5.24 | 3.68 |
| $\chi^2/10^{-4}$ | 2.8 | 3.2 | 6.1 | 8.3 | 9.2 | 30 | 31.0 | 9.7 | 12.0 | 8.1 | 0.70 | 4.6 | 33.8 | 9.6 | 7.6 | 9.8 | 30.0 | 6.7 | 3.3 | 16.0 | 0.70 | 4.6 | 33.8 | 9.6 | 7.6 | 9.8 | 30.0 | 6.7 | 3.3 | 16.0 | 0.70 | 4.6 | 33.8 | 9.6 | 7.6 | 9.8 | 30.0 | 6.7 | 3.3 | 16.0 |

Tabla IX.3. Parámetros EEC obtenidos para el recubrimiento 80-20 con y sin BSA

(*CPE-T/S.cm²s⁻ⁿ and C/F.cm²)

En ausencia de BSA, el sub-circuito $R_1//CPE_1$ ajustó bien la constante de tiempo en la región de alta frecuencia, con un valor de R_1 casi constante alrededor de $40 \Omega \cdot \text{cm}^2$, y un CPE_1-T alrededor de $9,1 \cdot 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-n}$ excepto para el primer día de inmersión, tras el cual era de $4,6 \cdot 10^{-4} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-n}$. Un CPE_1-P fijado en 0,5 se utilizó y denota una difusión del electrolito a través de la capa de HAp-TiO₂. De 12 a 24 días de inmersión el valor R_1 disminuyó, probablemente debido a la disolución del recubrimiento, y tras 30 de inmersión desapareció la influencia de recubrimiento. El comportamiento del óxido metálico, durante los primeros 6 días de inmersión, se describió por el elemento de fase constante CPE_2-T , que era casi constante, con un valor alrededor de $7,4 \cdot 10^{-5} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-n}$ con un valor de CPE_2-P alrededor de 0,85, típico de una superficie con una distribución de carga heterogénea. Una resistencia R_2 se añadió al EEC en la Figura IX.9.c para describir la respuesta de impedancia de 12 a 24 días de inmersión (Fig. IX.9.d) y su valor se incrementó, lo que sugiere alguna precipitación en el interior de los poros de la capa de óxido metálico. En el día 30, la contribución del recubrimiento desapareció y el sub-circuito simple usado para el TiAlV sin recubrir (Fig. IX.9.b) ajustó bien los datos experimentales. El valor de R_3 aumentó ligeramente con el tiempo, y esto fue acompañado por un cierto aumento en la capacitancia del sistema y un ligero aumento en los valores de CPE_3-P . Este comportamiento es difícil de explicar, pero indica que la presencia del TiO₂ modificó la respuesta de impedancia de la muestra de HAp.

La presencia de BSA en solución de Hank sugiere cierta difusión a través del recubrimiento de HAp-TiO₂ durante los primeros 2 días de inmersión, y a continuación, predominó un comportamiento de superficie heterogénea. La resistencia R_1 del recubrimiento era pequeña y aumentó ligeramente en los primeros 3 días, aumentó de manera significativa durante los siguientes 3 días, y a continuación disminuyó entre los días 12 y 18, tras lo cual su influencia desapareció, sugiriendo la disolución del recubrimiento. La capa de óxido

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

metálico fue descrita por un condensador con valores alternos de capacitancia, y para tiempos de inmersión ≥ 18 días una combinación en paralelo de CPE_2 y R_2 se utilizó para ajustar los datos experimentales, lo que indica una degradación de la capa de óxido metálico. Los valores de R_3 fueron siempre menores a los obtenidos en ausencia de BSA, denotando que el BSA también ataca el recubrimiento y el sustrato, como ya se había observado para el TiAlV sin recubrir. De acuerdo con estos resultados, los valores CPE_{3-T} eran mayores en presencia de BSA, sugiriendo un aumento de la zona atacada.

Teniendo en cuenta la evolución de los EECs con el tiempo de inmersión se puede observar que la adición de TiO_2 al recubrimiento de HAp retrasa la acción del BSA. Esto está indicado por el hecho de que el EEC de la Figura IX.9.c se utilizó para describir el comportamiento del recubrimiento de HAp- TiO_2 hasta los 12 días de inmersión, mientras que en ausencia de TiO_2 se aplicó hasta los 6 días de inmersión.

IX.3. Detalle y consecución del dispositivo a temperatura

Para los ensayos convencionales de corrosión, realizados en las dependencias del CPT de la Facultad de Química de la Universitat de Barcelona, se partía de serias limitaciones por los equipos disponibles, que no incluyen dispositivos termostatzados adecuados. En los ensayos de impedancia no se necesitó, puesto que se realizó en los laboratorios de corrosión de la Universidade Estadual Paulista, que ya disponen de material necesario para realizar ensayos a temperatura.

Por todo ello, para conseguir un dispositivo a temperatura que permitiera hacer ensayos en condiciones, se siguieron varios pasos. De cara comparar la viabilidad de cada uno de estos casos, ésta se ilustra con una curva de polarización lineal E-I, que permite una rápida evaluación de la viabilidad del dispositivo a partir del ruido obtenido.

Primer paso

Al realizar los ensayos previos a temperatura ambiente dentro de la caja de Faraday correspondiente, se obtienen curvas como la de la Figura IX.10..

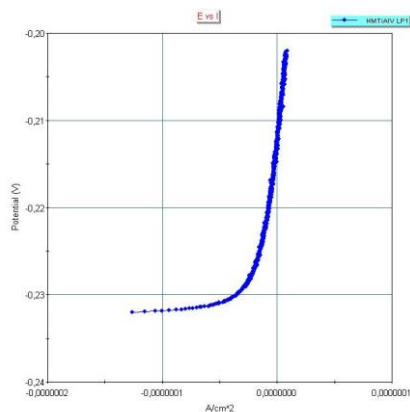


Figura IX.10. Curva de polarización lineal a t° ambiente

No aparece ruido, y se trata del modelo de curva que se espera conseguir.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Segundo paso

La primera idea fue fabricar una manta calefactora, y rodear la celda electroquímica con papel de aluminio y con la propia manta, como se ve en la Figura IX.11..

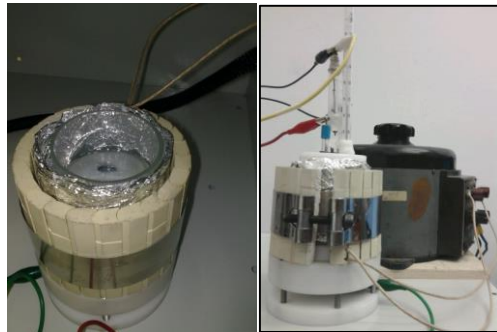


Figura IX.11. Dispositivo de calefacción por manta

Este dispositivo permitía mantener la solución de trabajo a 36°C; sin embargo, las curvas de polarización lineal que se obtenían eran como la que aparece en la Figura IX.12..

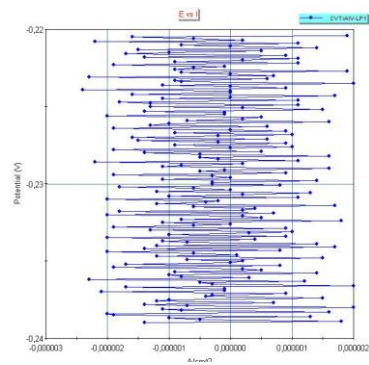


Figura IX.12. Curva de polarización lineal obtenida con manta calefactora

El ruido obtenido era tal que hacía totalmente imposible cualquier intento de análisis e interpretación de las curvas.

Tercer paso

Al obtener estas curvas, se pensó enseguida en alejar la bobina del aparato calefactor de la caja de Faraday para eliminar parte del ruido que le pudiera llegar, tras lo cual se pasó a obtener curvas como la de la Figura IX.13..

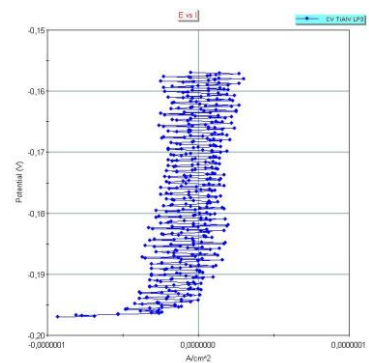


Figura IX.13. Curva de polarización lineal obtenida con manta calefactora, bobina alejada

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La curva ha recuperado, en parte, su forma habitual. El ruido ha disminuido pero todavía es demasiado elevado para obtener medidas válidas. Sin embargo, tras los primeros ensayos, alentadores, se pasó a obtener de nuevo curvas como la de la Figura IX.14..

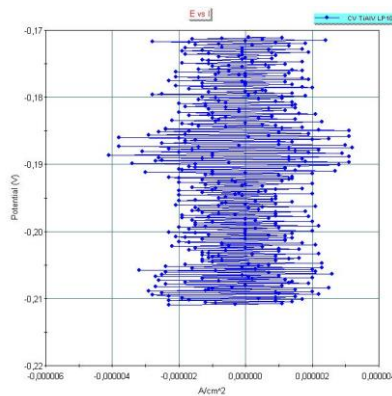


Figura IX.14. Curva de polarización lineal obtenida con manta calefactora, bobina alejada

Estas curvas eran similares a las primeras obtenidas con la manta calefactora, y hacían imposible cualquier medida, así que otro método era indispensable para solucionar el problema.

Cuarto paso

Tras haber concluido que era la propia manta calefactora la responsable de la totalidad del ruido generado en las medidas, y que no se podía reducir de ninguna manera, se consideró imprescindible buscar otra manera de mantener la celda a temperatura.

Se optó por crear un circuito de agua caliente que rodeara la celda y la mantuviera así a temperatura. En la Figura IX.15. se puede ver el baño que mantenía el agua a una temperatura superior a la del ensayo real para compensar la pérdida de calor al ambiente, la conducción por la pared de goma del tubo y por la pared de vidrio de la celda, la bomba peristáltica que impulsaba el líquido hasta la celda, y la celda rodeada por el tubo y por Parafilm.

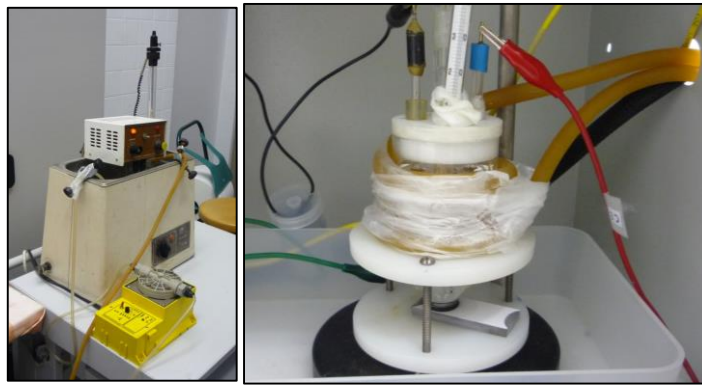


Figura IX.15. Sistema de temperatura por circuito de agua caliente

Una vez implantado este sistema, se pasó a obtener curvas como la que aparece en la Figura IX.16..

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

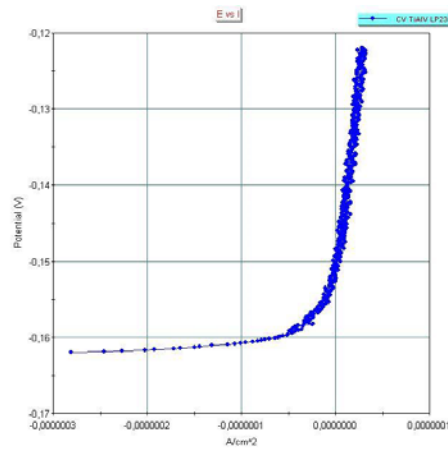


Figura IX.16. Curva de polarización lineal obtenida con circuito de agua caliente

Estas curvas sí permitían finalmente la determinación de parámetros propios de la corrosión, así que este dispositivo fue el que se empleó para realizar los ensayos convencionales cuyos resultados se han detallado en el apartado anterior.

IX.4. Conclusiones

Tras los diferentes ensayos de corrosión, se ha llegado a la conclusión de que, contrariamente a la mayoría de la bibliografía, en este caso los recubrimientos de HAp no garantizan una protección contra la corrosión del metal, especialmente tras algunos días en condiciones fisiológicas. Frente a esto, el recubrimiento con una cierta cantidad de TiO₂ mejora notablemente este hecho, y permite que el tiempo a transcurrir hasta la corrosión del metal sea muy superior al del recubrimiento de HAp. Por tanto, una vez más, el recubrimiento 80-20 se presenta como una mejor alternativa para aplicaciones biomédicas.

IX.5. Referencias

[1] JEG González, JC Mirza-Rosca, Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications. *J. Electroanal. Chem.* 471 (1999) 109-115.

[2] X Cheng, SG Roscoe, Corrosion behavior of titanium in the presence of calcium phosphate and serum proteins. *Biomaterials* 26 (2005) 7350-7356.

[3] CT Kwok, PK Wong, FT Cheng, HC Man, Characterization and corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V fabricated by electrophoretic deposition. *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 6736-6744.

[4] M Cabrini, A Cigada, G Rondelli, B Vicentini, Effect of different surface finishing and of hydroxyapatite coatings on passive and corrosion current of Ti6Al4V alloy in simulated physiological solution. *Biomaterials* 18 (1997) 783-787.

[5] F Contu, B Elsener, H Böhni, A study of the potentials achieved during mechanical abrasion and the repassivation rate of titanium and Ti6Al4V in inorganic buffer solutions and bovine serum. *Electrochim. Acta* 50 (2004) 33-41.

[6] SR Sousa, MA Barbosa, Effect of hydroxyapatite thickness on metal ion release from Ti6Al4V substrates. *Biomaterials* 17 (1996) 397-404.

[7] M Cabrini, A Cigada, G Rondell, B Vicentini, Effect of different surface finishing and of hydroxyapatite coatings on passive and corrosion current of Ti6Al4V alloy in simulated physiological solution. *Biomaterials* 18 (1997) 783-787.

- [8] CT Kwok, PK Wong, FT Cheng, HC Man, Characterization and corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V fabricated by electrophoretic deposition. *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 6736-6744.
- [9] X Nie, A Leyland, A Matthews, Deposition of layered bioceramic hydroxyapatite/TiO₂ coatings on titanium alloys using a hybrid technique of micro-arc oxidation and electrophoresis. *Surf. Coat. Technol.* 125 (2000) 407-414.
- [10] R Drevet, O Aaboubi, H Benhayoune, In vitro corrosion behavior of electrodeposited calcium phosphate coatings on Ti6Al4V substrates. *J. Solid. State Electrochem.* 16 (2012) 3069-3077.
- [11] B Zhang, C Kwok, Hydroxyapatite-anatase-carbon nanotube nanocomposite coatings fabricated by electrophoretic codeposition for biomedical applications. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 22 (2011) 2249-2259.
- [12] C Vasilescu, P Drob, E Vasilescu, I Demetrescu, D Ionita, M Prodana, SI Drob, Characterisation and corrosion resistance of the electrodeposited hydroxyapatite and bovine serum albumin/hydroxyapatite films on Ti-6Al-4V-1Zr alloy surface. *Corrosion Sci.* 53 (2011) 992-999.
- [13] SG Mohamed, AA Abdeltawab, MA Shoeib, Corrosion behaviour and bioactivity of electrophoretically deposited hydroxyapatite on titanium in physiological media (Hanks' solution). *Mater Sci-Pol.* 30 (2012) 231-239.
- [14] T Roland, H Pelletier, J Krier, Scratch resistance and electrochemical corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V in simulated physiological media. *J. Appl. Electrochem.* 43 (2013) 53-63.
- [15] H Melero, J Fernández, S Dosta, JM Guilemany, Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante

Proyección Térmica de Alta Velocidad. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr. 50 (2011) 59-64.

[16] G Singh, H Singh, BS Sidhu, Characterization and corrosion resistance of plasma sprayed HA and HA-SiO₂ coatings on Ti-6Al-4V. Surf. Coat. Technol. 228 (2013) 242-247.

[17] IC Lavos-Valereto, I Costa, S Wolyneć, The electrochemical behavior of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in Hank's solution. J. Biomed. Mater. Res. Part A 63 (2002) 664-670.

[18] Z Zhang, MF Dunn, TD Xiao, AP Tomsia, E Saiz, Nanostructured Hydroxyapatite Coatings for Improved Adhesion and Corrosion Resistance for Medical Implants. MRS Online Proceedings Library 703 (2001).

[19] X Cheng, SG Roscoe, Corrosion behavior of titanium in the presence of calcium phosphate and serum proteins. Biomaterials 26 (2005) 7350-7356.

[20] M Aziz-Kerrzo, KG Conroy, AM Fenelon, ST Farrell, CB Breslin, Electrochemical studies on the stability and corrosion resistance of titanium-based implant materials. Biomaterials 22 (2001) 1531-1539.

[21] VF Lvovich, editor. Impedance-Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena. Impedance Spectroscopy. John Wiley & Sons, Inc. (2012).

[22] BA Boukamp, Small signal response of the BiCuVOx/noble metal/oxygen electrode system. Solid State Ion. 136-137 (2000) 75-82.

[23] F Kratz, Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. J. Control. Release 132 (2008) 171-183.

Capítulo X.

Viabilidad biológica en las superficies

X.1. Introducción

Como la aplicación de estos recubrimientos es la biomédica, una de las consideraciones más importantes en el desarrollo de la misma es la evaluación de sus propiedades biológicas, así como de todas aquéllas que puedan tener influencia en la bioactividad in vitro.

A la hora de estructurar el capítulo, se ha decidido considerar tanto las tensiones superficiales como la superficie específica, la evolución de la capa de apatita en superficie, la disolución del recubrimiento, así como los ensayos in vitro con osteoblastos propiamente dichos.

En primer lugar se presentan los resultados de los cálculos de superficie específica y los ensayos in vitro; en segundo lugar, el resto de ensayos realizados que ayudan a la comprensión de los resultados aportando información adicional.

Los resultados in vitro y los cálculos de superficie específica se pueden ver también en el Anexo 5, en el artículo titulado "In vitro performance of ceramic coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray" H Melero, N Garcia-Giralt, J

Fernández, A Díez-Pérez and JM Guilemany, y enviado a la revista Bio-medical Materials and Engineering.

X.2. Ensayos realizados

X.2.1. Superficie específica

Medida realizada

La superficie específica, medida por microscopía confocal, se determinó con varios objetivos, ya que se notó que el valor cuantificado aumentaba con la magnificación utilizada. Esto era esperable, ya que un objetivo mayor permite la medida de una rugosidad mayor, que no es detectable por un objetivo de menos aumentos.

Se vio que los valores sufrían un gran incremento al pasar de un objetivo de 10 a uno de 20, mientras que en el paso del objetivo de 20 al de 50, el valor se estabiliza, siendo por tanto este valor el que se graficó.

Valores obtenidos

La superficie específica de los cuatro casos, representada en la Figura X.1., está correlacionada con la cantidad de fase amorfa de cada uno de ellos.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

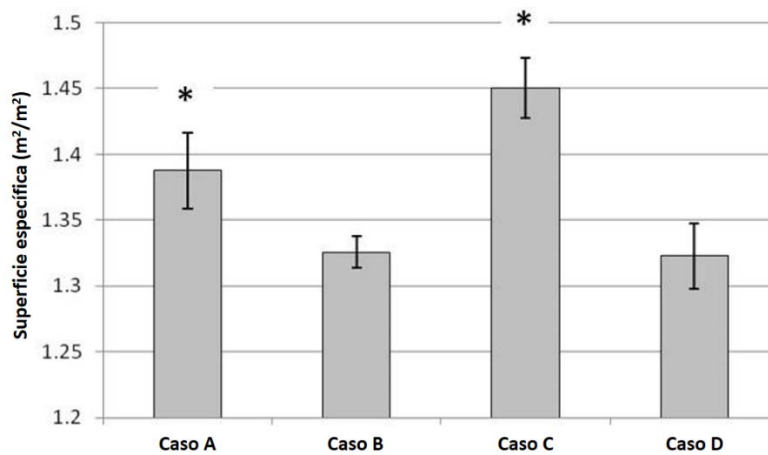


Figura X.1. Superficie específica de los cuatro casos estudiados

El caso C es el caso con la superficie específica más alta y B y D son los casos con la superficie específica más baja. Este hecho no es casual, y existe una cierta relación entre los dos fenómenos. El caso con el mayor porcentaje de fase amorfa es el caso con la mayor temperatura de partícula alcanzada, pero con una de las más bajas velocidades de partícula. Esta podría ser la razón para la obtención de un recubrimiento menos compacto pero más fundido, y, como consecuencia, de una topografía más rugosa y una superficie específica más elevada. Por el contrario, el caso D, con el menor porcentaje de fase amorfa, es el que tiene la menor temperatura de partícula alcanzada. En este caso, la contracción debida al enfriamiento es menor, y la velocidad de las partículas es mayor, lo que crea recubrimientos más compactados, sin una deformación resultante del enfriamiento. El efecto de la velocidad también se observa en el caso B, con una superficie específica similar a la de D.

La medida de la superficie específica es también una buena manera de evaluar –acompañada de otras propiedades, por supuesto- la biocompatibilidad de un material. De acuerdo con varias referencias [1], una superficie específica

mayor se asocia con una mayor actividad de las células en la superficie. Diferentes argumentos apoyan este hecho. En primer lugar, la rugosidad es siempre deseable, ya que la presencia de una cierta rugosidad permite un mejor agarre de la célula a la superficie (aunque es bien sabido que la rugosidad nanométrica es preferible a la micrométrica [2,3]); en segundo lugar, una mayor superficie específica asegura una mayor posibilidad de proliferación y una densidad celular más elevada para la misma superficie aparente; y por último, cuanto mayor sea la relación entre la superficie real y la aparente, mayor será el número de oquedades en las que el mecanismo de precipitación de los iones calcio y fósforo que se encuentran en saturación puede ocurrir. Todas estas razones llevan a esperar que se obtenga un mejor comportamiento de los osteoblastos para los casos con una superficie específica mayor.

X.2.2. Ensayos in vitro

Con el fin de evaluar la viabilidad y la proliferación de los osteoblastos en los diferentes recubrimientos estudiados, comparándolos con controles de poliestireno, se han empleado tres metodologías complementarias: MTT, live/death de fluorescencia y BrdU.

Los resultados de test del MTT, representados gráficamente en la Figura X.2., indican que ninguno de los materiales estudiados es citotóxico.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

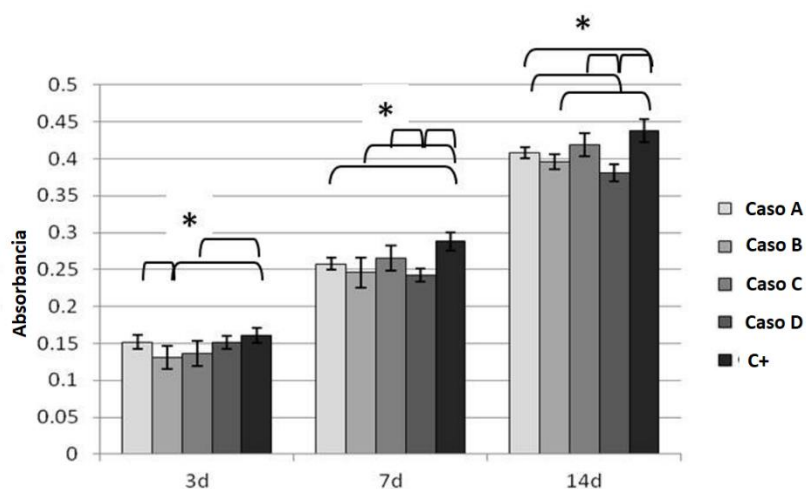


Figura X.2. Resultados de MTT para los cuatro casos estudiados a 3, 7 y 14 días de cultivo

A los 3 días, las diferencias entre las muestras no son estadísticamente significativas. A 7 y 14 días, la relación entre los casos permanece constante. El mejor valor de viabilidad se obtiene para el control positivo, aunque el caso C es capaz de alcanzar tasas de viabilidad comparables. El peor resultado aparece para la muestra D. Se han encontrado diferencias significativas entre los dos casos extremos, C y D, pero los otros dos casos, A y B, muestran un comportamiento intermedio. Estudios previos realizados por el Centro de Proyección Térmica han demostrado también una buena viabilidad celular con recubrimientos 100% de hidroxapatita obtenidos por HVOF, comparables en la mayoría de los casos a los controles de poliestireno (PS) [4]. Por tanto, y de acuerdo con lo obtenido en el caso C, la presencia de un 20% de óxido de titanio inhibe sólo ligeramente la viabilidad en las superficies de los recubrimientos. Otros grupos también han estudiado la viabilidad celular a través de ensayos de MTT con combinaciones de HAp y óxido de titanio. Ramires et al. [5,6] han obtenido valores similares o ligeramente más bajos

que los controles PS para diferentes combinaciones de TiO₂/HAp en Ti depositadas por técnica sol-gel. Los estudios biológicos con óxido de titanio tienden a emplear anatasa, por el supuesto mejor comportamiento celular sobre ella [7]. Sin embargo, muchos otros estudios han demostrado que el comportamiento biológico del rutilo es comparable al de la anatasa [8,9,10], y, como el rutilo tiene mejores propiedades mecánicas y más estabilidad en condiciones fisiológicas que la anatasa [11], se ha elegido en este estudio, con buenos resultados.

Tests de fluorescencia corroboran los resultados de MTT y permiten una observación de la distribución de los osteoblastos sobre la superficie de biomaterial, como puede verse en la Figura X.3..

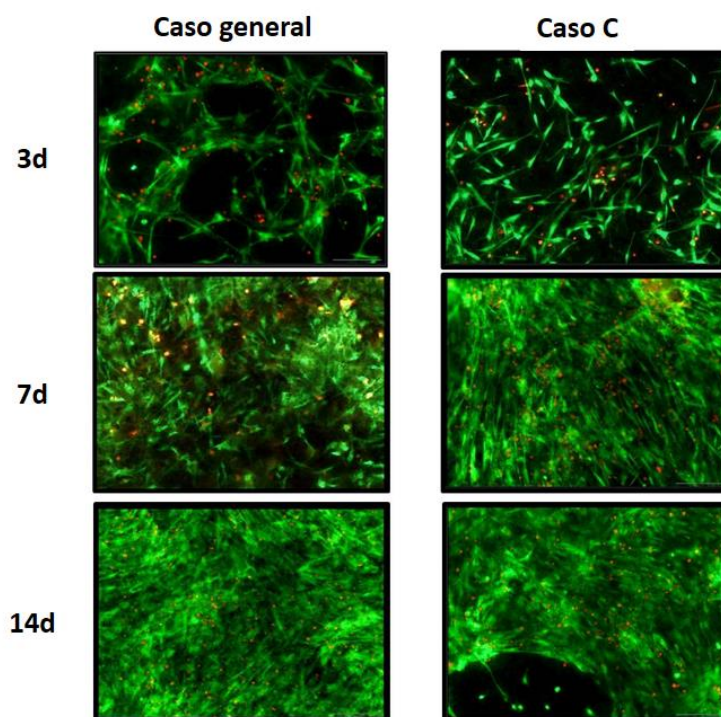


Figura X.3. Resultados de fluorescencia para el caso general (A,B,D) y para el caso C a 3, 7 y 14 días de cultivo.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

Para todos los casos, el número de células en la superficie aumenta exponencialmente con el tiempo. La distribución es homogénea en toda la superficie, y la mortalidad de osteoblastos es extremadamente baja. Sin embargo, como esta metodología es cualitativa, las diferencias entre los casos no son evidentes. Sólo el caso C muestra, a los 14 días, una distribución celular típica de confluencia, lo que indica una mayor adherencia y proliferación para este caso.

El aumento de la detección de la viabilidad celular con el tiempo se explica por la proliferación de células, como se muestra en los resultados de BrdU (Figura X.4.).

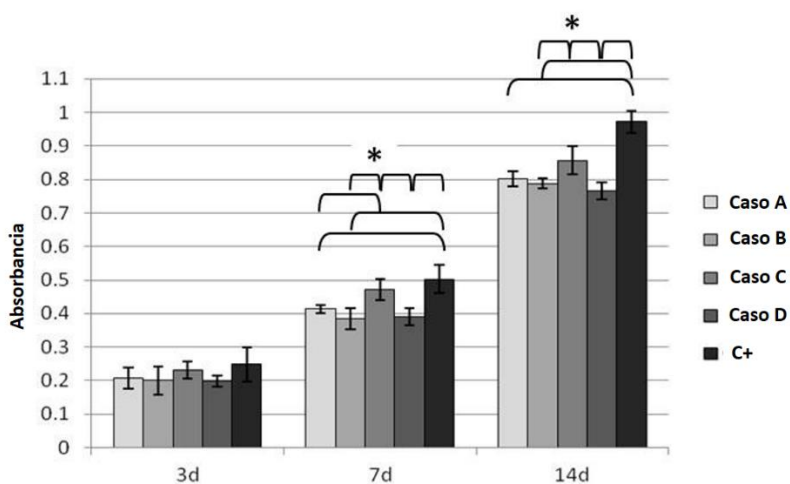


Figura X.4. Resultados de BrdU para los cuatro casos estudiados a 3, 7 y 14 días de cultivo

Los materiales estudiados permiten una buena proliferación con el tiempo, que es, al menos para el caso C, muy similar a la del control positivo (lo mismo ocurre para el caso de recubrimientos 100% de HAp [4]). A los 3 días, las diferencias entre los casos no son significativas, mientras que a los 7 y 14 días

aparecen diferencias significativas entre casi todos los casos. La relación entre los diferentes casos es muy similar a la relación obtenida para los resultados de MTT. Este hecho es esperable, debido a que las dos medidas están relacionadas, una medida de la cantidad de células vivas en superficie con el MTT, y el número de células proliferando en ese momento con el BrdU.

Como se ha explicado en detalle con los resultados de superficie específica, se esperaría una relación entre la superficie específica y la viabilidad celular y proliferación sobre el recubrimiento, y de hecho, ocurre que hay una mayor viabilidad y proliferación celular para los casos con una superficie específica más elevada, C y A.

Con el fin de evaluar el estado de diferenciación de los osteoblastos en las superficies, se ha medido la actividad de la fosfatasa alcalina hasta 14 días post-cultivo (Figura X.5.).

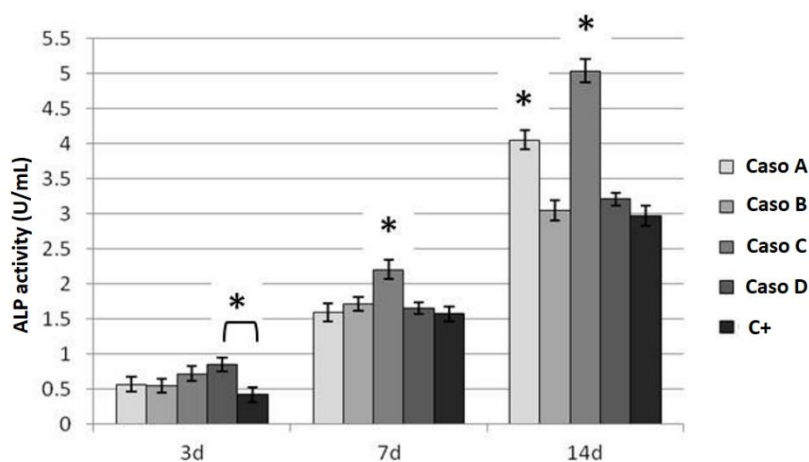


Figura X.5. Resultados de ALP para los cuatro casos estudiados a 3, 7 y 14 días de cultivo

A los tres días, las diferencias entre los casos no son significativas, mientras que a 7 y, especialmente, a 14 días de cultivo, los especímenes C, con una

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

mayor cantidad de fase amorfa, muestran la mayor cantidad de ALP detectada, seguidos por los especímenes A, los segundos con mayor cantidad de fase amorfa. Es notorio y muy positivo que los casos C y A muestren una producción de fosfatasa alcalina superior a la de los controles positivos.

Las células sembradas son osteoblastos primarios en 3^a subcultura como máximo, así que se espera que diferencien. Un material puede favorecer el mantenimiento de la diferenciación y la actividad con el tiempo, o, por el contrario, promover la desdiferenciación y una pérdida de actividad de los osteoblastos, así que se espera que para los materiales estudiados se observe una mejora en la diferenciación osteoblástica, debida al contenido de calcio e iones fosfato en los alrededores de los recubrimientos –que a su vez se debe a la disolución de los mismos- y a la consiguiente reprecipitación de una capa de apatita en la superficie del recubrimiento. Concretamente, siguiendo este razonamiento, los casos con una mayor cantidad de fase amorfa deberían promover una mayor cantidad de ALP detectada. Como se puede observar a partir de los resultados, se revela cierto que la disolución de la fase amorfa tiene un efecto positivo sobre la diferenciación celular (casos C y A). Incluso los peores casos tienen resultados de diferenciación celular similares o ligeramente superiores a los controles positivos, por la mera presencia de calcio y fosfato. Estudios previos con recubrimientos de hidroxiapatita por proyección plasma mostraron una mayor producción de ALP para recubrimientos de HAp que para los controles de PS [4], lo cual también corrobora la hipótesis hecha anteriormente, aunque otros estudios con recubrimientos de HAp-TiO₂ obtenidos por sol-gel muestran una producción similar o menor de ALP que los controles de PS [5,6], posiblemente debido a la ausencia de fases amorfas.

Todos los resultados mostraron claramente que el caso C es el mejor para promover el crecimiento de osteoblastos y la funcionalidad del implante. Por

otro lado, el caso D dio los peores resultados celulares, debido, como se ha explicado previamente, a su menor superficie específica y porcentaje de fase amorfa.

Por último, la observación por SEM (Figura X.6.) permite una visión al detalle de la morfología de los osteoblastos adheridos, aunque no se detectan diferencias entre los cuatro casos.

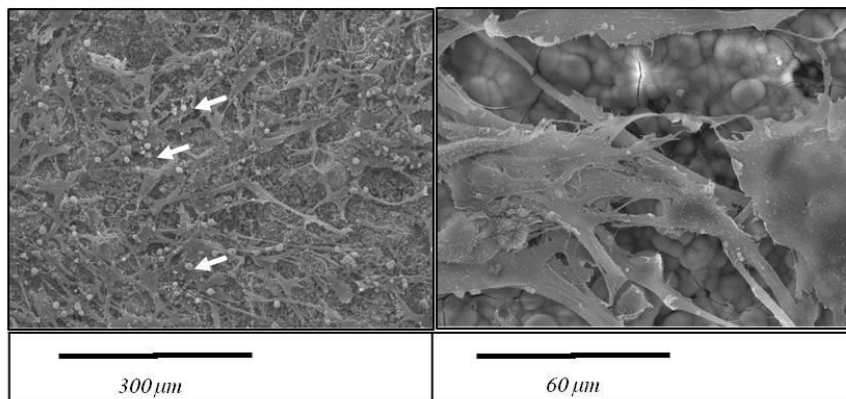


Figura X.6. a) Vista general del recubrimiento A cubierto de osteoblastos, con glóbulos de CaP alrededor (flechas blancas), b) Detalle de la superficie C, con las filopodia extendiéndose sobre una capa de apatita

En todos ellos las células mantienen la forma osteoblástica, con las filopodia extendiéndose sobre ellos (recubrimiento A en la Figura X.6.a y C en la Figura X.6.b). Por otra parte, en ambas imágenes es posible observar la capa de apatita formada en la superficie de los recubrimientos, así como algunos glóbulos de Ca-P, indicativos del inicio de la mineralización surgida de la diferenciación celular.

X.3. Otras consideraciones

X.3.1. Tensiones superficiales

En la literatura, hay diversas opiniones respecto al papel que desempeñan las tensiones superficiales en el comportamiento celular:

- Baja biocompatibilidad de superficies muy hidrofílicas o hidrofóbicas y mejores valores en el término medio [12]
- Mejor biocompatibilidad de los hidrofílicos [13,14]
- Mejor biocompatibilidad de los hidrofóbicos [15]
- Tensiones superficiales del material per se indiferentes frente a las propiedades del solvente [16]

Sea como fuere, queda claro que esta propiedad es objeto de gran controversia y merecedora de más estudio.

Para medirla, se ha escogido la técnica del ángulo de contacto, por ser una técnica sencilla y apropiada a la geometría de los recubrimientos estudiados.

Sessile drop

La primera intención fue emplear la técnica del “sessile drop”, que es el método estándar para esta clase de medidas.

El resultado con los materiales empleados demostró que se trataba de materiales extremadamente hidrofílicos, de manera que resultaba imposible realizar medidas de ángulo de contacto, ya que la gota se expandía instantáneamente. En casos como éste se considera que el mojado es perfecto [17].

Captive bubble

En el caso de estos recubrimientos, también la técnica del “captive bubble” dio problemas a la hora de calcular las tensiones superficiales, ya que resultaba prácticamente imposible conseguir que la burbuja quedara en contacto con la superficie del material. Una imagen de la burbuja bajo la superficie, tras alcanzar finalmente la superficie, se puede ver en la Figura X.7..



Figura X.7. Imagen de la burbuja bajo la superficie de material obtenida por captive bubble

Aun así, tras varios intentos se pudieron sacar unas medidas aproximadas de los valores de ángulo de contacto, que se detallan en la Figura X.8..

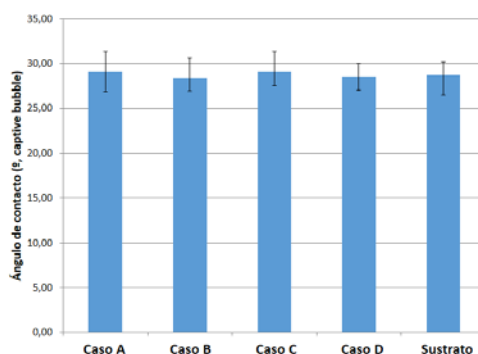


Figura X.8. Valores de ángulo de contacto para los casos estudiados

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

El hecho de que no se detecten diferencias entre los cuatro casos estudiados puede ser debido a que efectivamente estas diferencias no existan. Pero el hecho de que no se obtengan diferencias con el ángulo de contacto obtenido con el sustrato granallado de TiAlV, mucho más hidrofóbico que el recubrimiento (se vio con el sessile drop), da fe de la poca sensibilidad de esta técnica para superficies tan hidrofílicas como las de los recubrimientos estudiados.

En general se emplean modelos de ecuaciones estándar para el cálculo de tensiones superficiales a partir del ángulo de contacto, pero, de acuerdo con los resultados obtenidos, no se ha hecho el cálculo, ya que no se ha considerado que el ensayo sea válido y aporte la información necesaria. La única conclusión válida de este apartado es que los cuatro casos estudiados, con ángulos de contacto por sessile drop de prácticamente 0°, presentan un mojado perfecto [17] y, por tanto, una energía interfacial sólido-líquido extremadamente baja [18], y una tensión superficial muy elevada.

Los recubrimientos estudiados entrarían en la categoría de recubrimientos extremadamente hidrofílicos, y, de acuerdo a los buenos resultados celulares obtenidos, se ha considerado como válida la hipótesis de que el empleo de recubrimientos hidrofílicos favorecería el comportamiento celular en superficie. Esta hipótesis concuerda con los estudios de muchos grupos de investigación de superficies que parten de la base de que tratamientos que puedan aumentar la densidad de radicales -OH en superficie favorecerán la precipitación de apatita en superficie y el crecimiento de hueso [19,20,21].

X.3.2. Evolución de la capa de apatita en superficie

Se ha estudiado, para los cuatro casos considerados en este capítulo, la evolución de la capa de apatita en superficie al mantener los recubrimientos en inmersión en solución Hanks a 37°C, para varios tiempos, para evaluar si alguno de los casos mostraba una mejor biocompatibilidad aparente.

Tras esos tiempos, las muestras se han secado, y observado por SEM.

Las micrografías resultantes se pueden observar a continuación, en las Figuras X.9. a X.13..

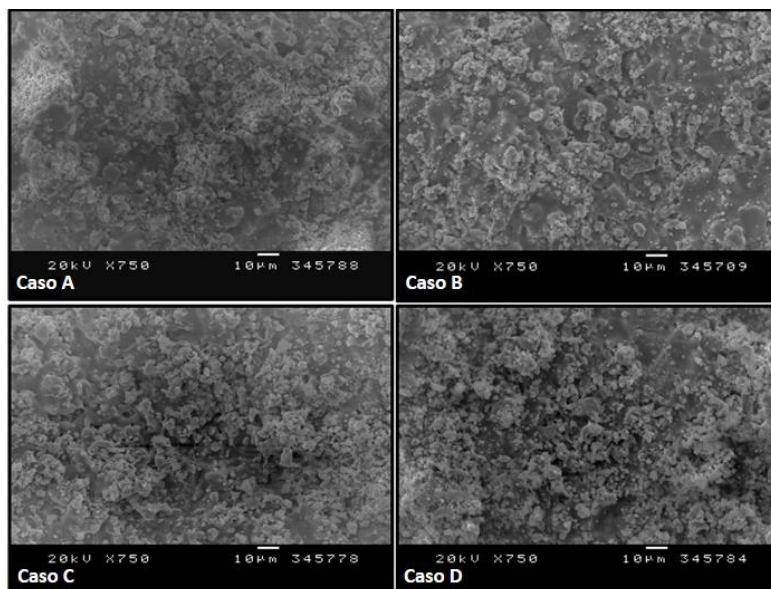


Figura X.9. Superficie de los cuatro casos, 0 días (pre-inmersión)

Las superficies típicas en muestras recién proyectadas aparecen en los cuatro casos estudiados, no detectándose diferencias importantes entre ellas.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

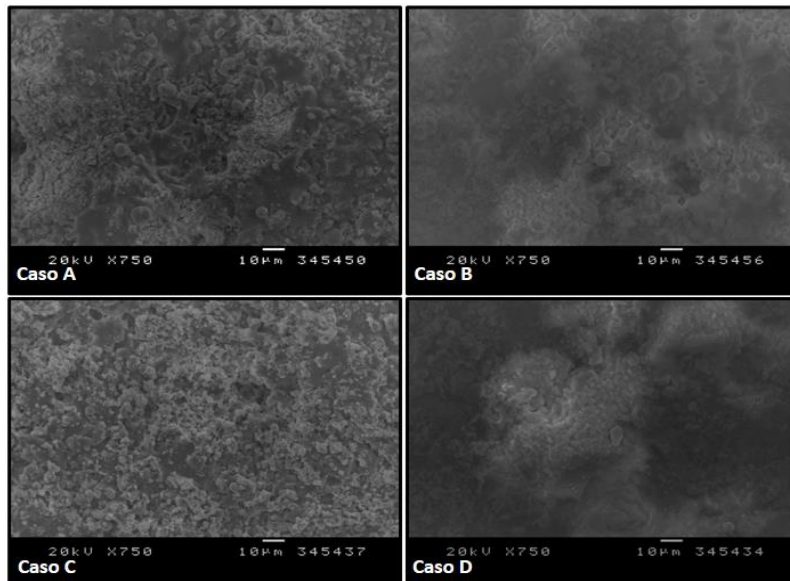


Figura X.10. Superficie de los cuatro casos, 1 días de inmersión

Tras 1 día de inmersión, se detectan pocas diferencias respecto a las muestras as-sprayed. Simplemente se pueden detectar, en algunos puntos, precipitados sub-micrométricos de apatita, núcleo de crecimiento de la posterior capa de apatita que aparecerá en superficie.

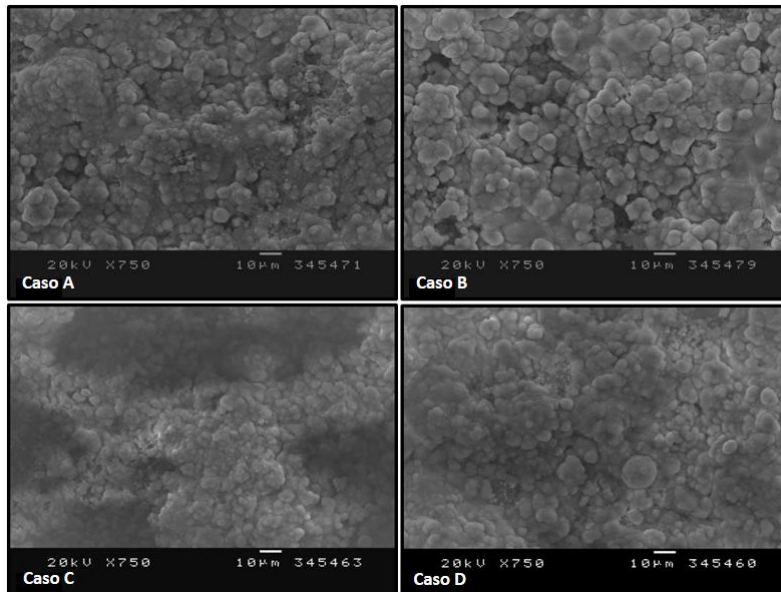


Figura X.11. Superficie de los cuatro casos, 7 días de inmersión

A 7 días, la capa de apatita ya se ha formado por toda la superficie. La microestructura inicial ha quedado totalmente o casi totalmente cubierta por la apatita que ha precipitado en superficie.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

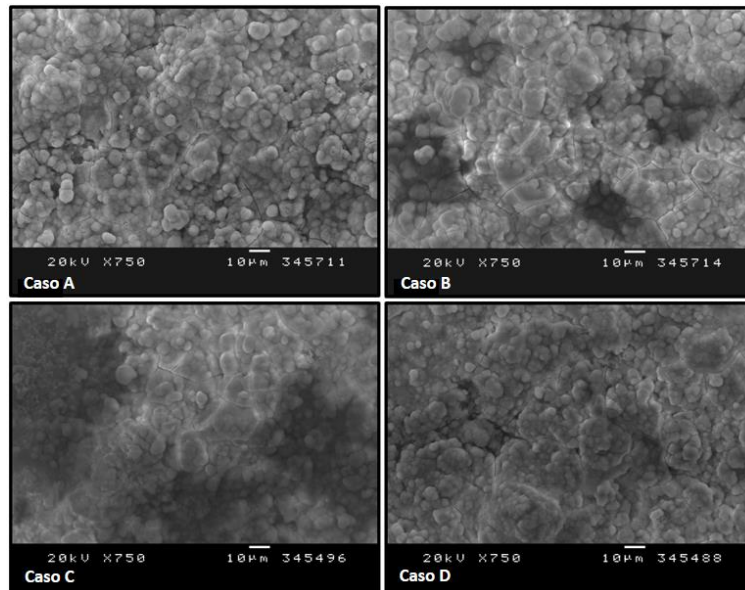


Figura X.12. Superficie de los cuatro casos, 14 días de inmersión

A 14 días, la capa de apatita en superficie no es tan homogénea y carente de imperfecciones como a 7 días. Vuelven a aparecer zonas poco recubiertas, y las zonas recubiertas con apatita comienzan a presentar grietas en algunos puntos. Según Li et al. [22], estas grietas son propias de procesos de difusión entre el recubrimiento y el sustrato. Aparecen también pequeños glóbulos de CaP que corresponderían a una reprecipitación posterior.

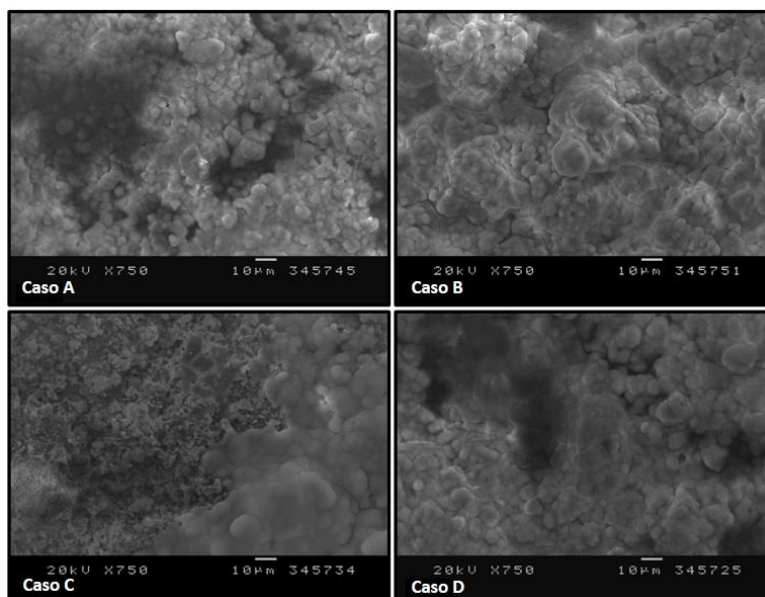


Figura X.13. Superficie de los cuatro casos, 28 días de inmersión

Al igual que a 14 días, la precipitación de apatita a los 28 días de inmersión ha dejado de ser uniforme en todo el recubrimiento, apareciendo muchas zonas (más que a 14 días) no recubiertas por una capa de apatita. Asimismo, las zonas recubiertas presentan una estructura caótica, con grietas y heterogénea, propia de sucesivas reprecipitaciones y redisoluciones.

X.3.3. Estudio por ICP de la concentración de calcio en solución

Para relacionar la variación de la capa de apatita con el proceso de disolución del recubrimiento, se ha considerado interesante hacer un estudio de la concentración de Ca en solución mediante espectroscopía de plasma ICP-OES, haciendo los análisis a los mismos tiempos (Figura X.14.).

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

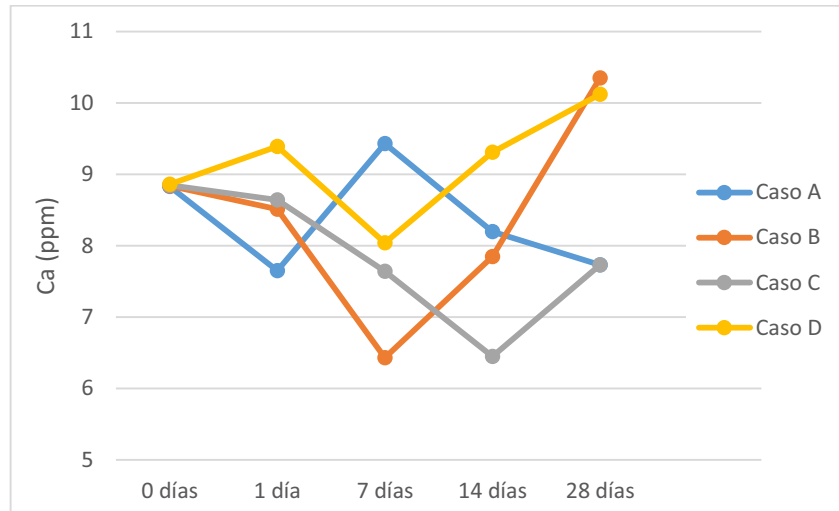


Figura X.14. Variación de la concentración de calcio en solución a varios tiempos

El gráfico resultante muestra que a los diferentes tiempos hay aumentos y disminuciones progresivas del calcio que se ha disuelto. Este hecho se puede relacionar, asimismo, con la variación de la morfología de la capa de apatita en superficie. Desde el inicio de la inmersión y durante las primeras 24h (según lo deducido en el capítulo VIII) comienza un proceso de disolución rápido del recubrimiento, en particular de su fase amorfa, seguido de una reprecipitación en superficie como consecuencia de la supersaturación de la solución. A partir de este momento, comenzará un proceso mucho más lento de disolución del resto del recubrimiento. Además, este proceso se superpondrá con otros dos: las sucesivas disoluciones y reprecipitaciones parciales de la capa biomimética de apatita en superficie, ambos procesos mucho más rápidos que la disolución de la fase cristalina del recubrimiento, por la naturaleza amorfa de los recubrimientos biomiméticos [23]. No es posible establecer una cronología exacta de lo que ocurre en cada recubrimiento, y la única conclusión posible

al respecto es que siguen cinéticas de disolución diferentes (reflejado también en las micrografías superficiales).

X.4. Conclusiones

La conclusión más importante de este capítulo es que los recubrimientos estudiados presentan un buen comportamiento celular en superficie, permitiendo la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, es el caso con mayor cantidad de fase amorfa, el caso C, el que mejor comportamiento ha presentado, ya que permitía una mejor diferenciación de los osteoblastos, principalmente por la mayor cantidad de calcio en solución que puede reprecipitar y ayudar en el proceso de generación de nuevo hueso. El que peor (sin ser malo) comportamiento biológico presenta, en cambio, es el caso D, que es, con diferencia, el que tiene mejores propiedades mecánicas, por su baja cantidad de fase amorfa, que llevará a una menor cantidad de iones calcio y fósforo disueltos en el medio inmediato al recubrimiento. Otros ensayos, como los de inmersión en condiciones fisiológicas, han permitido comprobar el hecho de que se producen diferentes procesos de redisolución y reprecipitación del calcio y fósforo, que explican el buen comportamiento celular obtenido con las muestras.

X.5. Referencias

[1] MM Hossain, W Gao, How is the surface treatments influence on the roughness of biocompatibility? Trends Biomater. Artif. Organs. 22 (2008) 144-157.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- [2] RCC Wang, MC Hsieh, Effects of nanometric roughness on surface properties and fibroblast's initial cytocompatibilities of Ti6Al4V. *Biointerphases* 6 (2011) 87-97.
- [3] TJ Webster, C Ergun, RH Doremus, RW Siegel, R Bizios, Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 51 (2000) 475-483.
- [4] M Gaona, Recubrimientos biocompatibles obtenidos por Proyección Térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona, España (2007).
- [5] PA Ramires, A Romito, F Cosentino, E Milella, The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomaterials* 22 (2001) 1467-1474.
- [6] PA Ramires, P Torricelli, In vitro response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite composite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 13 (2002) 797-801.
- [7] M Uchida, HM Kim, T Kokubo, S Fujibayashi, T Nakamura, Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 64A (2002) 164-170.
- [8] G Vallés, P González-Melendi, L Saldaña, M Rodriguez, L Munuera, N Vilaboa, Rutile and titanium particles differentially affect the production of osteoblastic local factors. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 84 (2008) 324-336.
- [9] W Han, Y Wang, Y Zheng, In vivo biocompatibility studies of nano TiO₂ materials. *Adv. Mater. Res.* 79-82 (2009) 389-392.

- [10] JM Wu, S Hayakawa, K Tsuru, A Osaka, Low-temperature preparation of anatase and rutile layers on titanium substrates and their ability to induce in vitro apatite deposition. *J. Am. Ceram. Soc.* 87 (2004) 1635-1642.
- [11] S Forberg, Ceramic containers for spent nuclear fuel: on the corrosion resistance of rutile. En: Clark DE, White WB, editores. *Advances in Ceramics*, vol. 20, Nuclear Waste Management II. The American Ceramic Society, Westville, Ohio, USA (1986).
- [12] N Fauchoux, R Schweiss, K Lutzow, C Werner, T Groth, Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* 25 (2004) 2721-2730.
- [13] H Liao, AS Andersson, D Sutherland, S Petronis, B Kasemo, P Thomsen, Response of rat osteoblast-like cells to microstructured model surfaces in vitro. *Biomaterials* 24 (2003) 649-654.
- [14] G Zhao, Z Shwartz, M Wieland, F Rupp, J Geis-Gerstorfer, DL Cochran, BD Boyan, High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 74A (2005) 49-58.
- [15] SB Kennedy, NR Washburn, CG Simon Jr., EJ Amis, Combinational screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation. *Biomaterials* 27 (2006) 3817-3824.
- [16] L Weiss, LE Blumenson, Dynamic adhesion and separation of cells in vitro II. Interactions of cells with hydrophilic and hydrophobic surfaces. *J. Cell. Physiol.* 70 (1967) 23-32.
- [17] B Mutaftschiev, editor. Equilibrium between large three- and two-dimensional phases. En: *The atomistic nature of crystal growth*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania (2001).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- [18] HJ Butt, K Graf, M Kappl, editores. Physics and Chemistry of interfaces. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania (2003).
- [19] X Wang, Y Cao, L Yang, Z Liu, Bioactivity study of the titanium plates treated with microarc oxidation and alkali. J. Nanosci. Nanotechnol. 11 (2011) 9650-9655.
- [20] M Wei, HM Kim, T Kokubo, JH Evans, Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl. 20 (2002) 125-134.
- [21] CX Wang, X Zhou, M Wang, Mechanism of apatite formation on pure titanium treated with alkaline solution. Biomed. Mater. Eng. 14 (2004) 5-11.
- [22] J Li, H Liao, M Sjostrom, Characterization of calcium phosphates precipitated from simulated body fluid of different buffering capacities. Biomaterials 18 (1997) 743-747.
- [23] F Barrere, P Layrolle, CA van Blitterswijk, K de Groot, Biomimetic coatings on titanium: a crystal growth study of octacalcium phosphate. J. Mater. Sci.-Mater. Med. 12 (2001) 529-534.

Capítulo XI.

Propuesta de mejora de los recubrimientos de HAp-TiO₂

XI.1. Introducción

En este punto de la tesis, se han podido analizar las ventajas e inconvenientes de los recubrimientos empleados, así como sus limitaciones. El punto más notorio es el hecho de que, de las cuatro condiciones estudiadas, sean las condiciones con mejores propiedades mecánicas las que tienen peor comportamiento biológico. Éste es correcto, permite la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos, pero en mucha menor medida que los recubrimientos obtenidos con las condiciones de proyección que daban peores propiedades mecánicas.

Por ello, como parte fundamental de esta tesis se ha planteado la posibilidad de buscar y estudiar propuestas de mejora de las propiedades biológicas de los recubrimientos con mejores propiedades mecánicas. Es decir, buscar la manera de mejorar el comportamiento celular en superficie sin afectar, o afectando lo mínimo posible, sus propiedades mecánicas ya optimizadas; o bien añadirle una funcionalidad biológica extra al recubrimiento.

Las posibilidades consideradas en la literatura para mejorar “a priori” (es decir, antes o mientras se aplica el recubrimiento) la funcionalidad biológica de un

recubrimiento obtenido mediante cualquier técnica son diversas, y pasan por las siguientes opciones, entre otras:

- En proyección térmica, emplear polvo de tamaño de partícula nanométrico, para obtener recubrimientos con una rugosidad nanométrica además de micrométrica y mejorar así la adhesión de los elementos del medio celular [1]
- Realizar recubrimientos mediante otras técnicas que permitan la obtención de rugosidades superficiales nanométricas [2,3]
- Obtener recubrimientos biomiméticos, de composición y estructura más similares a la hidroxiapatita biológica [4]
- Incorporar iones con propiedades osteogénicas como el estroncio [5], el silicio [6] o el flúor [7] a la estructura de la hidroxiapatita
- Fabricar recubrimientos compuestos, añadiendo otros compuestos inorgánicos: un biovidrio, con grandes propiedades osteogénicas [8]; nanotubos de carbono [9] o de TiO_2 [10], con la ventaja de una estructura nanométrica; plata [11] o zinc [12] para dotar el recubrimiento de propiedades bactericidas.
- Fabricar recubrimientos compuestos, añadiendo otros compuestos orgánicos como el colágeno, con gran influencia sobre la remodelación ósea [13]; el quitosano, que favorece el comportamiento de los osteoblastos [14]; o los bifosfonatos, que estimulan la viabilidad celular [15].

Los tratamientos “a posteriori” (una vez realizado el recubrimiento) son menos comunes, especialmente en el caso de recubrimientos de hidroxiapatita. Sí se utilizan, en cambio, para superficies metálicas, y en recubrimientos de TiO_2 , aunque esto último es menos común. En general son tratamientos alcalinos que aumenten la densidad de radicales $-\text{OH}$ en superficie (que inducen la formación de capa de apatita en superficie y

permiten una mejor adsorción de las proteínas de adhesión celular) [16]; o bien tratamientos para enlazar proteínas osteogénicas como el colágeno a estos enlaces –OH [17], y obtener una mejora en la biocompatibilidad multiplicada.

Así, tras el análisis de la bibliografía se decidió finalmente tomar dos caminos para darles una funcionalidad extra a los recubrimientos. Uno centrado en otorgarle a los recubrimientos unas propiedades bactericidas y el otro en mejorar el comportamiento de los osteoblastos en superficie, que se detallarán en las secciones siguientes. Estos resultados se pueden ver también en dos artículos, en los Anexos 6 y 7: “Comparison of in vitro behavior of as-sprayed, alkaline-treated and collagen-treated bioceramic samples obtained by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray” H Melero, N Garcia-Giralt, J Fernández, A Díez-Pérez and JM Guilemany enviado a la revista “Applied Surface Science”; y “Comparing two antibacterial treatments for bioceramic coatings at short culture times” H Melero, C Madrid, J Fernández, JM Guilemany, en proceso de publicación en la revista “Journal of Thermal spray Technology”.

XI.2. Estudio de la mejora de la bioactividad del recubrimiento

XI.2.1. Ensayos principales realizados

Esta sección se planteó como una comparación entre varios tratamientos post-obtención de los recubrimientos (con las condiciones del Caso D, el de mejores propiedades mecánicas): un tratamiento alcalino, que se preveía aumentaría la cantidad de enlaces –OH en las zonas de TiO₂ de la superficie; y

un tratamiento para enlazar colágeno en la superficie; ambos respecto a una referencia que sería el recubrimiento sin tratar.

Condiciones de proyección y detalle de los tratamientos

Las condiciones de proyección base son las que dieron peores resultados biológicos en el capítulo X (Caso D), y se pueden ver en la Tabla XI.1..

| Parameters | Value |
|------------------------|-------|
| O ₂ (l/min) | 265 |
| Propylene (l/min) | 81 |
| Compressed air (l/min) | 264 |
| Oxygen/Propylene | 3.96 |
| Number of layers | 5 |
| Distance (mm) | 200 |

Tabla XI.1. Condiciones de proyección

El tratamiento alcalino consistió en una inmersión durante 24h en una solución de NaOH a 5M, a una temperatura de 80°C. El tratamiento con colágeno, por otro lado, consistió en enlazar esta proteína a los enlaces –OH presentes en las superficies estudiadas, con un protocolo basado en el que proponen diversas referencias [17,18] para superficies de TiO₂ y Ti: colágeno de tipo I (Sigma Aldrich) se disolvió en ácido acético a 40mM, obteniendo una concentración final de 4 mg/mL. La solución resultante se diluyó 1:10 con agua destilada hasta una concentración final de 0,4 mg/mL. Las muestras se sumergieron en la solución preparada durante 48h a 37°C, tras lo cual se secaron a temperatura ambiente.

Microestructura y análisis de los recubrimientos obtenidos

Uno de los principales requisitos de los tratamientos posteriores al proceso de proyección térmica es tener el efecto mínimo sobre las propiedades de los recubrimientos, con el fin de mantener su funcionalidad [19]. Las secciones transversales de los recubrimientos se observaron por SEM tras los tratamientos con NaOH y colágeno con el fin de evaluar si la estructura conservaba su continuidad y consistencia (Figura XI.1.).

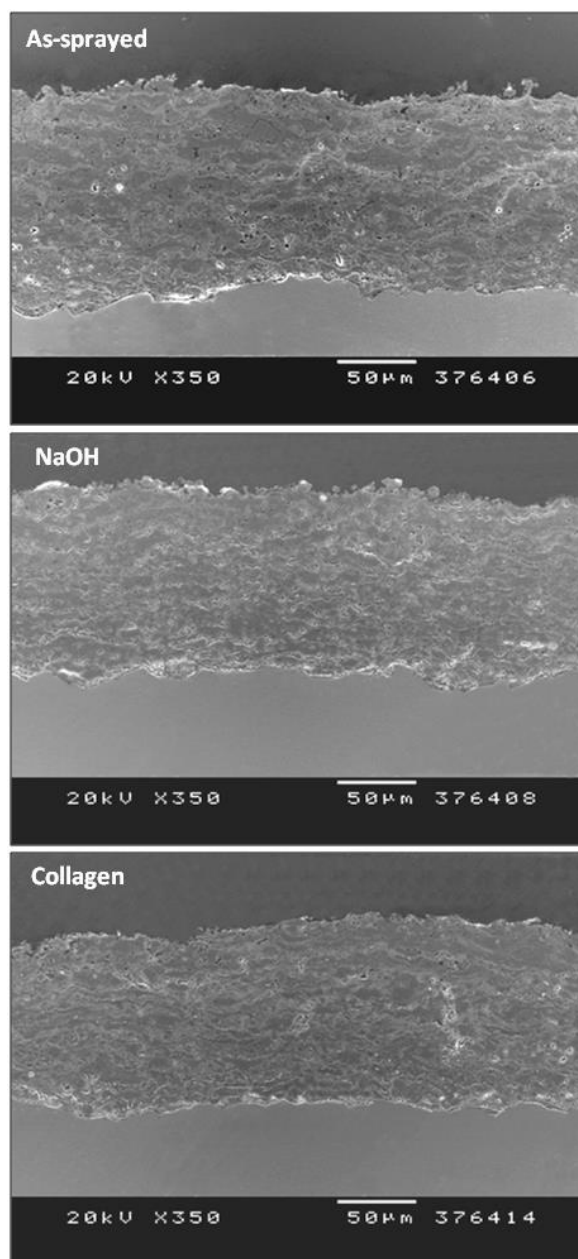


Figura XI.1. Sección transversal de los tres recubrimientos estudiados.

No se encontraron diferencias entre los tres recubrimientos observados: la cohesión entre las capas y de distribución de poros eran muy similares. No se

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

detectó una cantidad significativa de disolución del recubrimiento, y la interfaz recubrimiento-sustrato mantenía la continuidad en todos los casos. A partir de estudios previos [20] se sabe que tras la inmersión en soluciones fisiológicas simuladas, se producía una disolución rápida de las fases amorfas de la HAp, que reducía la adherencia del recubrimiento al sustrato. El hecho de que esta pérdida de adherencia no se detecte para estos tratamientos se considera un indicador de que ambos tratamientos podrían ser aceptables con respecto a la funcionalidad mecánica de los recubrimientos.

Aunque la observación microestructural no muestra alteración de las interfaces, una investigación adicional debe llevarse a cabo con el fin de garantizar que las propiedades mecánicas se conservan.

Las Figuras XI.2.a a 2.c muestran las superficies de los tres recubrimientos estudiados.

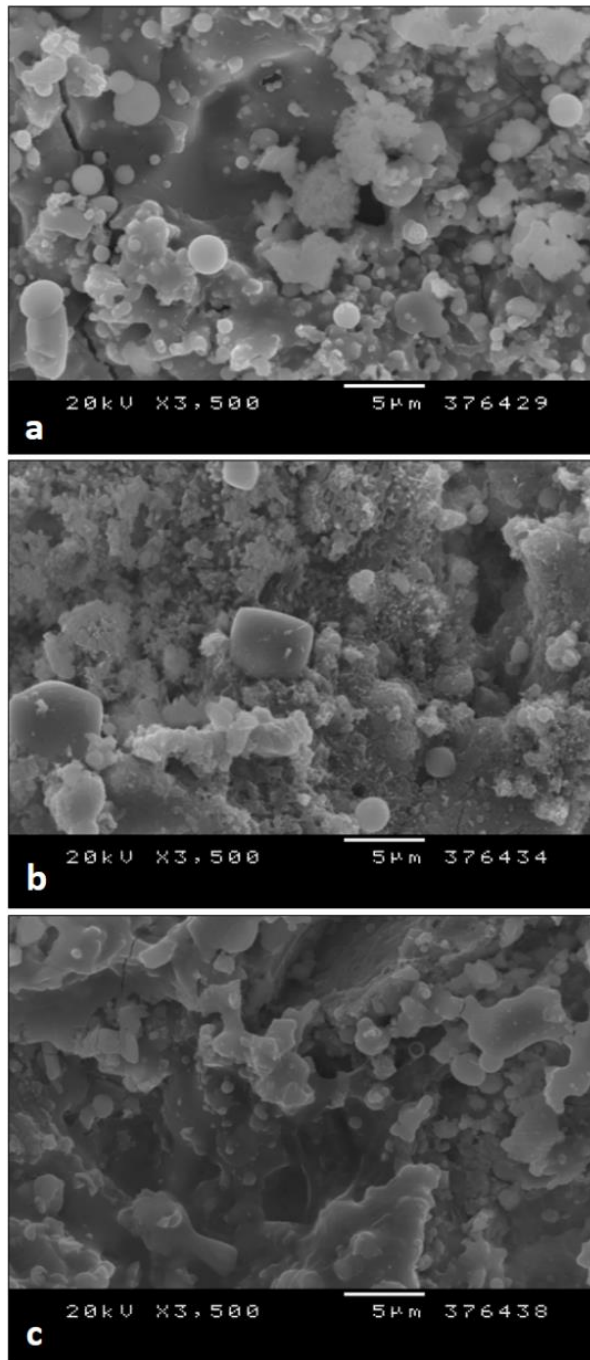


Figura XI.2. Superficie de las muestras, a) recién proyectada, b) tratada con NaOH, c) tratada con colágeno

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La Figura XI.2.a presenta la superficie típica de una muestra recién proyectada de materiales similares a los estudiados [21]. Partículas fundidas (splats), así como partículas no fundidas y salpicaduras de las partículas fundidas pueden ser identificadas en las micrografías. Los espectros de EDX mostraron los elementos esperables, Ca, P, Ti, O derivados de los polvos de proyección y Au del sputtering. El calcio y el fosfato no sólo estaban presentes en el polvo inicial, hidroxiapatita, sino que también lo están en las nuevas fases producidas después de la degradación térmica durante la proyección, como fosfatos tricálcicos (α -TCP); el Ti se debe a la presencia inicial de rutilo, pero también a la presencia de otras fases de óxido de titanio aparecidas después de la proyección térmica (anatasa) [19].

La superficie tratada con NaOH (Figura XI.2.b) mostraba claras diferencias con la anterior. Muchos de los elementos presentes en el espectro EDX eran los mismos que en la muestra recién proyectada, como era de esperar. La estructura es muy similar, pero aparece cubierta con un precipitado de estructura nanométrica en muchas zonas. Éste podría corresponder a un precipitado de sodio atraído por la carga negativa (-OH de la hidroxiapatita) de la superficie. Una sección transversal de la zona del recubrimiento cercana a la superficie fue mapeada (la distribución atómica se muestra en la Figura XI.3.), y los resultados corroboran este hecho: el sodio se deposita sobre la superficie, preferentemente en las zonas de fosfato de calcio, mientras que la zona de Ti aparece libre de sodio.

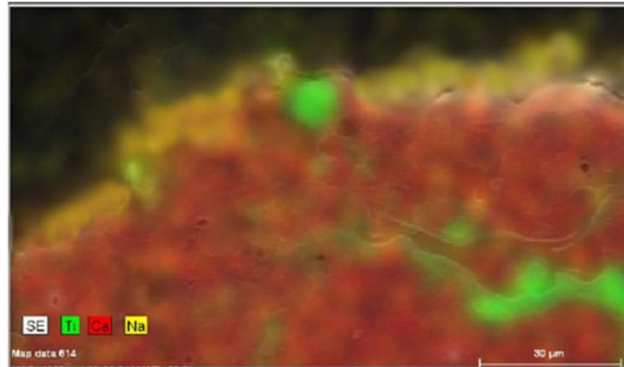


Figura XI.3. Mapeo EDX de la muestra tratada con NaOH (sección transversal)

La Figura XI.2.c indica que la estructura de la superficie del recubrimiento tratado con colágeno es similar a la del recubrimiento recién proyectado. La única diferencia notable es la menor cantidad de salpicaduras. Estas salpicaduras, que están menos adheridas al recubrimiento, podrían haber sido eliminadas por el tratamiento debido a los enjuagues sucesivos. Las fibrillas de colágeno no se observaron a estos aumentos, y los resultados de EDX no mostraron diferencias con los recubrimientos as-sprayed.

También se obtuvieron imágenes FESEM (Figura XI.4.) con el fin de identificar el colágeno en la superficie.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

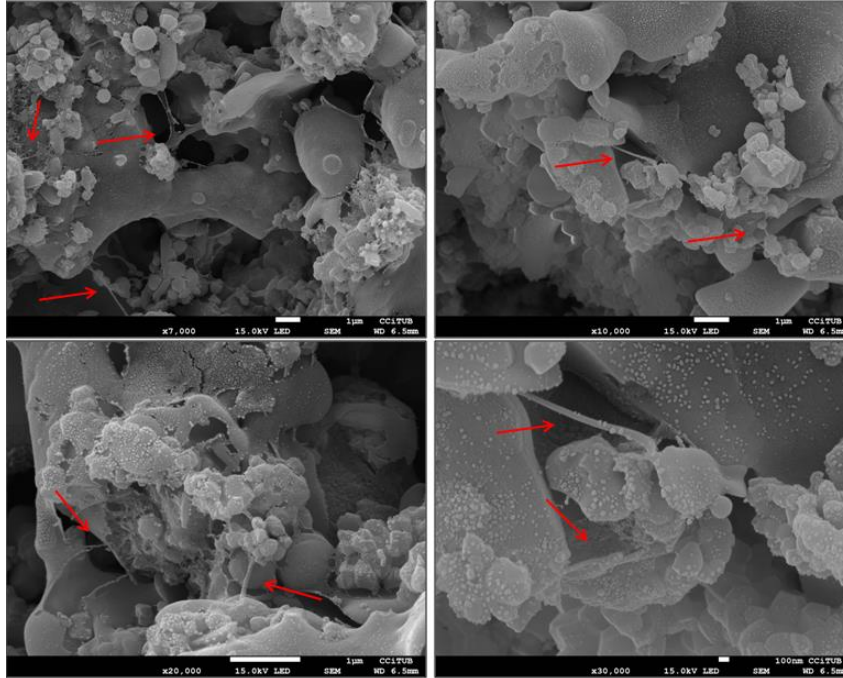


Figura XI.4. Fibras de colágeno enlazadas a los recubrimientos

Las fibrillas de colágeno, indicadas con flechas rojas, eran completamente visibles a ampliaciones superiores. El hecho de que las muestras se enjuagaran con PBS y agua destilada varias veces, así como que fueran sumergidas en alcohol y secadas, se considera un indicador de la existencia de un enlace directo entre el colágeno y el recubrimiento. Este colágeno se mantuvo en la superficie, por tanto estaba bien adherido a la misma (ya sea mecánicamente, como las fibrillas de colágeno en los poros de la superficie, o químicamente), y no sólo depositado.

Los recubrimientos se analizaron también por espectroscopía de infrarrojos con el fin de identificar grupos funcionales (Figura XI.5.).

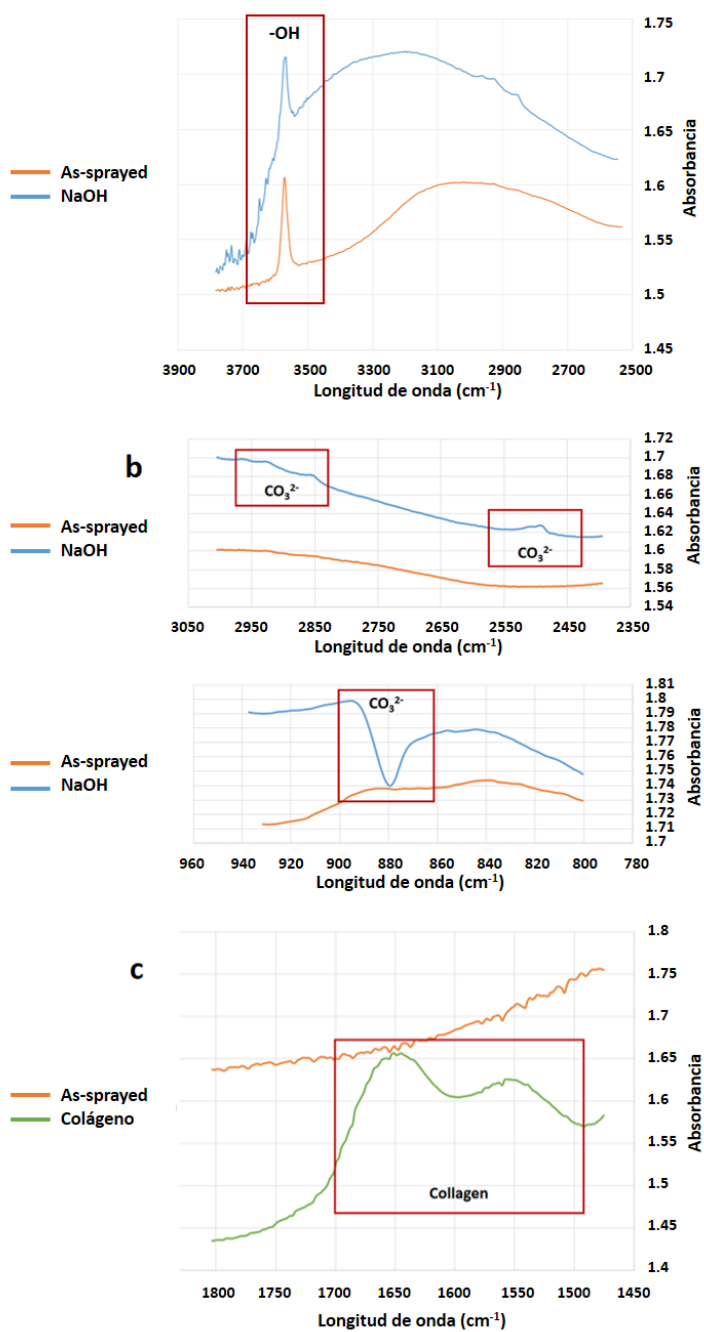


Figura XI.5. Espectro IR de las superficies, a) zona -OH zone, muestras as-sprayed y tratadas con NaOH, b) zonas de carbonatos, muestras as-sprayed y tratadas con NaOH, c) zona de proteínas, muestras as-sprayed y tratadas con colágeno

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La figura XI.5.a muestra la presencia de radicales -OH en los recubrimientos as-sprayed, y la consecuente carga negativa de la superficie, esperada de acuerdo con la literatura [22]. El pico claro en torno a una longitud de onda de 3574cm^{-1} , debido a la presencia de radicales -OH sobre la superficie, corrobora la afirmación anterior de que, para la muestra tratada con NaOH, el sodio migra hacia estos radicales y precipita en la superficie. La muestra tratada con NaOH también presenta un pico de -OH, que podría atribuirse a la existencia de -OH no cubierto por el sodio precipitado, así como a la posible nueva formación de radicales -OH sobre las zonas de óxido de titanio después del tratamiento con NaOH [23,24].

Una diferencia notable entre la muestra tratada con NaOH y la muestra recién proyectada es la presencia de carbonato, detectado por picos en alrededor de 2920 , 2496 y 876 cm^{-1} (Figura XI.5.b) después del tratamiento en una solución alcalina acuosa a 80°C durante 24 horas. La sustitución por carbonato en la hidroxiapatita proporciona un mejor comportamiento in vitro que el obtenido para hidroxiapatitas no-sustituidas [25], principalmente debido a las características físicas inducidas, tales como la variación del tamaño de grano de la hidroxiapatita [26]. En este caso, y de acuerdo con Cerruti y Mortera [27], el carbonato está presente en la superficie como consecuencia de la carbonatación en presencia de un exceso de agua, con la forma de una capa de hidroxicarbonato. Como el sodio también se había detectado en la superficie, se puede argumentar que la precipitación en la superficie detectada por SEM es un hidroxicarbonato de sodio nanoestructurado.

La presencia de colágeno en la superficie de la muestra tratada con colágeno fue identificada por los picos típicos de las proteínas, en torno a 1646 y 1556 cm^{-1} (Figura XI.5.c), corroborando las observaciones hechas para las imágenes FESEM.

Ensayos in vitro

La tinción fluorescente live/death se llevó a cabo con el fin de evaluar la viabilidad y la distribución de los osteoblastos cultivados sobre los tres recubrimientos estudiados. A 1 y 3 días aún había pocas células en la superficie, pero a los 7 días había suficientes células para hacer una comparación entre las tres superficies (Figura XI.6.).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

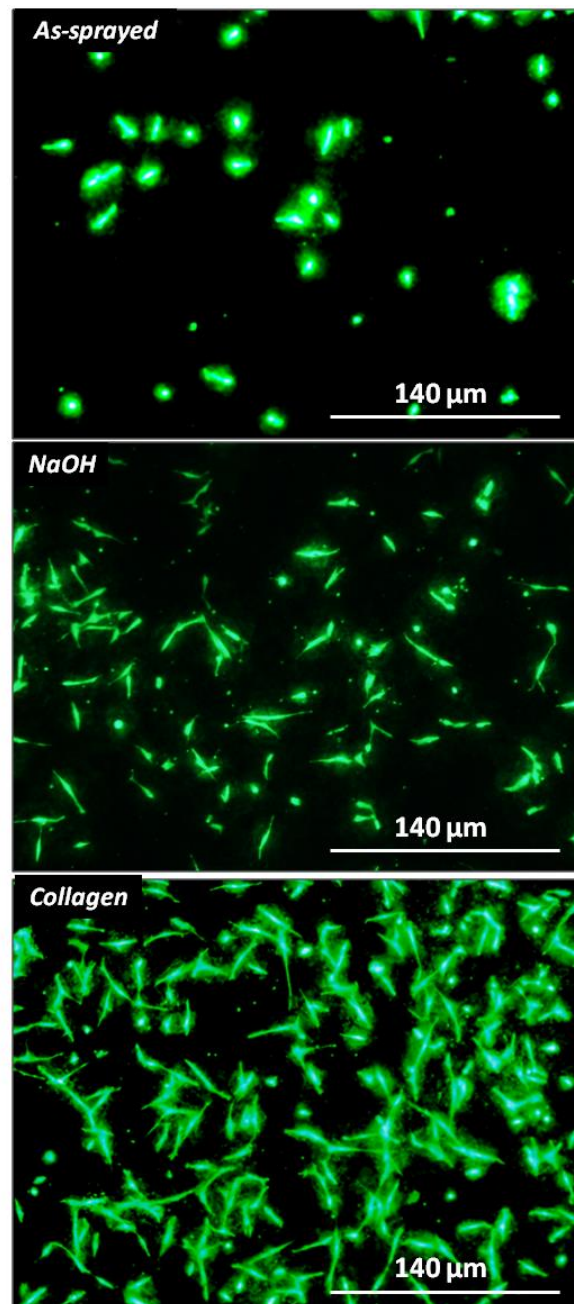


Figura XI.6. Superficie de las tres muestras por fluorescencia tras 7 días de cultivo

En la muestra no tratada, el número de células en la superficie es mucho menor que para las muestras tratadas. Ambos tratamientos, especialmente el del colágeno, mejoraron claramente la adhesión y crecimiento celular, pero no se detectaron células muertas en ningún caso. La bioactividad osteoblástica del colágeno demostró su eficacia en las muestras correspondientes, pero en las muestras tratadas con NaOH, la presencia de radicales -OH no se consideró la causante de este efecto positivo, ya que también estaban presentes en la muestra recién proyectada, así como tampoco se atribuyó a la presencia de sodio, que tiene un papel importante en la densidad ósea [28] pero no a través del contacto directo. Sin embargo, el hecho de que una capa nanoestructurada de hidroxicarbonato de sodio hubiera precipitado en la superficie sí podría ser una causa de la mejora del comportamiento de las células debido a la bioactividad bien conocida de la rugosidad nanométrica, que aumenta la energía superficial y conduce a mayores interacciones de proteínas determinadas que incrementan la adhesión celular específica [31,30].

La actividad fosfatasa alcalina se midió hasta 7 días post- cultivo (Figura XI.7.) con el fin de evaluar el estado de diferenciación de los osteoblastos en los cultivos de los biomateriales testados.

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

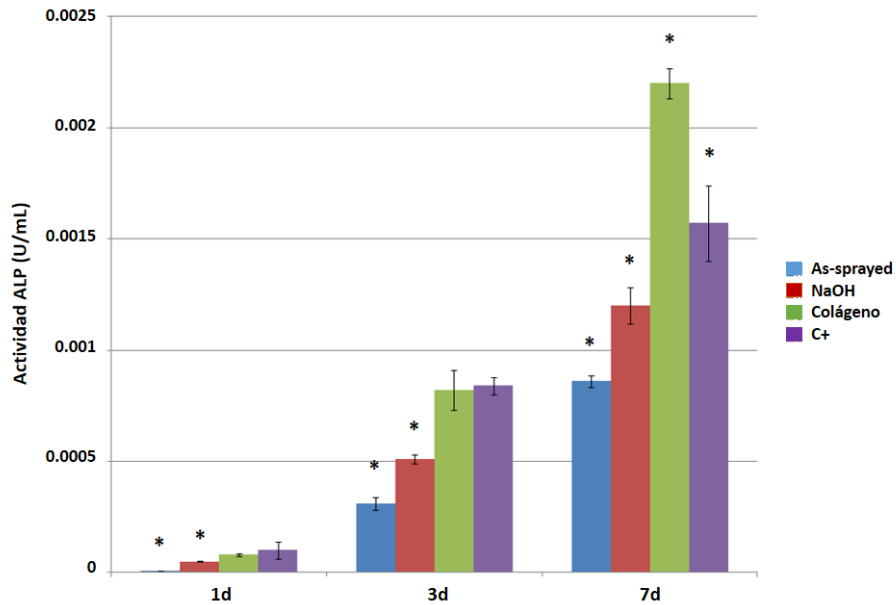


Figura XI.7. Actividad ALP de las diferentes muestras

Tras el primer día de cultivo, la actividad ALP, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los casos, se consideró demasiado baja como para sacar alguna conclusión. Las diferencias empezaron a ser importantes entre los tres casos estudiados a partir del tercer día de cultivo. Los recubrimientos tratados con NaOH mostraron un mejor comportamiento que las muestras recién proyectadas aunque los valores no alcanzaron los resultados del control positivo. Las células sembradas sobre las muestras tratadas con colágeno fueron las que mayor actividad de ALP presentaron, con valores comparables a los controles positivos a los tres días de cultivo y muy superiores a los 7 días. Se atribuyeron estas diferencias entre los casos, como se ha explicado más arriba, a la bioactividad osteogénica del colágeno en las muestras tratadas con colágeno, y a la bioactividad inducida por la nanoestructura del precipitado de carbonato de sodio en las muestras

tratadas con NaOH. Aunque ambos tratamientos representan una mejora en el comportamiento de células in vitro, la diferencia es especialmente notable para la muestra tratada con colágeno, que tras 7 días de cultivo presentó actividades de ALP más elevadas que el control positivo y mucho más elevadas que las muestras as-sprayed.

Las muestras se observaron mediante SEM para evaluar la morfología celular y la adhesión a las superficies. Las muestras as-sprayed (Figura XI.8.a) presentan una baja densidad celular con amplias zonas sin células.

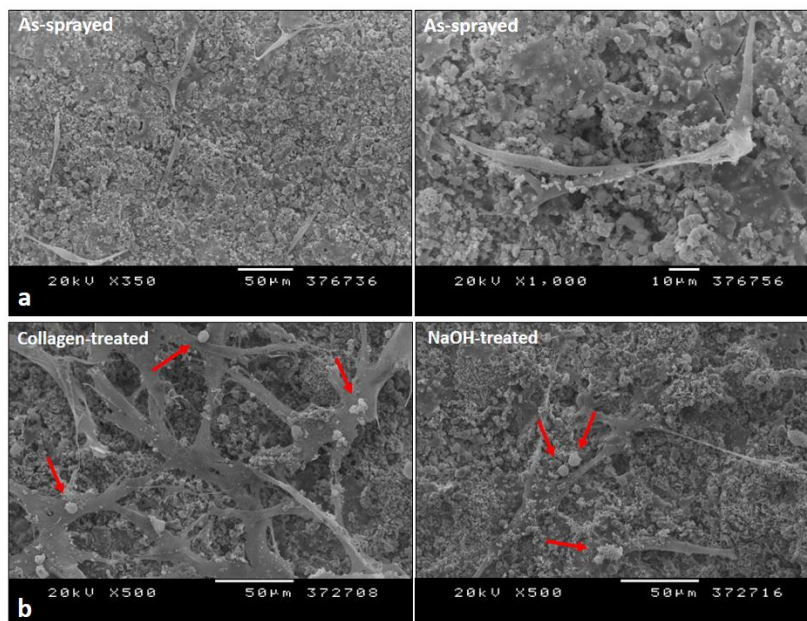


Figura XI.8. Observación de las muestras por SEM tras 7 días de cultivo, a) muestras as-sprayed, b) muestras tratadas con colágeno y NaOH

Aunque las células conservan la forma osteoblástica, con filopodia extendiéndose sobre la superficie, las muestras as-sprayed no han sido capaces de crear un microentorno donde los osteoblastos pudieran adherirse

y proliferar fácilmente. En contraste, las muestras tratadas con NaOH y colágeno (Figura XI.8.b) presentan una mayor cantidad de células en sus superficies, donde es incluso posible identificar glóbulos de CaP (ver flechas rojas en las figuras XI.8.a y 8.b), una indicación del inicio de mineralización que surge de la diferenciación celular. Concretamente, la muestra tratada con colágeno muestra una densidad celular más elevada que la muestra tratada con NaOH, que de nuevo es una prueba del mejor comportamiento osteogénico del colágeno frente a las otras opciones estudiadas.

XI.2.2. Informaciones complementarias

El tratamiento alcalino se escogió tras analizar la bibliografía. Se tomó una concentración de NaOH de 5M, por ser la más utilizada [31], y se probaron dos relaciones tiempo-temperatura diferentes: 24h a 80°C y 48h a 60°C. La elección se hizo tras observar por SEM y analizar por EDS las superficies libres y transversales de los recubrimientos.

Observación de la superficie por SEM

En las Figuras XI.9. a XI.11. se puede ver la superficie de las muestras recién proyectadas, con el tratamiento alcalino de 24h a 80°C, y con el tratamiento alcalino de 48h a 60°C.

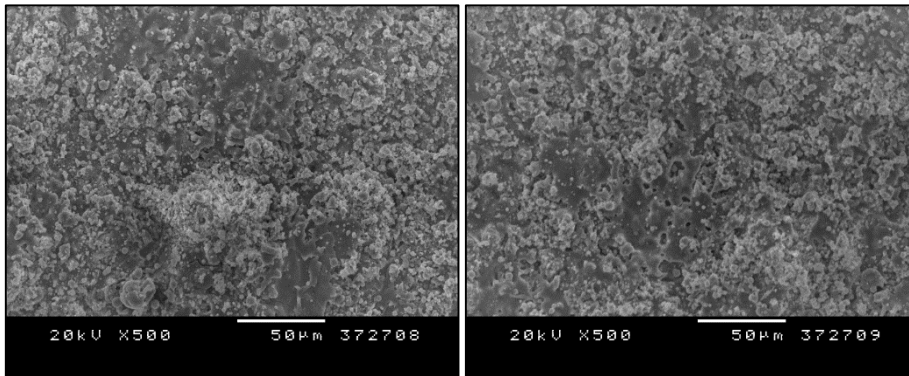


Figura XI.9. Superficie de la muestra as-sprayed

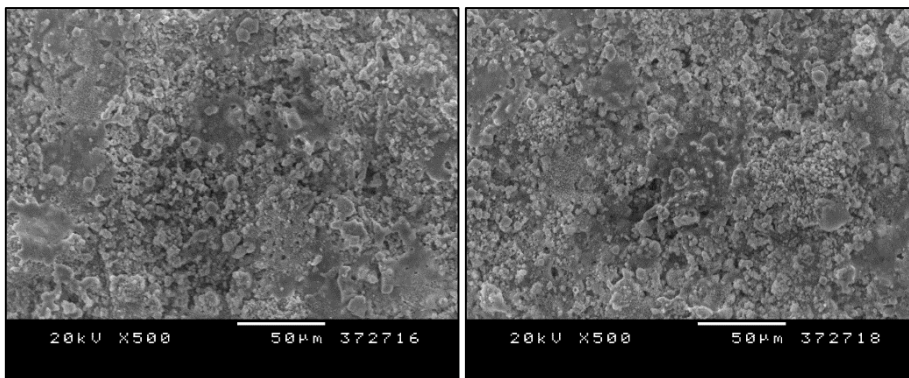


Figura XI.10. Superficie de la muestra tras la inmersión durante 24h a 80°C

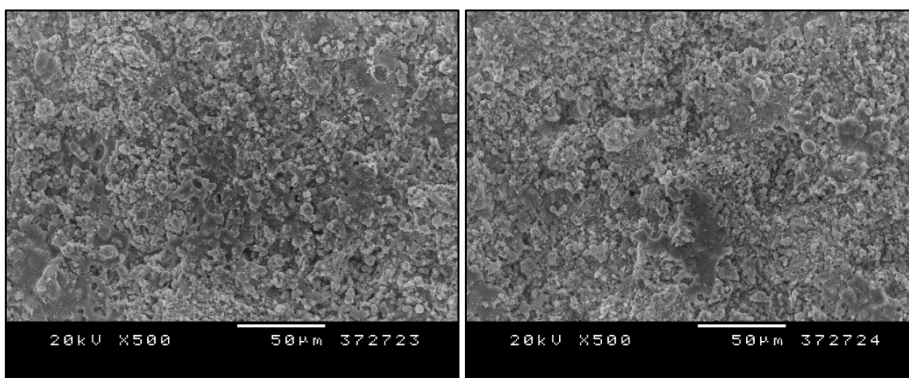


Figura XI.11. Superficie de la muestra tras la inmersión durante 48h a 60°C

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

En todas las muestras se distingue la estructura típica en las muestras recién proyectadas. Son visibles los splats (partículas fundidas), así como zonas no fundidas o parcialmente fundidas y salpicaduras resultantes de las partículas que sí han fundido. Estas últimas son mucho menos visibles en las muestras tratadas. La diferencia principal entre la muestra sin tratar y las dos muestras tratadas es que estas últimas, especialmente en la de 24h a 80°C, se detecta un precipitado nanométrico en muchas zonas sobre la estructura típica de la proyección térmica.

Análisis por dispersión de energía de rayos X

En la Figuras XI.12. a XI.17. se pueden ver los mapas de superficie (mappings) y los espectros EDX obtenidos para cada caso.

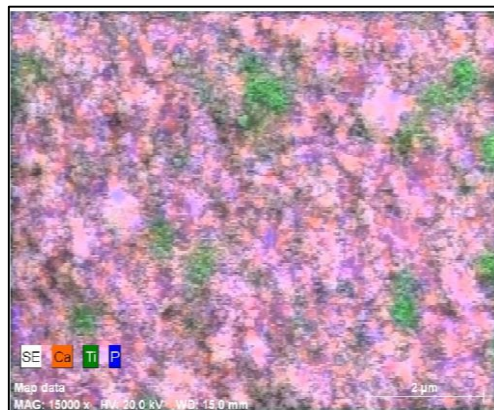


Figura XI.12. Mapping de la superficie as-sprayed

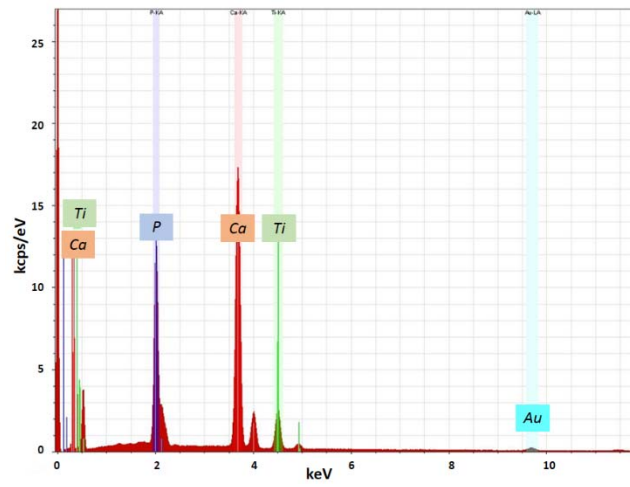


Figura XI.13. Espectro correspondiente a la superficie as-sprayed

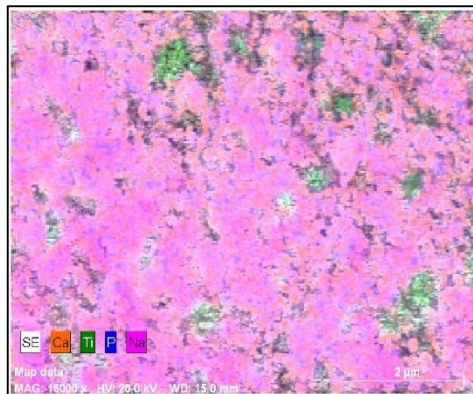


Figura XI.14. Mapping de la superficie tratada durante 24h a 80°C

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

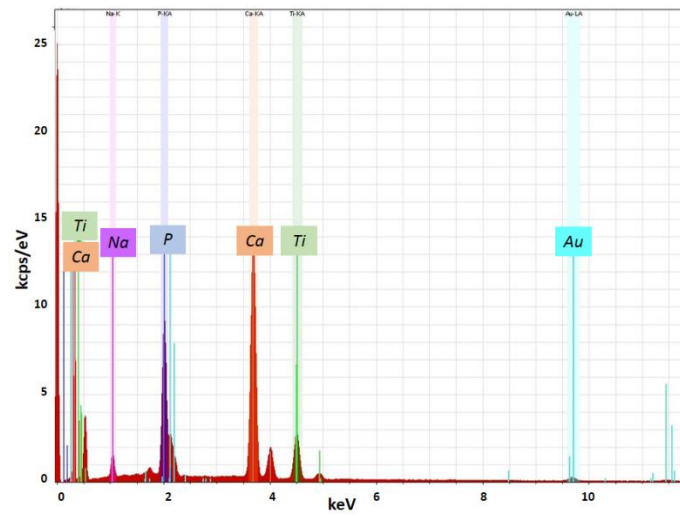


Figura XI.15. Espectro correspondiente a la superficie tratada durante 24h a 80°C

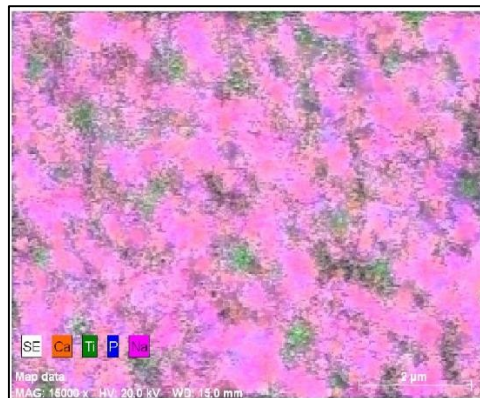


Figura XI.16. Mapping de la superficie tratada durante 48h a 60°C

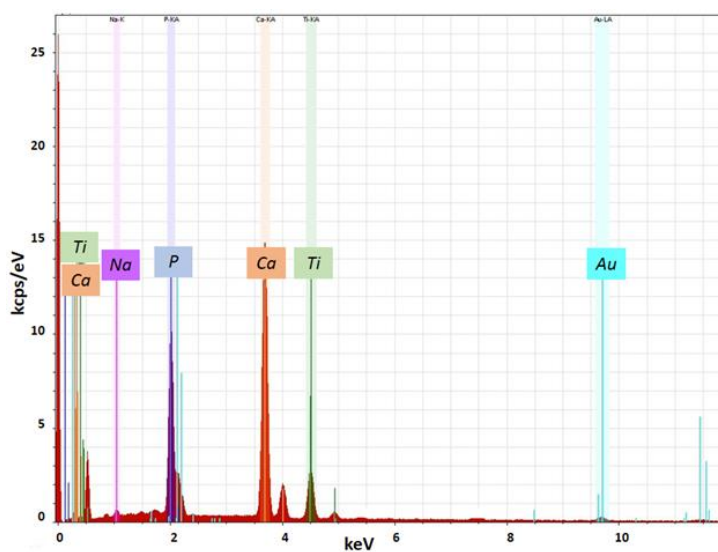


Figura XI.17. Espectro correspondiente a la superficie tratada durante 48h a 60°C

Los mappings de la superficie revelan, tal y como se explica en el artículo previo, cómo el sodio ha precipitado en superficie en las muestras tratadas, preferentemente en las zonas de fosfatos de calcio mientras que las de titania se aprecian libres de sodio en superficie. A partir de los espectros, se puede deducir que la magnitud de la capa que ha precipitado es mayor para el tratamiento a 80°C durante 24h, como se deduce del mayor pico de sodio detectado.

Espectroscopía infrarroja

En la Figura XI.18. se pueden ver los tramos de espectro correspondientes a la zona de enlaces –OH para cada uno de los casos

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO2 obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

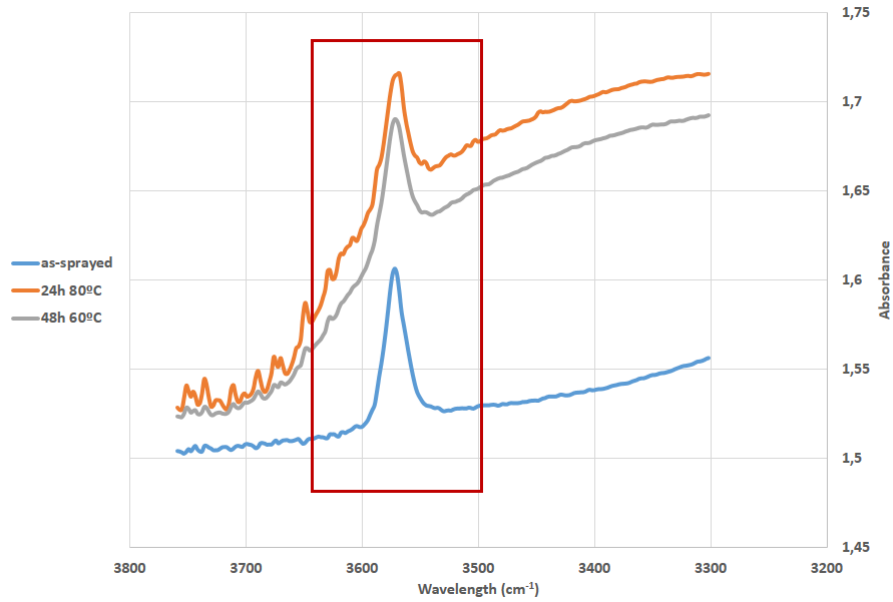


Figura XI.18. Espectro de IR para los tres casos, zona -OH

El pico de -OH es notorio en los tres casos examinados, y no se aprecian grandes diferencias entre los dos tratamientos considerados.

En la Figura XI.19. se pueden ver los tramos de espectro correspondientes a las zonas de carbonatos.

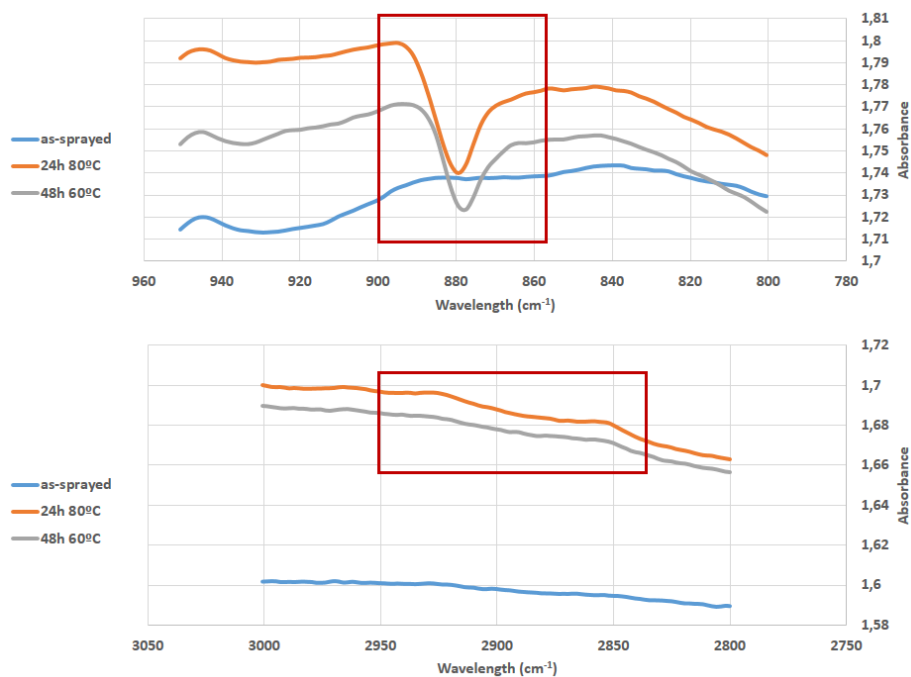


Figura XI.19. Espectro de IR para los tres casos, zonas carbonatos

Los picos correspondientes a los carbonatos también aparecen en ambos tratamientos, aunque son mucho más nítidos y amplios en el caso del tratamiento a 80°C durante 24h. Al haberse detectado en los EDS la presencia de sodio, es fácil concluir que el precipitado de la superficie de las muestras tratadas corresponde a un carbonato de sodio nanométrico.

Elección del tratamiento

Tras el análisis de estos resultados, se ha tomado el tratamiento a 80°C durante 24h por tres importantes razones:

- El pico correspondiente a los enlaces –OH es igual o mayor que en el caso del tratamiento a 60°C durante 48h. Al tratarse de un efecto que

según bibliografía favorecería la bioactividad [16], era importante considerarlo.

- Aparece una precipitación nanométrica de carbonato de sodio en superficie. Aunque, de por sí, no sea un compuesto bioactivo, el efecto de una superficie nanorugosa se prevé importante por su conocida influencia en la biocompatibilidad [32], de ahí que se haya preferido la muestra que mostraba más cantidad de este precipitado.
- Considerando el tiempo como un recurso importante, es evidente que siempre será preferible el tratamiento a un tiempo más corto.

XI.3. Adición de propiedades bactericidas

Esta sección se planteó también como una comparación entre dos opciones que posibilitarían la adición de propiedades bactericidas en el recubrimiento.

La primera opción sería la adición a priori de porcentajes del 2 y 5% de ZnO nanoestructurado al polvo de partida, para incorporar en el recubrimiento resultante este compuesto bactericida. La segunda, la impregnación del recubrimiento ya obtenido en un antibiótico, gentamicina. Los detalles y resultados del trabajo realizado se pueden ver a continuación.

Condiciones de proyección y tratamientos realizados

Las condiciones de proyección de las probetas (con y sin ZnO) se pueden ver en la Tabla XI.1..

El óxido de zinc (American Elements) se incorpora en la mezcla mecánica del polvo en porcentajes máxicos del 2 y el 5% [33,34,35] antes de proyectarla. El tratamiento con sulfato de gentamicina (Sigma Aldrich), tras pruebas iniciales, se definió como una inmersión durante 24h en solución Hanks con una concentración de sulfato de gentamicina de 2mg/mL, seguida de un secado de 60 minutos a 55°C [36,37,38].

Caracterización del polvo de ZnO y microestructura y análisis de los recubrimientos

La caracterización del polvo de ZnO por DRX reveló que éste se encontraba en una fase de wurtzita cristalina. Su distribución granulométrica, una campana gaussiana de entre 10 y 50 micras, era muy similar a las de los otros dos polvos estudiados. La morfología de las partículas se puede observar en la Figura XI.20.: se trata de partículas esféricas, con una estructura porosa resultante de la aglomeración de polvos nanométricos.

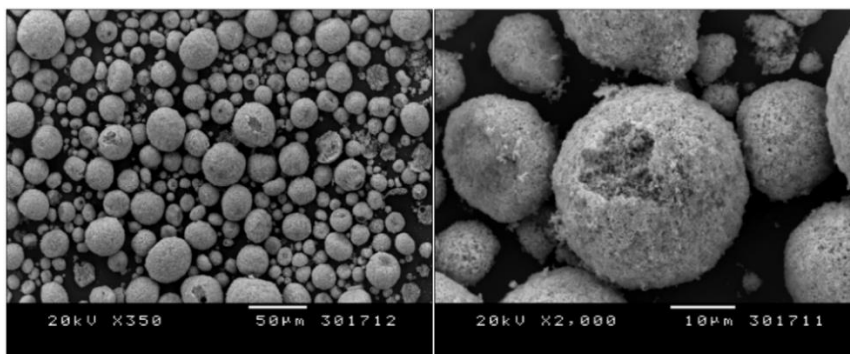


Figura XI.20. Partículas de ZnO. Morfología por SEM

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La observación de las superficies de los recubrimientos por SEM y su análisis por EDX (Figura XI.21.a a 21.c) mostró que la superficie y composición de la muestra recién proyectada son las esperadas para estos materiales y este proceso de proyección [21].

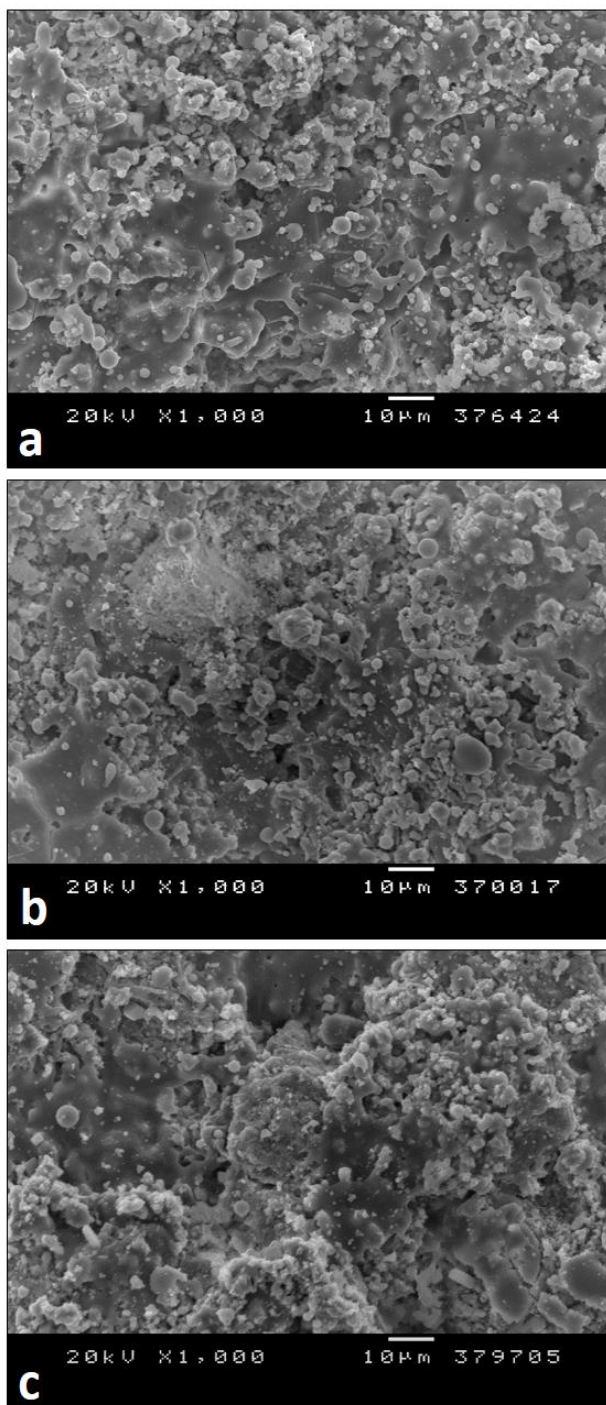


Figura XI.21. Superficies de las tres muestras: a) as-sprayed, b) con ZnO (5%), c) tratada con gentamicina

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

Una espectroscopía infrarroja de estas muestras (Figura XI.22.) permitió la identificación de un pico indicativo de la importante presencia de radicales OH en la superficie.

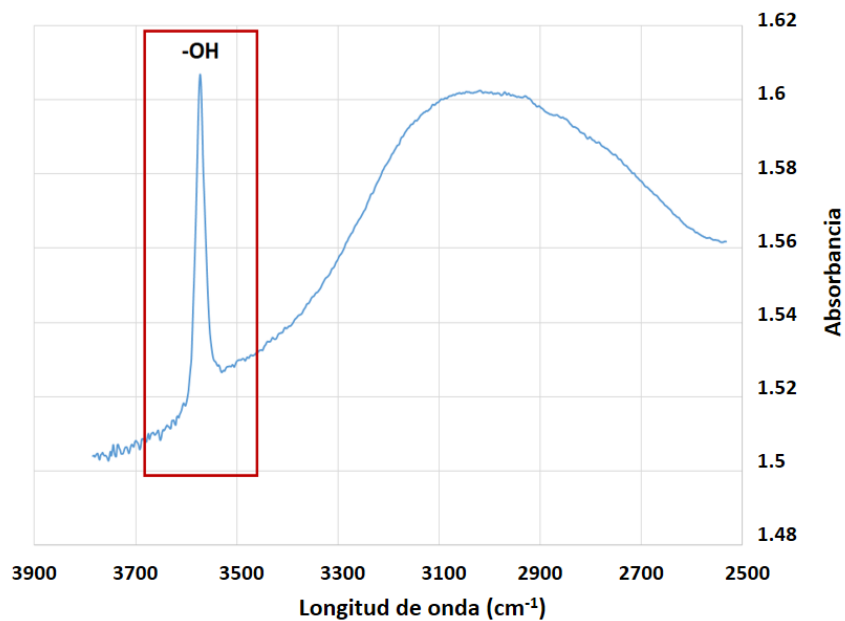


Figura XI.22. Espectro IR de la muestra as-sprayed, zona -OH

La superficie de la muestra con ZnO (Figura XI.21.b) era muy similar a la de la recién proyectada. La presencia de pequeñas cantidades de ZnO no tuvo influencia sobre la microestructura de la superficie. Análisis por EDX mostraron la presencia de los elementos previstos (los mismos que para las muestras de HAp-TiO₂) y también un pico correspondiente al zinc. Una cuantificación indicó que la cantidad de cinc en peso estaba muy cerca de la cantidad en el polvo inicial: 1,7wt% para la muestra con 2% en peso de ZnO en

la mezcla de polvo, y 4,4wt % para la muestra con 5% en peso de ZnO en la mezcla de polvos. Por tanto, el ZnO se consideró incorporado en el recubrimiento.

La superficie de la muestra tratada con gentamicina (Figura XI.21.c) muestra la microestructura típica de un recubrimiento biocerámico después de una inmersión de 24 h en condiciones fisiológicas. La nucleación de una capa de apatita en la superficie ha comenzado en diferentes zonas, en forma de glóbulos. Análisis por EDX identificaron nitrógeno (presente en la gentamicina) en la superficie, pero las limitaciones del equipo hacían extremadamente difícil detectar este elemento. Sólo los elementos esperados (presentes en la mezcla de polvo inicial), además de los picos correspondientes al sodio y al cloro (presentes en la solución de Hanks) aparecieron. Un mapeo por EDX de la sección transversal (Figura XI.23.) reveló que el cloruro de sodio había penetrado hasta capas cercanas al sustrato por la porosidad interconectada derivada de la disolución parcial del recubrimiento tras 24 h de inmersión.

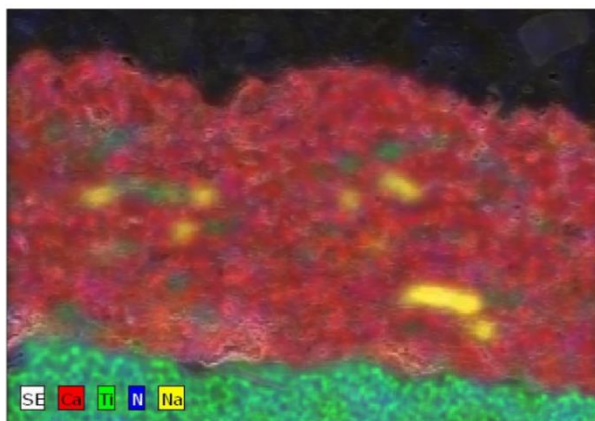


Figura XI.23. Mapeo EDX de la sección transversal de la muestra tratada con gentamicina

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La presencia de un precipitado de cloruro de sodio en las capas internas del recubrimiento podría ser interpretada como un indicador de la presencia de gentamicina a los mismos niveles. Una de las consecuencias que podría esperarse de ello es una liberación lenta de la gentamicina en el tiempo, ya que debe ser liberada desde capas profundas. También se espera que el cubrimiento progresivo de la superficie con una capa de apatita actúe como un tapón y ayude a la prevención de la liberación completa del antibiótico en la etapa inicial de la implantación.

Los resultados de las pruebas bacterianas se muestran en las Figuras XI.24. y XI.25.. Los resultados de las muestras con ZnO (Figura XI.24.) indican que la adición de este compuesto no tiene un efecto significativo en el comportamiento de cualquiera de las tres bacterias.

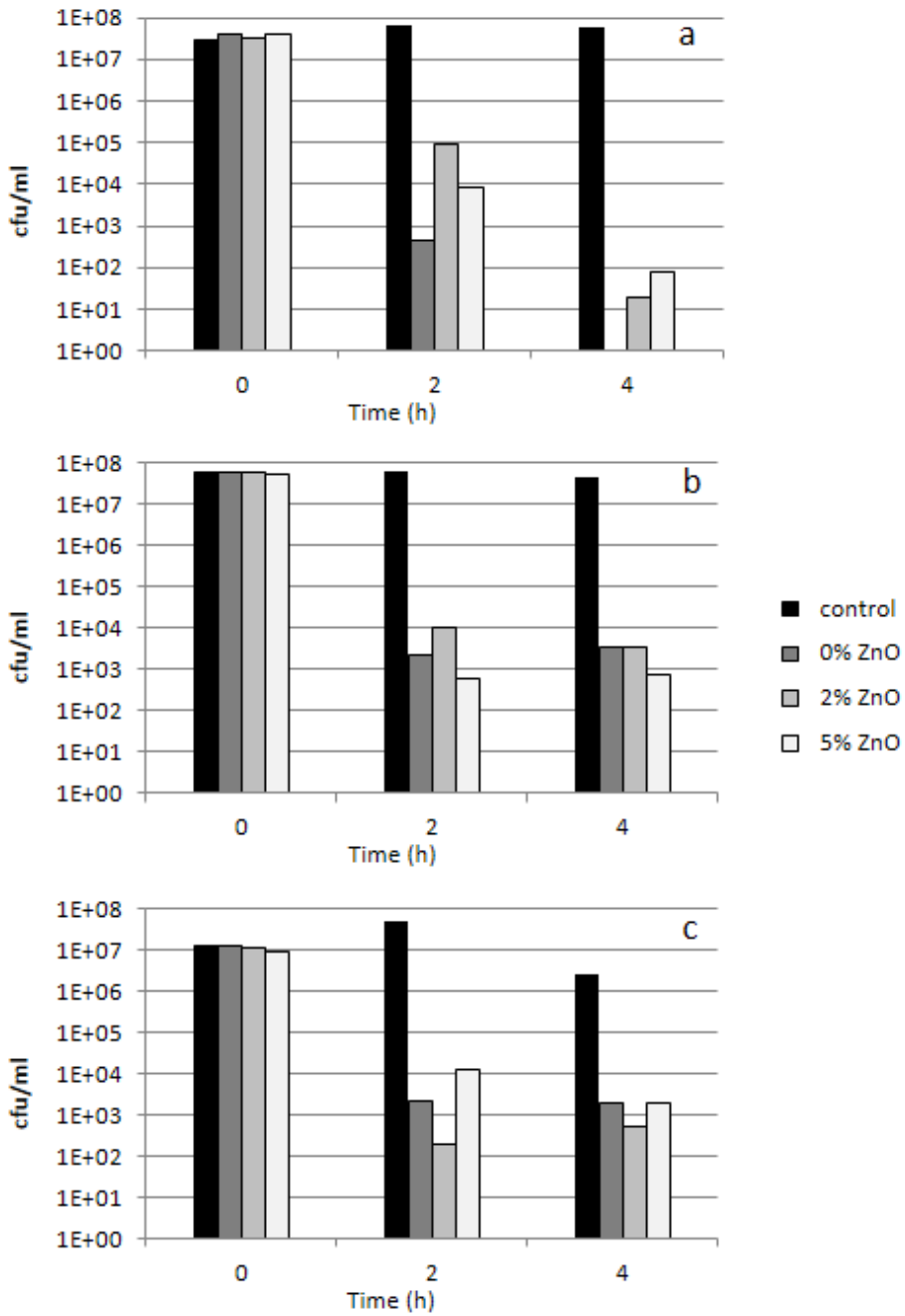


Figura XI.24. Efecto del tratamiento con ZnO en la evolución de la supervivencia de las bacterias en solución a 0, 2 y 4 horas: a) *E. coli*, b) *P. aeruginosa*, c) *S. aureus*

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

La muestra no tratada mostró un efecto antibacteriano equivalente al de las muestras con óxido de zinc, o incluso más importante. Los espectros infrarrojos de la muestra no tratada mostraban un pico importante atribuido a la presencia de radicales -OH. De acuerdo con la literatura [39,40], estos radicales son un factor importante en los compuestos bactericidas, y causan un estrés oxidativo que tiene un fuerte efecto sobre algunos tipos de bacterias. Esto podría explicar el efecto antibacteriano de las muestras asprayed. El efecto bactericida fue similar para las tres bacterias, lo cual podría ser un indicador del efecto del estrés oxidativo sobre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La mera presencia de los recubrimientos reduce aproximadamente 4-5 órdenes de magnitud la presencia de bacterias en la solución con respecto a los controles, y por lo tanto se puede decir que la presencia de bacterias se reduce un 100%. Una interpretación del efecto bactericida ligeramente inferior de las muestras con ZnO podría ser la menor presencia de radicales -OH en la superficie debido a que parte de la superficie está compuesta de ZnO. El hecho de que un compuesto bactericida bien conocido como el ZnO no mostrara ningún efecto en este caso podría atribuirse que éste efecto bactericida del cinc sólo se da para concentraciones de Zn²⁺ por encima de 4-8 mM (la concentración mínima inhibitoria) [33], y es posible que esta concentración no se alcanzara en estos casos. Se necesitan más estudios para aclarar la evolución de la concentración de iones de zinc en solución a diferentes tiempos de cultivo y aclarar este punto.

En cuanto a las pruebas con gentamicina, los resultados en la Figura XI.25. muestran que el recubrimiento sin gentamicina también indujo una reducción de la viabilidad de las bacterias; de nuevo un signo del efecto antibacteriano importante de las muestras no tratadas (la reducción de la viabilidad era también casi del 100%).

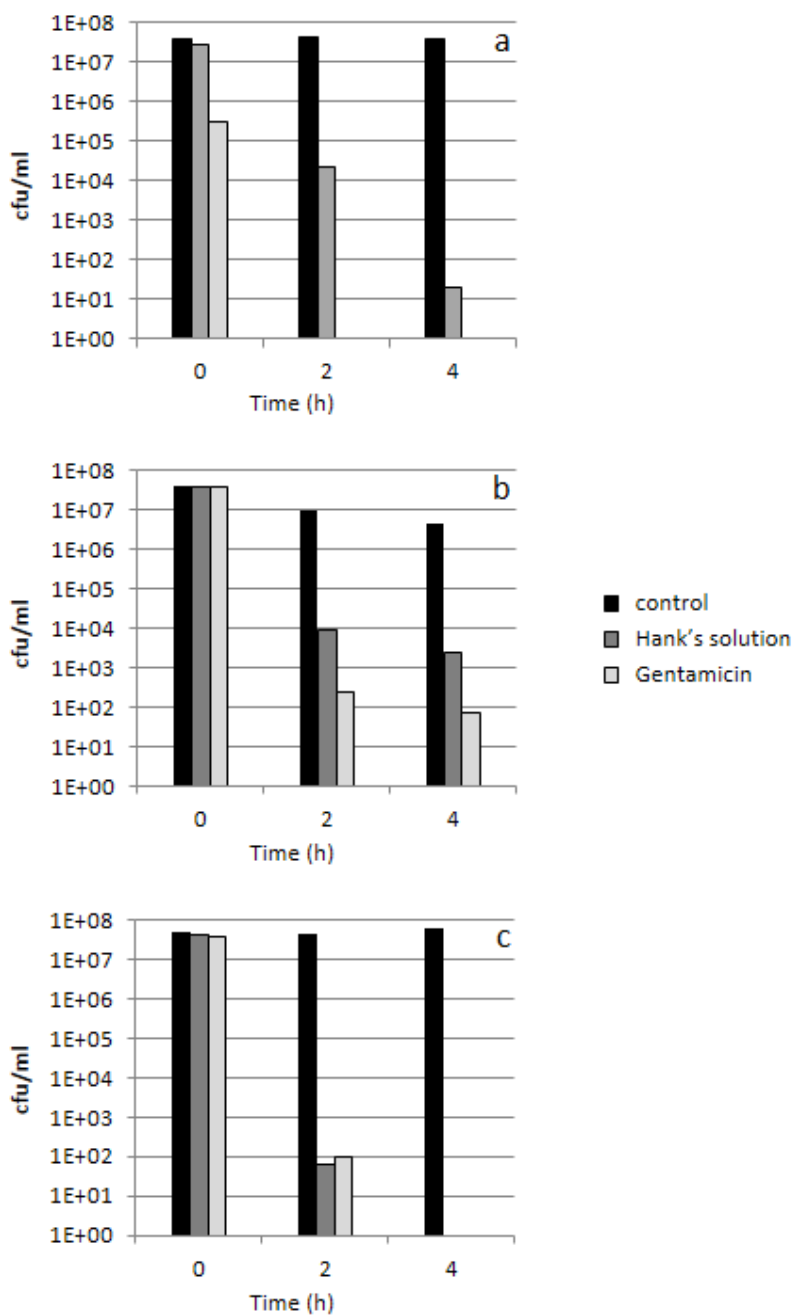


Figura XI.25. Efecto de la gentamicina en la evolución de la supervivencia de las bacterias en solución a 0, 2 y 4 horas: a) *E. coli*, b) *P. aeruginosa*, c) *S. aureus*

Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (HVOF)

Sin embargo, se detectó una mejora para las muestras tratadas. La adición de gentamicina permitió un efecto antibacteriano adicional muy claro contra las bacterias Gram-negativas (lo cual es especialmente importante para microorganismos resistentes tales como *P. aeruginosa*), mientras que para *S. aureus* no se detectaron diferencias importantes con y sin gentamicina.

Ensayos antibacterianos en condiciones de difusión permitieron identificar más diferencias entre las muestras. Como ejemplo el ensayo con *E. coli* se puede observar en la Figura XI.26..

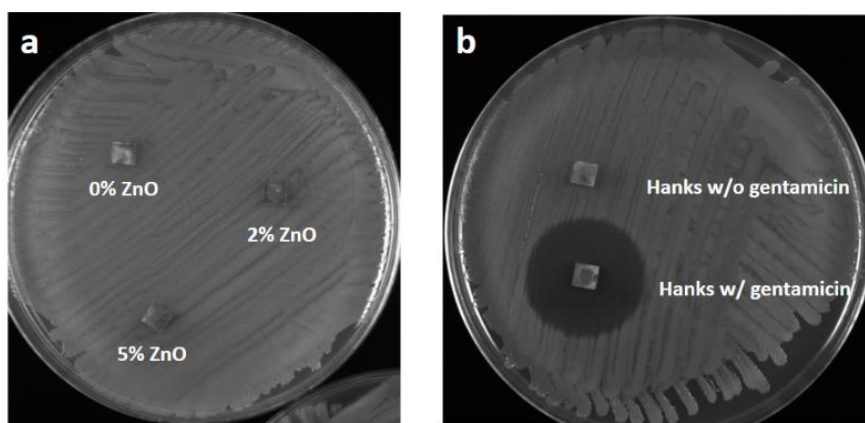


Figure XI.26. Test antibacteriano contra E. coli de: a) muestras tratadas con ZnO y b) muestras tratadas con gentamicina

Mientras que para el ZnO y las muestras no tratadas el efecto antibactericida por difusión no era detectable, las muestras tratadas con gentamicina mostraron claramente una zona de inhibición del crecimiento bacteriano a su alrededor. Esta capacidad bactericida por mecanismos de difusión hace que el tratamiento con gentamicina sea una buena alternativa, ya que combina un excelente comportamiento antibacteriano en solución con un efecto

antibacteriano por contacto y la difusión, lo que hace que sea más apropiado para las condiciones fisiológicas (ambas condiciones son importantes en la implantación).

XI.4. Conclusiones

Este capítulo se planteó como la apertura de una puerta para líneas que pudieran tener un efecto positivo en la mejora de recubrimientos similares a los empleados en esta tesis. Como conclusión de las diferentes opciones estudiadas, se puede decir que tanto la línea abierta en el tratamiento con colágeno como la impregnación de los recubrimientos con gentamicina son buenas opciones. La primera ha demostrado tener un efecto bioactivo importante, que mejora extraordinariamente el comportamiento biológico de los recubrimientos. La segunda ha mostrado que la impregnación de estos recubrimientos con antibióticos es posible, y permite la adición de un efecto bactericida a los recubrimientos.

XI. 5. Referencias

[1] RS Lima, KA Khor, H Li, P Cheang, BR Marple, HVOF Spraying of nanostructured hydroxyapatite for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. A-Struct. Mater. Prop. Microstruct. Process.* 396 (2005) 181-187.

[2] Y Li, IS Lee, FZ Cui, SH Choi, The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium. *Biomaterials* 29 (2008) 2025-2032.

- [3] G Mendonça, DB Mendonça, LG Simoes, AL Araujo, ER Leite, WR Duarte, LF Cooper, FJ Aragao, Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 24 (2009) 205-215.
- [4] W Xia, C Lindahl, J Lausmaa, H Engqvist, Biomimetic Hydroxyapatite Deposition on Titanium Oxide Surfaces for Biomedical Application. En: Prof. Marko Cavrak, editor. *Advances in Biomimetics*. In Tech, available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-biomimetics/biomimetic-hydroxyapatite-deposition-on-titanium-oxide-surfaces-for-biomedical-application> (2011).
- [5] CJ Chung, HY Long, Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses. *Acta Biomater.* 7 (2011) 4081-4087.
- [6] A Aminian, M Solati-Hashjin, A Samadikuchaksaraei, F Bakhshi, A Farzadi, Bioactivity enhancement of hydroxyapatite by silicon substitution. *Modares J. Med. Sci.: Pathobiol.* 13 (2010) 11-21.
- [7] P Yin, F Feng, T Lei, X Zhong, X Jian, Osteoblastic cell response on biphasic fluor-hydroxyapatite/strontium-substituted hydroxyapatite (FHA/SrHA) coatings. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* (2013) Versión on-line.
- [8] K Cholewa-Kowalska, J Kokoszka, M Laczka, L Niedźwiedzki, W Madej, AM Osyczka, Gel-derived bioglass as a compound of hydroxyapatite composites. *Biomed. Mater.* 4 (2009) 055007.
- [9] K Balani, R Anderson, T Laha, M Andara, J Tercero, E Crumpler, A Agarwal, Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 28 (2007) 618-624.

[10] SH Oh, RR Finones, C Daraio, LH Chen, S Jin, Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials* 26 (2005) 4938-4943.

[11] QL Feng, FZ Cui, TN Kim, JW Kim, Ag-substituted hydroxyapatite coatings with both antimicrobial effects and biocompatibility. *J. Mater. Sci. Lett.* 18 (1999) 559-561.

[12] V Stanic, S Dimitrijevic, J Antic-Stankovic, M Mitric, B Jokic, IB Plecas, S Raicevic, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 6083-6089.

[13] D Lickorish, JAM Ramshaw, Ja Werkmeister, V Glattauer, CR Howlett, Collagen-hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 68A (2004) 19-27.

[14] J Redepenning, G Venkataraman, J Chen, N Stafford, Electrochemical preparation of chitosan/hydroxyapatite composite coatings on titanium substrates. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 66A (2003) 411-416.

[15] Y Gao, S Zou, X Liu, C Bao, J Hu, The effect of surface immobilized bisphosphonates on the fixation of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats. *Biomaterials* 30 (2009) 1790-1796.

[16] H Takadama, HM Kim, T Kokubo, T Nakamura, XPS study of the process of apatite formation on bioactive Ti-6Al-4Al alloy in simulated body fluid. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2 (2001) 389-396.

[17] B Li, X Liu, C Cao, C Ding, Biocompatibility and antibacterial activity of plasma sprayed titania coating grafting collagen and gentamicin. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 83 (2007) 923-930.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- [18] J Hauser, M Koeller, S Bensch, H Halfmann, P Awakowicz, HU Steinau, S Esenwein, Plasma mediated collagen-I-coating of metal implant materials to improve biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 94 (2010) 19-26.
- [19] H Melero, M Torrell, J Fernández, JR Gomes, JM Guilemany, Tribological characterization of biocompatible HAp-TiO₂ coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray. *Wear* 305 (2013) 8-13.
- [20] H Melero, J Fernández, S Dosta, JM Guilemany, Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad. *Bol. Soc. Esp. Ceram.* V. 50 (2011) 59-64.
- [21] M Gaona, Recubrimientos biocompatibles obtenidos por Proyección Térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona, España (2007).
- [22] EM Rivera-Muñoz, Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. En: Prof. Reza Fazel, editor. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. In Tech (2011).
- [23] D Chen, EH Jordan, M Gell, M Wei, Apatite formation on alkaline-treated dense TiO₂ coatings deposited using the solution precursor plasma spray process. *Acta Biomater.* 4 (2008) 553-559.
- [24] X Zhao, X Liu, C Ding, PK Chu, In vitro bioactivity of plasma-sprayed TiO₂ coating after sodium hydroxide treatment. *Surf. Coat. Technol.* 200 (2006) 5487-5492.
- [25] N Ohashi, M Nakamura, A Nagai, Y Tanaka, Y Sekijima, K Yamashita, Comparison of hydroxyapatite with carbonate apatite in osteoclastic cell resorptive activity. *Key Eng. Mater.* 361-363 (2008) 1039-1042.

- [26] A Porter, N Patel, R Brooks, S Best, N Rushton, W Bonfield, Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16 (2005) 899-907.
- [27] M Cerrutti, C Mortera, Carbonate formation on bioactive glasses. *Langmuir* 20 (2004) 6382-6388.
- [28] RP Heaney, Role of dietary sodium in osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 25 (2006) 271-276.
- [29] TJ Webster, C Ergun, RH Doremus, RW Siegel, R Bizios, Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 51 (2000) 475-483.
- [30] T Raimondo, S Puckett, TJ Webster, Greater osteoblast and endothelial cell adhesion on nanostructured polyethylene and titanium. *Int. J. Nanomed.* 5 (2010) 647-652.
- [31] M Wei, HM Kim, T Kokubo, JH Evans, Optimising the bioactivity of alkaline-treated titanium alloy. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* 20 (2002) 125-134.
- [32] C Luo, L Li, J Li, G Yang, S Ding, W Zhi, J Weng, S Zhou, Modulating cellular behaviors through surface nanoroughness. *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 15654-15664.
- [33] I Perelshtein, G Applerot, N Perkas, E Wehrschetz-Sigl, A Hasmann, GM Guebitz, A Gedanken, Antibacterial properties of an In Situ generated and simultaneously deposited nanocrystalline ZnO on Fabrics, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1 (2009) 361-366.
- [34] JT Seil, TJ Webster, Antibacterial zinc oxide nanoparticles in polymer biomaterial composites. *MRS Proceedings*, 1316 (2011).

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- [35] T Xu, CS Xie, Tetrapod-like nano-particle ZnO/acrylic resin composite and its multi-function property. *Prog. Org. Coat.* 46 (2003) 297-301.
- [36] M Teller, U Gopp, HG Neumann, KD Kuhn, Release of gentamicin from bone regenerative materials: an in vitro study. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 81 (2007) 23-29.
- [37] A Bignon, F Laurent, J Goldnadel, J Chevalier, G Fantozzi, E Viguiet, T Roger, G Boivin, D Hartmann, ATLANTIK Genta, a new concept of gentamicin loaded HAp/TCP bone substitute for prophylactic action – In Vitro releasing mechanisms study. *Key Eng. Mater.* 361-363 (2008) 1203-1206.
- [38] S Radin, JT Campbell, P Ducheyne, JM Cuckler, Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin, *Biomaterials* 18 (1997) 777-782.
- [39] PC Maness, S Smolinski, DM Blake, Z Huang, EJ Wolfrum, WA Jacoby, Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4094-4098.
- [40] Y Kikuchi, K Sunada, T Iyoda, K Hashimoto, A Fujishima, Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 106 (1997) 51-56.

Capítulo XII.

Conclusiones y perspectivas futuras

Las conclusiones más importantes son las siguientes:

- Se han obtenido recubrimientos de HAp-TiO₂ mediante la tecnología de proyección térmica de alta velocidad, HVOF. Estos recubrimientos se han comparado con otros, idénticos en composición, obtenidos por la tecnología de proyección plasma, ya que es la tecnología que se utiliza en la industria.
- A pesar de que los polvos utilizados no han pasado el ensayo de fluidez, de acuerdo a la norma ASTM, la estructura de los polvos y el hecho que, durante la proyección, éstos sean arrastrados mediante un gas propulsor han permitido la proyección conjunta de ambos sin ningún problema.
- Los recubrimientos de HAp-TiO₂ proyectados por plasma representan una mejora importante de propiedades finales (adherencia) y una disminución de la degradación térmica (menor cantidad de fases amorfas) respecto a los recubrimientos de 100%HAp obtenidos por plasma.

- La pérdida de propiedades mecánicas de los recubrimientos obtenidos por plasma se debe a la rápida disolución de la fase amorfa derivada de la HAp, la cual se localiza preferentemente en la interfase de unión sustrato-recubrimiento, como ha quedado de manifiesto tras el ataque ácido realizado para revelar dicha estructura amorfa.

- Se han podido definir las condiciones de proyección para la tecnología de proyección de alta velocidad, acotándolas a cuatro, entre las cuales se detectará el óptimo.

- El uso de la tecnología de HVOF ha permitido obtener recubrimientos con menor degradación de fases, desapareciendo por completo las fases nocivas (CaO) y disminuyendo de manera significativa el porcentaje de fase amorfa, medido mediante el procedimiento de Rietveld.

- Se ha podido observar que, desde el punto de vista estructural, todos los recubrimientos obtenidos por proyección de HVOF presentan una estructura más compacta con menor porosidad, así como una menor rugosidad superficial que los obtenidos por plasma. Estas características se atribuyen a la mayor velocidad alcanzada por las partículas en el haz de proyección, lo cual facilita la acomodación de la partícula proyectada ya que ésta está parcialmente fundida, siendo la parte fundida la responsable de dicha acomodación.

- La adición de TiO₂ ha mejorado la tenacidad a fractura del recubrimiento, al tiempo que su adherencia pre- y post-inmersión en fluidos fisiológicos.

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

- El aumento de la concentración de TiO₂ en la mezcla del polvo a proyectar, pasando de un 20% en peso a un 40% en peso, no ha puesto de manifiesto una mejora adicional de la tenacidad del recubrimiento ni en los valores de adherencia.
- La cantidad de TiO₂ tiene influencia en los resultados del ensayo de rayado, ya que un 20% en la mezcla inicial resulta ser una solución óptima entre la adición de una segunda fase que dificulte la propagación de grieta por aumento del número de interfaces HAp-TiO₂ y el hecho que la segunda fase sea frágil, permitiendo la propagación de grieta en el interior de las partículas de TiO₂.
- De los ensayos realizados, el que permite obtener menor cantidad de fases amorfas y mayor compactación de partículas es el que, a su vez, presenta mejores valores de adherencia, tenacidad a fractura y resistencia a rayado.
- Los ensayos de desgaste muestran que éste tiene lugar mediante un mecanismo combinado de desgaste, potenciado por la presencia de grietas, y abrasión, el cual se intensifica a cargas elevadas.
- También, en este caso, los resultados que han permitido obtener un menor volumen de material perdido y un mayor coeficiente de fricción (los preferibles) se dan para los recubrimientos más compactos y con menor presencia de fases amorfas.

- El conjunto de ensayos mecánicos permite concluir que la combinación 80%HAp-20%TiO₂ es la mejor opción, una vez comparados los óptimos con los óptimos obtenidos para recubrimientos 100% HAp o 60%HAp-40%TiO₂.
- Los ensayos de corrosión se han realizado sobre los recubrimientos obtenidos que corresponden a las condiciones óptimas (desde el punto de vista mecánico) de proyección y se han comparado con recubrimientos de HAp (100%) y con el sustrato de Ti-Al-V sin recubrir. La adición de TiO₂ ha contribuido a mejorar la estabilidad del recubrimiento en condiciones fisiológicas, permitiendo el aumento del tiempo tras el cual la muestra pasa a comportarse como el sustrato sin recubrir, aumentando dicho tiempo 4 veces, de acuerdo con los valores de impedancia. Es notorio el efecto acelerador de la corrosión del BSA en todos los casos. El recubrimiento 80-20 aparece, de nuevo, como la mejor alternativa para aplicaciones biomédicas.
- Los ensayos in vitro para los cuatro casos estudiados permiten identificar que, aunque todos los casos presentan comportamientos celulares aceptables, es el caso con mayor cantidad de fase amorfa y mayor superficie específica el que presenta mejor adhesión, proliferación y diferenciación celular; y el caso con menor cantidad de fase amorfa y menor superficie específica el que presenta peores propiedades. Esto está relacionado con la influencia positiva de una mayor superficie en la que las células puedan enlazarse y de una mayor disolución del recubrimiento (y por tanto mayor cantidad de calcio en solución que puede reprecipitar y ayudar en el proceso de generación de nuevo hueso). Otros ensayos de inmersión, a pesar de

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

constatar diferentes cinéticas de disolución para cada caso que pueden tener influencia en el comportamiento celular, no han podido aclarar la relación exacta de los procesos de redisolución y reprecipitación del calcio y el fósforo con el tiempo.

- Se ha podido concluir por tanto, en esta tesis, que hay dos efectos antagónicos:

a) Para conseguir unas mejores propiedades mecánicas hay que minimizar la presencia de fases amorfas.

b) Para conseguir una mayor bioactividad es preferible la presencia de fases amorfas (derivadas en este caso de la HAp, que es la que dará iones calcio y fósforo en solución).

- Los ensayos de funcionalización del recubrimiento de HAp-TiO₂ mediante tratamiento alcalino de la superficie han permitido mejorar el comportamiento celular, principalmente por la estructura nanométrica del precipitado en superficie.

- Se ha conseguido una mejora muy notable del comportamiento celular en superficie, tanto en viabilidad como en diferenciación celular, enlazando colágeno en la superficie del recubrimiento.

- La adición de ZnO, con objetivo bactericida, no ha tenido resultados positivos debido, fundamentalmente, a la baja concentración de iones en solución, menor a la inhibitoria; mientras que la incorporación de gentamicina al recubrimiento sí que ha tenido

un efecto importante en la disminución de bacterias en solución, tanto Gram-positiva como Gram-negativa.

- El recubrimiento recién proyectado también presenta un cierto poder bactericida que se atribuye a la presencia de enlaces –OH en superficie.

Las perspectivas futuras inmediatas de esta tesis incluyen citar algunos ensayos que sería interesante poder hacer en un futuro de cara a profundizar más en el tema. Sería interesante evaluar las propiedades de scratch test y tenacidad a fractura tras tiempos de inmersión en solución fisiológica, para estudiar su evolución. Asimismo, también sería interesante realizar algunos ensayos de cizalla para añadir el estudio de esta propiedad a la lista. Sería importante asimismo encontrar un método de cálculo de tensiones residuales que fuera idóneo para los recubrimientos estudiados y permitiera su relación con los valores de tenacidad a fractura. Finalmente, sería importante, de cara a validar los dos tratamientos propuestos al final de la tesis, estudiar la variación de las propiedades mecánicas inducidas por ellos. Y por supuesto, también sería necesario hacer un estudio profundo de las cinéticas de disolución de la gentamicina, para verificar cuánto tiempo sigue actuando como bactericida y que en ningún momento la cantidad liberada supone una dosis tóxica para el organismo.

En cuanto a las perspectivas futuras a largo plazo, consistirían en desarrollar nuevas líneas de investigación basadas en el trabajo realizado en esta tesis. Entre ellas figuraría el estudio de otras vías de funcionalización con colágeno tipo I (ya que ha dado excelentes resultados) para que éste se encuentre en

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

todo el recubrimiento y no sólo en las capas superficiales; o la funcionalización con otros compuestos como factores de crecimiento.

Anexos

En estos anexos se han incluido todos los artículos relacionados con el contenido de esta tesis, desde un estado del arte de la problemática estudiada (Anexo 1) hasta los resultados de la mejora de la funcionalidad de los recubrimientos estudiados (Anexos 6 y 7), pasando por el estudio de las propiedades mecánicas de éstos (Anexos 2 y 3), sus propiedades electroquímicas (Anexo 4) o biológicas (Anexo 5). La situación exacta de los artículos en el curso de la tesis se ha indicado previamente en los respectivos capítulos.

Anexo 1

Review publicado en la revista Biomecánica, con el título “Recubrimientos bioactivos: hidroxiapatita y titania”.

Recubrimientos bioactivos: Hidroxiapatita y titanita

H. MELERO, J. FERNÁNDEZ, J.M. GUILMANY
Centro de Proyección Térmica (CPT)
Facultad de Química. Universidad de Barcelona

Introducción

Debido al envejecimiento de la población, como consecuencia del desarrollo de las sociedades occidentales, cada vez son más necesarios dispositivos que permitan que los años de madurez y vejez se vivan de la mejor manera posible. Un ejemplo de estos dispositivos son los empleados en el reemplazo de hueso. Con la edad, el tejido óseo deja de renovarse y las fracturas se multiplican, por lo que son necesarios materiales capaces de cumplir con los requerimientos mecánicos y biológicos a que normalmente es sometido el hueso, sea cual sea su emplazamiento (desde huesos del oído o de la estructura dental a prótesis de hombro o de cadera).

Actualmente, el reemplazo protético más común es el de rodilla, seguido del de cadera y el de hombro. Ya que todas ellas son zonas sometidas a grandes cargas, el primer requerimiento que históricamente se le pidió a una prótesis fue el de la resistencia. Por ello, estas prótesis suelen ser de materiales con unas buenas propiedades mecánicas (en general, metales como aceros inoxidables, aleaciones de cobalto, titanio y aleaciones, etc., que tienen tanto buenas propiedades a tracción-compresión como de tenacidad y ductilidad). Es decir, mientras la prótesis fuera resistente, bastaba con que biológicamente, fuera bioinerte (que no liberara sustancias tóxicas, ni tuviera ningún tipo de interacción con el tejido, creando una cápsula fibrosa alrededor de él). Con el tiempo y la evolución en el campo biotecnológico, se comenzó a buscar que la prótesis tuviera también un valor añadido; es decir, que fuera biocompatible, permitiendo el desarrollo del tejido óseo en contacto con la prótesis, o que, aún más, fuera bioactiva (que indujera la migración y diferenciación de células en células óseas y con ello, que promoviera y es-

timulara la creación de nuevo tejido óseo). Para ello, se estudiaron materiales que pudieran tener esta facultad. Como en su mayoría éstos son cerámicos, sin las propiedades mecánicas de las aleaciones metálicas, lo que se consideró fue, salvo en los casos en los que no fueran necesarias tales propiedades mecánicas (huesos del oído medio, relleno de pequeñas cavidades), usarlos para recubrir las prótesis metálicas y mejorar así su osteointegración.

Recubrimientos de hidroxiapatita

Recubrimientos de hidroxiapatita

Los fosfatos de calcio constituyen la fase mineral más importante de los tejidos duros de los vertebrados, y desde principios del siglo XX, diferentes estudios han demostrado la similitud entre el mineral óseo y los minerales de fosfatos de calcio con una estructura apatítica. Esto hace que hoy día, estos fosfatos de calcio de origen natural o sintético sean una de las vías más utilizadas en cirugía ósea o dental cuando es necesario un aporte de material (Britel [1]).

Existen, según su fisicoquímica, tres familias de fosfatos de calcio (metafosfatos, pirofosfatos y ortofosfatos), y dentro de esta última familia, diferentes subfamilias según su relación Ca/P (TTCP –fosfato tetracálcico-, HAp –hidroxiapatita-, TCP –fosfatos tricálcicos-, OCP –fosfato octacálcico-, etc), pero de todos ellos, el material utilizado en recubrimientos de prótesis, por excelencia, es la hidroxiapatita.

Las apatitas constituyen una familia de compuestos iónicos descrita por la fórmula química $M_{10}(RO_4)_6 X_2$ (donde $M=Ca^{2+}$, Pb^{2+} , Na^+ , etc.; $X=OH^-$, F^- , Cl^- , etc.; $RO_4=PO_4^{3-}$, AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , etc.). La X será la que le dé el nombre a la apatita. En los tejidos duros, la apatita presente es una hidroxiapatita; es decir, una apatita donde la X es un OH^- . Así, la fórmula de la hidroxiapatita (de calcio) estequiométrica, de estructura cristalina hexagonal, sería $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

La hidroxiapatita cálcica se empezó a utilizar clínicamente en los ochenta para mejorar la os-

Correspondencia:

Hortensia Melero
Centro de Proyección Térmica (CPT)
Universidad de Barcelona, Facultad de Química
C/ Martí i Franqués 1. CP 08028, Barcelona
e-mail: hmelero@cptub.org

teointegración de los implantes, tal y como indica Gallo [2], y desde entonces, han sido extremadamente numerosos los estudios realizados sobre el tema.

Como hoy día se conocen los pros y los contras del uso de estos recubrimientos, es menos común encontrar artículos que estudien recubrimientos puros. Uno de los pocos ejemplos es el de Park et al. [3], que propone el uso de recubrimientos de HAp obtenidos por aerosol - con una salida a gran velocidad - sobre sustratos de Ti, seguidos o no de un tratamiento térmico a 400°C durante 1h, con resultados celulares in vitro que muestran una diferenciación celular inducida respecto al control de Ti, y resultados in vivo que promueven la formación de nuevo hueso.

En muchos casos, se está trabajando sobre recubrimientos biomiméticos, más próximos a la estructura apatítica fisiológica y, por tanto, con mejores resultados a nivel biológico. Se suele combinar el procedimiento biomimético (siempre el mismo, introducir el sustrato en una solución supersaturada de iones fosfato y calcio por tiempos varios, a una temperatura de 37°C) con algún tipo de tratamiento. Xie y Luan [4] crearon un nuevo método electroquímico de activación de la superficie, consistente en la inmersión de un sustrato de Ti6Al4V en una solución de NaOH a 10M durante 30min, aplicándole un voltaje de 10V, seguido de la inmersión en la solución citada, de concentración 5 veces la del plasma sanguíneo, en períodos de 30 minutos, hasta la deposición de alrededor de 1,5 µm de espesor de capa, obteniendo capas uniformes de HAp con estructura similar a la del hueso; Yang et al. [5], en cambio, aplican un tratamiento alcalino (48h a 60°C en una solución de NaOH a 0,1M) y térmico a diferentes tiempos y temperaturas posteriormente a la obtención de la capa de apatita. Utilizan una electrodeposición biomimética, en la que se emplea una solución supersaturada iones calcio y fosfato como electrolito, el sustrato como cátodo y platino como ánodo, durante 60min, hasta obtener un espesor de capa de unos 20 µm, obteniendo así capas de apatita con mayor cristalinidad y adherencia al sustrato (hasta 15,6 MPa) que las referencias sin los tratamientos posteriores. Otros recurren a tratamientos térmicos varios. Forsgren et al. [6] realizan un tratamiento térmico previo (1h a 800°C), a un sustrato de titanio, para transformarlo a rutilo y aumentar así la adhesión de la siguiente capa de HAp, obtenida por inmersión del sustrato en una solución de PBS (“Phosphate-buffered saline” o solución tampón fosfatada) durante 7 días hasta

un espesor de algunos micrómetros, dando lugar a una capa continua de HAp de relativamente alta adherencia al sustrato pero poca al delaminado debido a la alta porosidad (2,4GPa por ‘scratch test’). Otra opción es recurrir a una primera capa de material orgánico funcionalizado. Ohtsuki et al. [7] detallan los intentos más importantes que diferentes grupos han realizado al respecto, como promover la formación de grupos silanol (Si-OH) en el caso de sustratos de vidrios, de grupos Ti-OH, en el caso de sustratos de titanio, siendo mejor si la superficie ha oxidado a anatasa, así como de Ta-OH o Nb-OH en los respectivos casos, o grupos carboxilo o sulfónico en el caso de los polímeros; mientras que Takeuchi y colaboradores [8], del mismo grupo, comprueban que la adición de determinadas proteínas de la seda con estructura β a una solución de SBF (“simulated body fluid”, fluido fisiológico simulado) acelera la formación de un recubrimiento de HAp sobre un polipéptido. También se pueden realizar depósitos sobre sustratos cerámicos utilizados tradicionalmente en determinadas prótesis, como alúmina y circonita. Pribosic et al. [9] introducen estas superficies en una solución supersaturada de Ca/P durante 27 horas, hasta obtener más de 2 µm de espesor de capa, sometiéndolas después a un tratamiento térmico de 1h a 1050°C, lo cual mejora la adherencia al sustrato sin afectar a la bioactividad (como se demuestra al sumergirlas en SBF).

Otra tendencia es trabajar en modificaciones de la HAp. Wood [10] asegura que una superficie con rugosidad nanométrica permite mejor la adhesión de los elementos del medio celular, y por ende de las células; de ahí que pueda favorecer la creación de nuevo tejido. Si esto se aplica a los recubrimientos de hidroxiapatita, la combinación del cerámico bioactivo con la topografía nanométrica es más que prometedora.

Por ello, existen numerosos artículos sobre hidroxiapatita nanoestructurada. Bigi et al. [11], [12] realizaron recubrimientos por vías biomiméticas sobre sustratos de Ti13Nb13Zr y Ti13Nb11Zr, obteniendo capas de 1-2 µm de HAp nanoestructurada tras 3h de inmersión en una solución supersaturada de iones calcio y fósforo, que permiten la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos, y una mayor osteointegración respecto al trabajo de Xiong y colaboradores [13], quienes utilizaron procesos hidrotermales con tratamientos térmicos finales a diferentes temperaturas, obteniendo capas de nanopartículas de HAp de espesores de entre 50 y 200 nm. Li et al. [14] emplearon “electron-beam evaporation” para deposi-

tar capas de HAp nanoestructurada de unos 500 nm de espesor sobre superficies de Ti anodizado, lo cual dio lugar a una fácil formación de apatita al sumergirlas en PBS a 37°C, y a un aumento de la osteointegración in vivo.

En otros estudios, en cambio, se combinan las propiedades osteogénicas de la hidroxiapatita con las de otros compuestos. Una de las vías para ello es la incorporación de iones -como sustituciones- en la estructura de la apatita. Guo et al. [15] depositan una capa de carbonato de calcio sobre un sustrato de Ti6Al4V por electroforesis, que luego se convierte en una apatita hidroxycarbonatada por inmersión en PBS durante lapsos de 1 a 12 días. El resultado de este procedimiento es la obtención de una capa de hidroxiapatita carbonatada con mesoporos, que van desapareciendo con los días de inmersión una vez la conversión es ya completa; así como una gran capacidad de formación de capa de apatita en ensayos de inmersión en SBF.

También se ha multiplicado, en los últimos años, el interés en la comunidad médica por el estroncio. P.J. Marie [16] y P. Ammann [17] aclaran cómo estudios clínicos y farmacológicos concluyen que el ranelato de estroncio estimula la formación de nuevo tejido óseo e inhibe la reabsorción ósea. Así, se han realizado recubrimientos de hidroxiapatita incorporando este elemento en su estructura. Un ejemplo son los obtenidos por Xue et al. [18], que los realizaron con un 10% molar de iones Sr (sustituyendo iones Ca) por proyección plasma atmosférico sobre sustratos de Ti6Al4V. Los resultados de adherencia son moderados, de 23,5 MPa, y la consistencia de la interfaz recubrimiento-sustrato es buena. Los resultados de inmersión en SBF muestran que la presencia de este elemento resulta favorable para la formación de una capa de apatita sobre la superficie en tiempos cortos (de 1 a 3 días), y también la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos en la superficie se mejora respecto a recubrimientos sólo de HAp. Capuccini et al. [19], en cambio, realizan recubrimientos similares (en este caso con porcentajes de sustitución por iones calcio de entre el 0 y el 7% en producto sólido) por deposición pulsada por láser (PLD) sobre sustratos de Ti, obteniendo resultados muy favorables a nivel celular. A mayores porcentajes de estroncio en el recubrimiento, la actividad de los osteoblastos se estimula y la de los osteoclastos se reduce. Todo ello se suma a las buenas propiedades mecánicas que estudios previos como los de Chen y Fu [20] han encontrado en la HAp dopada con estroncio -respecto a la no dopada.

Otro elemento interesante es el silicio, componente fundamental de los vidrios bioactivos, que tiene una importancia en la formación de tejido óseo que se ha demostrado ampliamente. Carlisle [21] ya observó que el silicio es un elemento presente en los sitios activos de calcificación en el hueso joven y que, por tanto, está ligado a este proceso. Asimismo, otros estudios como el de Li, Ohtsuki, Kokubo et al. [22] demuestran que se favorece la formación de una capa de apatita por inmersión en SBF sobre la superficie de un gel de sílica. Por ello, son varios los grupos que han intentado introducirla en la estructura de la HAp. Thian et al. [23] han producido recubrimientos de HAp sustituida con iones silicio al 0,8; 2,2 y 4,9% en peso sobre sustratos de Ti por “magnetron sputtering”. La actividad de los osteoblastos sobre las superficies de estos recubrimientos resultó ser superior a la actividad sobre la referencia de HAp. También Xiao et al. [24] han empleado este compuesto en recubrimientos de HAp realizados por proyección plasma al vacío con contenidos de silicio del 0,83% y 1,26% en peso. Los resultados de adherencia son moderados, 25,6 MPa, y la interacción de la superficie del recubrimiento con suero humano (HSA, human serum albumin) es mayor que en el caso de recubrimientos sólo de HAp. El mismo grupo realizó también estos recubrimientos por deposición electroforética [25], en este caso con 0,43; 0,81 y 1,22% molar de contenido de Si en sustitución, sometiendo en algunos casos a los recubrimientos a tratamientos térmicos a 800°C. Aun así, los resultados de adherencia fueron menores que en el caso de proyección plasma, llegando a 16,7MPa en los mejores casos. De todas maneras, la interacción del recubrimiento con suero bobino (BSA, Bovina serum albumin) fue mejor que en el caso de recubrimientos sólo de HAp.

Recubrimientos de hidroxiapatita con un compuesto inorgánico

Otra opción es combinar la HAp con algún compuesto inorgánico. Stojanovic et al. [26] realizan recubrimientos graduales de biovidrio (sistema SiO₂-Na₂O-K₂O-CaO-MgO-P₂O₅) como matriz y nanopartículas de HAp por electroforesis (a diferentes voltajes y tiempos de deposición) sobre sustratos de Ti6Al4V, lo cual permite una fácil variación de los porcentajes de fases en los recubrimientos obtenidos, y un control de la estructura y la composición de los mismos. También Bharati et al. [27] han estudiado recubrimientos, obtenidos por esmaltado sobre sustratos de Ti6Al4V, con

biovidrio (sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-TiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3$) y de un 10 a un 25% en peso de polvo de HAp (micro- o nanométrico) en la mezcla de partida. Los resultados de adherencias obtenidos por scratch test demuestran que los resultados con polvo de HAp, sobre todo al 10% en masa para el polvo micrométrico y al 15% en masa para el nanométrico, son mejores que en recubrimientos sólo con biovidrio, además de observar que la esterilización y influye positivamente en las propiedades mecánicas de estos recubrimientos. Asimismo, Xie et al. [28] estudian recubrimientos de mezclas de un vidrio bioactivo con nanohidroxiapatita en diferentes proporciones, obtenidos por proyección plasma sobre sustratos de Ti6Al4V. Los resultados de ensayos in vivo muestran que el contacto hueso-implante y la formación de nuevo hueso es mucho mayor en el caso de implantes recubiertos con estos recubrimientos respecto a implantes no recubiertos, o recubiertos únicamente con HAp, acentuándose la diferencia con el paso de las semanas.

Otros grupos como el de Morks [29] se han centrado en el estudio de la sílica, proyectando mezclas de sílica (al 10 y 20%) e hidroxiapatita mediante proyección plasma atmosférica de tipo túnel. Esta técnica es una variante de la proyección plasma convencional consistente en un diseño que permite que el plasma se mueva en forma de túnel, de manera que se aumente la eficiencia del recubrimiento. Observaron que la adición de sílica repercutía favorablemente en las propiedades mecánicas del recubrimiento, aumentando la dureza, la resistencia al desgaste -debido a las propiedades autolubrificantes de las partículas de sílica-, la densidad y la adherencia del recubrimiento -de 0,6 a 1 MPa en un ensayo de "peel-off". El mismo grupo estudió también mezclas de un 75% de HAp con un 15% de sílica y un 10% de polvo de titanio en peso [30], proyectadas mediante la misma técnica. Posteriormente, se realizaron tratamientos térmicos a 400, 600 y 650°C en atmósfera de aire. Observaron la influencia del aumento de la intensidad del haz de plasma en la resistencia al desgaste abrasivo y en la dureza, encontrando que al aumentar la densidad del recubrimiento, mejoraban ambas propiedades.

Otros compuestos que también se estudian son los de carbono. Ya en el año 1977 Jenkins y De Carvalho [31] repararon en la excelente biocompatibilidad que presentaba este elemento. Posteriormente, Christel et al. [32] observaron que estos compuestos presentaban unas propiedades mecánicas más cercanas a las del hueso que las

de otros materiales. En concreto, uno de los compuestos estudiados son los nanotubos de carbono (CNT): existe cierta controversia, tal y como explican Chen et al. [33], en el uso de estos nanotubos por su posible toxicidad, pero a pesar de ello, según sus defensores, estos recubrimientos aunarían la bioactividad intrínseca de la HAp con la de los CNT, que provendría tanto de su naturaleza como de su estructura nanométrica. Balani et al. [34] han proyectado por plasma atmosférica mezclas de HAp y CNT (4% en peso) sobre sustratos de Ti6Al4V, con resultados positivos. Las mejoras en las propiedades mecánicas se traducen en una mejora del 56% en la tenacidad de fractura y del 80,4% en la cristalinidad; asimismo, el comportamiento biológico es bueno, observando que la presencia de CNT parece favorecer la precipitación de apatita en la superficie del recubrimiento. Por otra parte, las sospechas de toxicidad quedan descartadas por los resultados obtenidos en ensayos celulares, donde se ha visto que el crecimiento y proliferación de osteoblastos se ve promovida. El mismo grupo [35] realizó también más estudios con idénticos recubrimientos, que se centraron en las propiedades tribológicas de los recubrimientos en condiciones fisiológicas. Los resultados del ensayo de pin-on-disk en medio SBF mostraban una mejor resistencia al desgaste de los recubrimientos de HAp y de HAp-CNT respecto al sustrato; y, asimismo, la pérdida de masa y volumen era inferior en el caso de los recubrimientos HAp-CNT respecto a los otros dos.

Kaya [36] realizó recubrimientos similares (HAp con un 0,5; 1 y 2% en peso de CNT) por electroforesis sobre sustratos de acero inoxidable, obteniendo mejoras evidentes en las propiedades mecánicas respecto a los recubrimientos sólo de HAp, tanto en dureza, módulo elástico, tenacidad como en resistencia a la cizalla interlamina. Además, recalcó la conveniencia de realizar tratamientos térmicos, proponiendo uno de 600°C durante 2h para mejorar la resistencia del recubrimiento a la delaminación.

Otro tipo de recubrimientos que también son interesantes son los compuestos HAp-Ag. Desde hace muchos años se conoce la acción anti-microbiana y anti-bacteriana de la plata, que se ha visto reflejada en estudios como el de Hollinger [37]. Estos compuestos permitirían combinar la bioactividad de la hidroxiapatita con esta acción contra-infección. Chen et al. [38] utilizan el método sol-gel para realizar recubrimientos de HAp con un 1 y un 1,5% en peso de nitrato de plata sobre sustratos de Ti puro. Los resultados muestran que

en los recubrimientos con plata, la adhesión de las bacterias *S.epidermidis* y *S.aureus* es mucho menor que en recubrimientos de HAp, mientras que los resultados de ensayos de diferenciación celular con osteoblastos muestran que no existen demasiadas diferencias entre el recubrimiento de HAp y el que contiene un 1% de nitrato de plata, siendo ambos osteoconductivos. Así, los recubrimientos mixtos aunarían ambas propiedades. Noda et al. [39], en cambio, realizan recubrimientos de HAp con un 3% en peso de óxido de plata mediante proyección térmica atmosférica por llama sobre sustratos de Ti puro. Los resultados muestran una elevada acción antibacteriana (la bacteria empleada fue un tipo de *S.aureus*, el MRSA B++); así como una presumible osteoconductividad debido a la capacidad que mostraron estos recubrimientos para formar una capa de apatita sumergidos en SBF; y una importante liberación de iones plata tras 24h de implantación.

Recubrimientos de hidroxiapatita con compuestos orgánicos

Tal y como citan Teng et al. [40], en los últimos años se ha considerado la posibilidad de combinar HAp con algún tipo de polímero bioabsorbible. En concreto, proponen que este polímero sea el colágeno, ya que el colágeno tipo I es la molécula estructural más importante de los tejidos duros. Kim et al. [41], por ejemplo, recalcan su papel esencial en la respuesta celular, y Rammelt et al. [42] realizan estudios sobre su influencia en la remodelación ósea. Por ello, Teng realiza capas nanocompuestas de colágeno y unas proporciones de 10, 20 ó 30% de HAp en peso por formación del sol en condiciones biomiméticas y aplicación sobre sustratos de Ti por "spin-coating". Al aumentar el porcentaje de HAp, el ángulo de contacto es menor (la hidrofobicidad mayor) y la proliferación y diferenciación de los osteoblastos mayor. Manara et al. [43] estudian recubrimientos similares obtenidos mediante deposición electroquímica a diferentes tiempos (de 5s a 30min), obteniendo estructuras interesantes como la de nanocristales apatíticos rodeando fibras de colágeno, todas ellas con elevada afinidad con la fibronectina. También grupos como el de Daugaard et al. [44] han comparado recubrimientos obtenidos por deposición electroquímica en condiciones fisiológicas de una capa interna de HAp con una capa externa de fibras de colágeno frente a recubrimientos sólo de HAp obtenidos por electrodeposición y por proyección térmica plasma sobre sustratos de Ti6Al4V en forma de cilindro, que se han inser-

tado en un húmero de perro. Tras cuatro semanas de observación, se ve que la presencia de HAp ha resultado en una mejora de la fijación mecánica. Los mejores resultados de la resistencia a la cizalla y del crecimiento de hueso se dan con los dos recubrimientos de HAp; sin embargo, no se dan mejores resultados con los recubrimientos con colágeno, contrariamente a estudios anteriores como el citado de Rammelt u otros del mismo autor [45], donde se detalla también el aumento del proceso de remodelación ósea en las zonas de un implante recubiertas de colágeno. Como se ha constatado, las débiles propiedades mecánicas de estos recubrimientos hace necesario realizar mayor número de estudios, como el de Kikuchi et al. [46], centrados en mejorar las propiedades mecánicas de nanocompuestos de HAp y colágeno mediante su reticulación con glutaraldehído.

Otros grupos que han intentado idear recubrimientos compuestos que pudieran optimizar su función, como el de Sun et al. [47], proponen la deposición por electroforesis de recubrimientos graduales sobre sustratos de grafito. En concreto, la de capas de quitosano intercaladas con capas de una matriz de quitosano con nanopartículas de HAp, en un porcentaje al peso que va del 40 al 80%, con la posibilidad de añadir una capa suplementaria de quitosano-heparina. Los resultados dan fe de la eficiencia en la deposición del recubrimiento, y de la posibilidad del control de los espesores del mismo. Estos recubrimientos podrían constituir una nueva vía de investigación, teniendo en cuenta otros estudios como el de Lin et al. [48], que recalcan la hemocompatibilidad del complejo quitosano-heparina.

Otra propuesta es la de Negroiu et al. [49], que estudian recubrimientos de un compuesto de HAp y un copolímero maleato de sodio sobre sustratos de Ti, mediante la técnica de evaporación láser (MAPLE, Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation). Los resultados in vitro demuestran que la viabilidad y proliferación celular se ve promovida en estos recubrimientos respecto a los de HAp o a los propios sustratos.

Se están estudiando también los bifosfonatos en combinación con la HAp. Fleisch y su grupo [50], [51] ya habían demostrado la capacidad de los bifosfonatos para inhibir la reabsorción ósea mediante su acción, no aclarada, sobre los osteoclastos. Oliveira et al. [52] realizan recubrimientos de apatita, obtenidos biomiméticamente por inmersión en una solución de SBF y de 1,5SBF durante 14 días, impregnados de un bifosfonato, el clodronato de sodio, mediante la adición

del bifosfonato a diferentes concentraciones sobre el recubrimiento, y tres horas después, un secado a 60°C. Los resultados muestran que la presencia de este bifosfonato a determinadas concentraciones -las dos menores- estimula la viabilidad celular respecto a la referencia. El efecto positivo de los bifosfonatos en la osteointegración de un implante se ve refrendado también por estudios como el de Jakobsen et al. [53], donde se constata que la inyección local de un bifosfonato, en el sitio de implantación de una prótesis de Ti6Al4V con un recubrimiento de HAp obtenido por proyección plasma, lleva a un aumento del volumen del hueso en la zona del peri-implante y de la resistencia a la cizalla, aunque no se observen grandes diferencias en la zona de contacto hueso-implante.

Mención aparte merecen las mezclas realizadas por Sanpo y Khor [54]. Este grupo propone el empleo de mezclas de un polvo nanométrico de HAp dopada con Ag y un polvo de PEEK, para proyectarlas mediante proyección fría sobre un sustrato de vidrio. Los resultados muestran una capacidad antibacteriana, mayor a mayor porcentaje de HAp-Ag en la mezcla, que no ha variado de antes a después de la proyección.

Recubrimientos de óxido de titanio

Recubrimientos de óxido de titanio

Tradicionalmente, el uso que se le ha dado al óxido de titanio es distinto al biomédico, explotándose principalmente sus propiedades fotocatalíticas (Linsebigler et al. [55]), mientras que sus propiedades biológicas han sido mucho menos analizadas. A priori, es un compuesto no bioactivo. Algunos estudios lo consideran bioinerte, mientras que otros defienden que permite la formación de hueso sobre su superficie sin formar una cápsula fibrosa (biocompatible), aunque no la favorezca (no osteoinductivo, y por ende no bioactivo). Todos estos estudios combinan el TiO₂ con otro compuesto, o le aplican algún tratamiento o condiciones especiales para aprovechar sus otras propiedades (mecánicas, anticorrosión...) en usos biomédicos.

Se puede decir que, de por sí, todas las prótesis de titanio tienen una capa de óxido de titanio sobre su superficie, ya que se forma de manera natural, y es ella la que interacciona con el medio, siendo bioinerte, tal y como afirman Breime [56] y Oxsenbein [57]. Los estudios de Jaworski et al. [58] han concluido que los recubrimientos de TiO₂ tienen unas buenas propiedades mecánicas. Asimismo, a raíz de los estudios de Lamaka et al. [59],

que proponen el uso de recubrimientos de TiO₂ sobre sustratos de Al por su elevada resistencia a la corrosión, Chiu et al. [60] realizaron recubrimientos de anatasa sobre sustratos de NiTi por sol-gel, seguido de dip-coating y de un tratamiento hidrotermal (105°C durante 24h), con excelente resistencia a la corrosión. Tomando como base estos resultados, Shi et al. [61] muestran cómo recubrimientos de TiO₂ depositados por dip-coating, en una solución precursora del TiO₂ a 50°C y con un tratamiento hidrotermal a 120°C, durante un período entre 7 y 24 horas, sobre sustratos de magnesio oxidados por oxidación mediante micro-arco (MAO, micro-arc oxidation), tienen una resistencia a la corrosión en medio biológico (solución Hank's) muy superior a la del sustrato sin TiO₂.

Pero desde el punto de vista biológico, es conveniente señalar que, de acuerdo con Uchida et al. [62], se sospecha que la nucleación de una capa de apatita sobre el óxido de titanio depende mucho de la orientación cristalográfica de los planos de la apatita y del óxido de titanio, y se favorecería más en la anatasa que en el rutilo. Algunos estudios, para mejorar el comportamiento biológico, recurren simplemente a tratamientos físicos o químicos de un recubrimiento ya realizado de óxido de titanio, en cualquiera de sus fases. Por ejemplo, se le puede realizar un tratamiento alcalino al recubrimiento de TiO₂, como proponen Chen et al. [63], que muestran la capacidad de formar una capa de apatita en su superficie tras inmersión en SBF durante 14 a 28 días, contrariamente a los recubrimientos no tratados. Li et al. [64] atribuyen este hecho a la multiplicación de los grupos funcionales Ti-OH sobre la superficie. Este aumento de la bioactividad con estos tratamientos se observa también en otros artículos, como el de Wei et al. [65]. Otra posibilidad es irradiar los recubrimientos de TiO₂ con luz ultravioleta. Esta luz tiene la capacidad de inducir la creación sobre la superficie de abundantes grupos Ti-OH, tal y como explican Henderson [66] o Liu et al. [67], lo cual favorece la formación de una capa apatítica. Asimismo, estudios histológicos realizados por los segundos muestran que tras 168h de irradiación UV, los recubrimientos permiten, no sólo la adhesión de hueso al recubrimiento, sino la formación de nuevo hueso tras 2 meses de implantación, contrariamente a los recubrimientos no irradiados.

Otros grupos intentan otras vías para aunar bioactividad y adhesión en estos recubrimientos. Brohede et al. [68] depositan un recubrimiento gradual por PVD sobre sustratos de Ti, variando el caudal de oxígeno, de manera que se obtenga ana-

tasa en la superficie y titanio en la interfaz de contacto con el sustrato, con variación gradual en la composición de uno a otro extremo. Se consigue un valor de adherencia de 1,69 GPa, muy superior al requerido según normas. Además, las pruebas de inmersión en SBF mostraron la formación de capa de apatita en superficie tras la primera semana.

Sin duda, el modo más prometedor de obtener una bioactividad con recubrimientos de TiO₂ es realizarlos de manera que tengan una estructura nanométrica. Recientemente se ha reconocido, a partir de los trabajos de Cavalcanti-Adam et al. [69] o Von der Mark et al. [70], la importancia de la organización nanométrica de las señales extracelulares de la matriz en la respuesta celular: Las distancias entre receptores celulares para un determinado péptido y la organización espacial de éstos están a escala celular, y esto ha hecho que la mayoría de aproximaciones actuales a recubrimientos de óxido de titanio sean a escala nanométrica. Ochbensein et al. [57] consiguen recubrimientos de óxido de titanio (rutilo/anatasa) nanoestructurados sobre sustratos de Ti, mediante la técnica sol-gel, con aplicación del sol por spin-coating seguido de un recocido a 450°C durante 1h. Los resultados de ensayos in vitro realizados con células constatan el buen comportamiento de las mismas sobre estos recubrimientos, su buena adhesión y proliferación. Advincula et al. [71] han estudiado la formación de recubrimientos de TiO₂ nanoestructurado por sol-gel sobre sustratos de Ti6Al4V, activando previamente la superficie mediante la inmersión durante 10 minutos en solución "piraña", que promueve la formación de radicales OH- en la superficie. Los resultados de adherencia son extraordinariamente elevados, 76 MPa; y se combinan con una buena resistencia a la corrosión y la pronta formación de una capa de apatita en superficie, con precipitación ya tras el primer día; así como con la capacidad de ejercer de barrera eficaz contra la liberación de iones metálicos del sustrato.

Sin embargo, la vía más prolífica, actualmente, en recubrimientos nanoestructurados de óxido de titanio es el empleo de nanotubos de TiO₂ obtenidos por oxidación anódica sobre sustratos de Ti, que se hacen crecer directamente sobre la superficie de titanio, de manera que se cree una unión directa -química- entre los nanotubos de óxido y el titanio, y de ahí que se obtengan buenas adherencias, tal y como aclaran Crawford et al. [72]. El mismo autor menciona [72,73,74] asimismo que la principal ventaja de estos nanotubos son sus propiedades mecánicas, de gran parecido con las

del hueso. Von Wilmski et al. [75] han obtenido recubrimientos como los citados para hacer estudios biológicos. Ensayos in vivo en cerdos a diversos tiempos entre 3 y 90 días tienen resultados que muestran, en primer lugar, pocas diferencias en la superficie de contacto hueso-recubrimiento y en la segregación de osteocalcina entre las muestras recubiertas con nanotubos y las de Ti. Si se observa, en cambio, mayor segregación de colágeno tipo I en las muestras con nanotubos, lo cual indica una promoción de la diferenciación celular. Ma et al. [76] realizan recubrimientos de nanotubos de TiO₂ sobre Ti, sometiéndolos después a un tratamiento térmico (2h a 500°C) de cristalización y a una pre-calcificación por inmersión en una solución de Na₂HPO₄ a 0,5M durante 24h y en una de Ca(OH)₂ saturada durante 5h. Los resultados muestran la presencia de una capa de apatita en superficie tras los primeros 7 días, contrariamente a los nanotubos sin precalcificar, los cuales presentan resultados mucho más pobres.

Recubrimientos de óxido de titanio con otros compuestos

Huang et al. [77] proponen el uso de recubrimientos de TiO₂ obtenidos mediante deposición atómica sobre nanofibras de Si depositadas sobre sustratos de Ti. Los resultados in vitro muestran una mejora de la proliferación celular respecto a las referencias, además de un aumento de la diferenciación celular y la mineralización.

Bienias et al. [78], Ochbensein [57], Aãritalo [79] y Areva et al. [80] estudian intercapas de SiO₂-TiO₂ sobre sustratos de Ti y Ti6Al4V, observando que la intercapa mixta produce una mejora de la adherencia del recubrimiento, que la proliferación celular (fibroblastos y osteoblastos) se ve favorecida por estos recubrimientos y que hay, también, una prolongada actividad osteoblástica que lleva a una formación rápida de matriz extracelular y, por tanto, de hueso. Los resultados de inmersión en SBF muestran una aparición de apatita en superficie, aunque lenta.

Wei et al. [81] realizan recubrimientos compuestos de óxido de titanio con CaTiO₃ sobre sustratos de Ti6Al4V por oxidación plasma electroquímica (PEO, plasma electrochemical oxidation), con post-tratamientos en medio alcalino (24h a 60°C en una solución a 5M) y a alta temperatura (1h a 800°C), que en los primeros siete días de inmersión en SBF permiten la precipitación en superficie de una capa de apatita.

Como en el caso de la HAp, otro compuesto que se añade, en ocasiones, a los recubrimientos

de óxido de titanio es la plata (ver Necula et al. [82]), por sus propiedades antimicrobianas y antibacterianas (ver lo dicho por Hollinger más arriba [37]), En este caso la Ag se encuentra en forma de nanopartículas infiltradas en la capa de óxido (anatasa/rutilo) obtenida por oxidación electrolítica por plasma. Los resultados muestran la eliminación total de bacterias como el *Staphylococcus aureus* durante las primeras 24 horas de implantación.

Yuan et al. [83] han hecho algún intento de realizar recubrimientos de óxido de titanio con butóxido de titanio sobre acero inoxidable vía sol-gel, obteniendo muy buena resistencia a la biocorrosión y capacidad de formar una capa apatítica en su superficie.

Recubrimientos de HA/TiO₂

En capas separadas

Zhang et al. [84], Wen et al. [85] y He et al. [86] realizan recubrimientos vía sol-gel aplicados mediante dip-coating o spin-coating, respectivamente, que consisten en una capa de TiO₂ sobre el correspondiente sustrato seguida de una capa de HAp, encontrando que tras el primer día se induce la formación de una capa de apatita sobre la superficie.

Otra posibilidad es la que emplean Tomaszek et al. [87]; la de obtener recubrimientos multicapa vía proyección térmica, por proyección plasma de suspensión (suspension plasma spraying) sobre sustratos de Ti, con cierto control de la aparición de fases derivadas de la hidroxiapatita no deseadas, según la potencia aplicada.

Lee et al. [88] realizan recubrimientos similares mediante la deposición por haz de electrones (electron-beam deposition) a escala nanométrica sobre sustratos de Ti, sometiendo el recubrimiento de TiO₂ a 500°C durante 2h y el conjunto de los dos a temperaturas entre 450 y 600°C durante 2h. Los resultados muestran una mejora en la adherencia del recubrimiento para los diferentes tratamientos térmicos respecto a los recubrimientos de HAp, manteniéndose la adherencia tras un día de inmersión en SBF. La velocidad de disolución es menor que en el caso de la HAp sola, y el comportamiento celular in vitro es similar al obtenido con recubrimientos de HAp, de lo cual se deduce que hay buena proliferación y diferenciación.

Wang et al. [89] consideran la aplicación de una capa de nanotubos de TiO₂ (anatasa) por anodizado sobre Ti seguida de un tratamiento térmico a 500 °C, y tras ella, la obtención de HAp por de-

posición electroquímica seguida de la inmersión en NaOH a 0,1mol/L durante 2h. Se mejora, con ello, la adherencia del recubrimiento respecto a los recubrimientos sólo de HAp por el entrelazado de los cristales de HAp entre los nanotubos de TiO₂.

Albayrak [et al.] [90] emplean la deposición electroforética para obtener estos recubrimientos sobre Ti6Al4V: se deposita la capa de TiO₂ (anatasa) seguida de la de HAp (ambas con estructura nanométrica), y se aplica finalmente un tratamiento térmico de sinterización a 1000°C. Así se obtienen mejoras en la resistencia a la cizalla en los recubrimientos mixtos a menores voltajes y se evita la descomposición de la HAp a altas temperaturas.

Intentos de grupos como el de Zhu et al. [91] de conseguir recubrimientos tri-capa sobre sustratos de Ti, con una capa interna de TiO₂ densa (anatasa) formada por oxidación preanódica; una capa media formada por TiO₂ porosa (rutilo/anatasa) formada por MAO (“microarc oxidation”); y una capa externa formada por HAp obtenida por vía hidrotermal, han desembocado en excelente resistencia a la corrosión. Además, estos recubrimientos presentan una excelente capacidad de adsorción para las proteínas, y buenos resultados tras ensayos celulares in vitro (buena proliferación y diferenciación celular -resultados tras 28 días) e in vivo (capacidad de formación de tejido óseo tras 30 días).

Sun y Wang [92] realizan estos recubrimientos multicapa de forma biomimética sobre sustratos de Ti o de NiTi: forman una primera capa de TiO₂ (anatasa) por oxidación con H₂O₂ y técnicas de envejecimiento (“hot water aging technique”), y después inducen la formación de una capa de apatita por un proceso biomimético acelerado (inmersión en una solución 5SBF por varios períodos de tiempo). El resultado es una buena interfaz recubrimiento-sustrato.

En la misma capa

Se han hecho estudios sobre la idoneidad de crear recubrimientos que contengan hidroxiapatita y titanio mezclados.

Los artículos que se inclinan por hacerlo vía sol-gel obtienen resultados esperanzadores. Im et al. [93] obtienen recubrimientos de HAp y TiO₂ (a 10, 30, 50 y 70% molar) vía sol-gel aplicados mediante spin-coating a 2000 rpm durante 10s y sometidos a un tratamiento térmico a 500°C durante 2 h, sobre sustratos de Ti. Los resultados muestran tener unas buenas adherencias al sustrato (evaluadas por “scratch test”), mejores cuanto mayor porcentaje de TiO₂ se emplea; asimismo,

se comprueba la capacidad de formación de una capa apatítica (aunque para tiempos posteriores a una semana), y se ve que el comportamiento celular (la adhesión cuanto menos) es buena y también mejora con el aumento del porcentaje de TiO₂.

Han, Yu y Zhou [94] realizan otros intentos sobre sustratos de Ti, vía sol-gel con aplicación por spin-coating a 1500 rpm durante 20s, con proporciones molares de 80%HA / 20%TiO₂, seguido de tratamientos térmicos a varias temperaturas entre 450 y 1200 °C. Los resultados demuestran que el efecto del óxido de titanio es un aumento de la consistencia y el ajuste en la interfaz recubrimiento-sustrato, de la adherencia del recubrimiento (con tratamientos térmicos a 1200°C se llegan a valores de 50 MPa), además de un aumento en la temperatura de cristalización de la HAp, y una mejora de la resistencia a la corrosión. También se observa que el comportamiento en condiciones fisiológicas es bueno: el recubrimiento tiene capacidad formadora de capa de apatita tras 2 días de inmersión, y los resultados in vitro muestran una buena proliferación osteoblástica. También Nathanael et al. [95] realizan recubrimientos compuestos de HAp/TiO₂ nanoestructurado a diferentes proporciones (0, 10, 20, 50, 80 y 100% de TiO₂ en volumen) sobre sustratos de vidrio, mediante la técnica sol-gel, aplicándolo por dip-coating seguido de un tratamiento térmico a 500°C durante 1h. Los resultados muestran recubrimientos más uniformes, menos rugosos, y con mejores propiedades mecánicas (módulo elástico, dureza y adherencia) a mayores porcentajes de TiO₂, ya que esta fase ejerce de matriz sobre la cual las nanopartículas de HAp se pueden depositar más eficientemente y más homogéneamente.

También hay grupos como el de Gaona, Lima y Marple [96], que proyectan recubrimientos mixtos por proyección térmica sobre sustratos de Ti6Al4V; en concreto, por HVOF con propileno. Se trata de recubrimientos nanoestructurados, de TiO₂, al 80 o 90% en peso, en forma mayoritariamente de rutilo tras la proyección, con HAp. Las propiedades mecánicas del recubrimiento, como la adherencia (valores de 68 MPa con un 20% de HAp, y valores superiores a la resistencia del pegamento con un 10% de HAp) o la dureza mejoran respecto a los recubrimientos de HAp, y son mejores a menor porcentaje de la misma. Resultados in vitro de recubrimientos similares (con el 10% de HAp en peso) obtenidos por el mismo grupo [97] muestran un comportamiento celular (adhesión, proliferación y diferenciación celular) muy bueno, mejor que en el caso de recubrimientos de HAp

obtenidos por plasma o de sustratos de Ti6Al4V sin recubrir.

Otra manera de obtener estos recubrimientos es por "sputtering": determinados grupos, como el de Boyd et al. [98,99] depositan por "sputtering" recubrimientos de titanio seguidos de recubrimientos de fosfatos de calcio sobre sustratos de Ti-6Al-4V. Mediante la aplicación de tratamientos térmicos, se provoca la difusión del óxido de titanio formado a través del recubrimiento poroso de fosfato cálcico, lo cual da lugar a recubrimientos de composiciones graduales con muy buen comportamiento celular en su superficie.

Kim et al. [100] han empleado la MAO (microarc oxidation) combinada con deposición electroforética: por MAO, se forma un recubrimiento poroso de TiO₂ sobre una superficie de Ti mientras por EPD partículas de HAp cargadas negativamente migran a través de los poros del TiO₂. Las superficies obtenidas de esta manera muestran una importante diferenciación celular.

Otras combinaciones

Existen otros intentos de combinar hidroxiapatita sustituida con iones flúor con TiO₂. Estudios previos como el de Cheng et al. [101] detectaron que el F- mejora la estabilidad de la HAp, así como su bioactividad. Promueve la mineralización en el proceso de formación de nuevo tejido óseo, tal y como demuestran estudios como el de Kim et al. [102], así que intentos como el de Wang et al. [103] de depositar estos recubrimientos mixtos sobre Ti vía electrodeposición seguida de una inmersión en NaOH a 0,1M a 60°C durante 48h y de una calcinación en vacío a 650°C durante 2h demuestran que la adición de iones F- y de TiO₂ mejora la cristalinidad de la HAp y disminuye el tamaño de cristal; asimismo, la adherencia del recubrimiento mejora y el ratio de disolución disminuye, mientras que la bioactividad in vitro es similar a la de recubrimientos de HAp.

También existen grupos como el de Mo et al. [104] que realizan, sobre Ti, recubrimientos nanoestructurados de HAp con Ag⁺ combinada con TiO₂ (anatasa) por inmersión, seguida de un secado a 150°C y de un tratamiento térmico a 400°C-750°C en vacío durante 10min: los efectos antibacterianos del recubrimiento son patentes al eliminar tras 24h más del 99% de las bacterias estudiadas.

Conclusión

Existen muchas otras combinaciones de materiales que pueden ser útiles o recomendables para

realizar recubrimientos bioactivos, pero requerirían otro estado del arte. En cuanto a las técnicas empleadas, se puede decir, teniendo en cuenta sus características y los resultados observados, que hoy día la vía más eficaz y rápida para obtener recubrimientos de biocerámicos de ciertos espesores es la proyección térmica: a pesar de las ventajas que pueden presentar los otros métodos (en particular, las vías biomiméticas, las más convenientes para obtener recubrimientos con excelente biocompatibilidad por su similitud con el tejido óseo, pero poco viables industrialmente por la lentitud con la que se consiguen capas de cierto espesor), el único que permite realizar estos recubrimientos de forma automatizada, rápida y eficiente es la proyección térmica en todas sus variantes, y, según el caso, determinados procesos de conversión como el anodizado o la MAO. El rango de composiciones utilizable es limitado (notable en el caso de las biomoléculas), pero para poder utilizar industrialmente otros métodos sería necesario optimizar los equipamientos de tal manera que la producción compensara el tiempo y el dinero empleado.

Una vez esto definido, se debería pensar en optimizar siempre los parámetros y las composiciones empleados en estas técnicas, para mejorar en lo posible los resultados clínicos.

Para ello, la primera medida sería no optar por la simple proyección plasma, ya que presenta, como ya se ha dicho, muchos inconvenientes; sino por HVOF o CGS optimizadas.

Referencias

1. **Britel, O.** Modélisation et optimisation par la méthodologie des plans d'expérience de la synthèse de l'hydroxyapatite phosphocalcique, du phosphate tricalcique apatitique et du phosphate de calcium apatitique carbonate. Thèse doctorale, 2007
2. **Gallo, J. [et al.]** Poor survival of ABG I hip prosthesis in younger patients. *Biomedical Papers of the medical faculty of the University Palacky*, vol. 152, issue 1, p. 163-168 (2008)
3. **Park, D.S. [et al.]** Improved biocompatibility of hydroxyapatite thin films prepared by aerosol deposition. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied biomaterials*, vol. 94B, issue 2, p. 353-358 (2010)
4. **Xie, J.; Luan, B.L.** Formation of hydroxyapatite coating using novel chemo-biomimetic method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol.19, issue 10, p. 3211-3220 (2008)
5. **Yang, X. [et al.]** Biomimetic Ca-P coating on pre-calcified Ti plates by electrodeposition method. *Applied surface science*, vol. 256, issue 9, p. 2700-2704 (2010)
6. **Forsgren, J. [et al.]** Formation and adhesion of biomimetic hydroxyapatite deposited on titanium substrates. *Acta Biomaterialia*, vol. 3, issue 6, p. 980-984 (2007)
7. **Ohtsuki, C.; Kamitakahara, M.; Miyazaki, T.** Coating bone-like apatite onto organic substrates using solutions mimicking body fluid. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 1, issue 1, p. 33-38 (2007)
8. **Takeuchi, A. [et al.]** Biomimetic deposition of hydroxyapatite on a synthetic polypeptide with β sheet structure in a solution mimicking body fluid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol.19, issue 1, p. 387-393 (2008)
9. **Pribosic, I.; Klopčic, S.B.; Kosmac, T.** Biomimetic preparation and characterization of bioactive coatings on alumina and zirconia ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 93, issue 1, p. 288-294 (2010)
10. **Wood, M.A.** Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications. *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 4, issue 12, p. 1-17 (2007)
11. **Bigi, A. [et al.]** In vitro culture of mesenchymal cells onto nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb13Zr alloy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 82A, issue 1, p. 213-221 (2007)
12. **Bigi, A. [et al.]** The response of bone to nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb11Zr alloy in an animal model. *Biomaterials*, vol.29, issue 11, p. 1730-1736 (2008)
13. **Xiong, J. [et al.]** Nanohydroxyapatite coating on a titanium-niobium alloy by a hydrothermal process. *Acta Biomaterialia*, vol.6, issue 4, p.1584-1590 (2010)
14. **Li, Y. [et al.]** The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium. *Biomaterials*, vol.29, issue 13, p.2025-2032 (2008)
15. **Guo, Y.; Zhou, Y.; Jia, D.** Fabrication of hydroxycarbonate apatite coatings with hierarchically porous structures. *Acta Biomaterialia*, vol. 4, issue 2, p. 334-342 (2008)
16. **Marie, P.J.** Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos*, vol.16, issue 1, p. 7-10 (2005)
17. **Ammann, P.** Strontium ranelate: a novel mode of action leading to renewed bone quality. *Osteoporos*, vol. 16, issue 1, p. 11-15 (2005)
18. **Xue, W. [et al.]** Preparation and cell-materials interactions of plasma sprayed strontium-containing hydroxyapatite coating. *Surface & Coatings Technology*, vol.201, issue 8, p. 4685-4693 (2007)

19. **Capuccini, C. [et al.]** Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response. *Acta Biomaterialia*, vol.4, issue 6, p. 4685-4693 (2007)
20. **Chen, D.M.; Fu, Y.F.** Evaluation on the mechanical properties of the solid solution of strontium substituted hydroxyapatite. *Chinese Journal of Stomach Materials Apparatus*, vol. 19, p. 178-183 (2001)
21. **Carlisle, E.M.** Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science*, vol 167, p. 279-280 (1970)
22. **Li [et al.]** Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel. *Journal of Materials Science. Materials in medicine*, vol. 4, p. 127-131 (1993)
23. **Thian, E.S. [et al.]** Silicon-substituted hydroxyapatite: the next generation of bioactive coatings. *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, issue 2, p. 251-256 (2007)
24. **Xiao, F.J. [et al.]** Silicon-substituted hydroxyapatite composite coating by using vacuum-plasma spraying and its interaction with human serum albumin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, issue 8, p. 1653-1658 (2009)
25. **Xiao, F.J. [et al.]** Electrophoretic deposition of titanium/silicon-substituted hydroxyapatite composite coating and its interaction with bovine serum albumin. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, vol. 19, issue 1, p. 125-130 (2009)
26. **Stojanovic, D. [et al.]** Bioactive glass-apatite composite coating for titanium implant synthesized by electrophoretic deposition. *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 27, issue 2-3, p. 1595-1599 (2007)
27. **Bharati, S. [et al.]** Studies on a novel bioactive glass and composite coating with hydroxyapatite on titanium based alloys: effect of γ -sterilization on coating. *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, issue 12, p. 2527-2535 (2009)
28. **Xie, X.-H. [et al.]** Enhanced osteointegration of orthopaedic implant gradient coating composed of bioactive glass and nanohydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 21, p. 2165-2173 (2010)
29. **Morks, M.F.** Fabrication and characterization of plasma-sprayed HA/SiO₂ coatings for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 1, issue 1, p.105-111 (2008)
30. **Morks, M.F.; Fahim, N.F.; Kobayashi, A.** Structure, mechanical performance and electrochemical characterization of plasma sprayed SiO₂/Ti-reinforced hydroxyapatite biomedical coatings. *Applied Surface Science*, vol. 255, issue 5, p.3426-3433 (2008)
31. **Jenkins, G.M.; De Carvalho Francisco, X.** Biomedical applications of carbon fiber reinforced carbon in implanted prostheses. *Carbon*, vol. 15, issue 1, p.33-37 (1977)
32. **Christel, P. [et al.]** Development of a carbon-carbon hip prosthesis. *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 21, issue 2, p. 191-218 (1987)
33. **Chen, Y. [et al.]** Laser-surface-alloyed carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite composite coatings. *Applied Physics Letters*, vol. 86, issue 25, p. 251905- 251905.03 (2005)
34. **Balani, K. [et al.]** Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*, vol. 28, issue 4, p. 618-624 (2007)
35. **Balani, K. [et al.]** Tribological behaviour of plasma-sprayed carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite coating in physiological solution. *Acta Biomaterialia*, vol. 3, issue 6, p. 944-951 (2007)
36. **Kaya, C.** Electrophoretic deposition of carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite bioactive layers on Ti-6Al-4V alloys for biomedical applications. *Ceramics International*, vol. 34, issue 8, p. 1843-1847 (2008)
37. **Hollinger, M.A.** Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Critical reviews in toxicology*, vol. 26, issue 2, p. 255-260 (1996)
38. **Chen, W. [et al.]** Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 82A, issue 4, p.899-906 (2007)
39. **Noda, I. [et al.]** Development of novel thermal sprayed antibacterial coating and evaluation of release properties of silver ions. *Journal of Biomedical Materials Research part B: Applied Biomaterials*, vol. 89B, issue 2, p. 456-465 (2008)
40. **Teng, S. [et al.]** Bioactive nanocomposite coatings of collagen/hydroxyapatite on titanium substrates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, issue 6, p. 2453-2461 (2008)
41. **Kim, H.W. [et al.]** Fibrillar assembly and stability of collagen coating on titanium for improved osteoblast responses. *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 75A, issue 3, p. 629-638 (2005)
42. **Rammelt, S. [et al.]** Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulphate. *Biomaterials*, vol. 27, issue 32, p. 5561-5571 (2006)
43. **Manara, S. [et al.]** Electrochemically-assisted deposition of biomimetic hydroxyapatite-collagen coatings on titanium plate. *Inorganica Chimica Acta*, vol. 361, issue 6, p. 1634-1645 (2008)
44. **Daugaard, H. [et al.]** The effect on bone growth enhancement of implant coatings with hydroxyapatite and collagen deposited electrochemically and by plasma spray. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 92, issue 3, p. 913-921 (2010)

45. **Rammelt, S.A.** Coating of titanium implants with type-I collagen. *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 22, p. 1025-1034 (2004)
46. **Kikuchi, M. [et al.]** Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials*, vol. 25, issue 1, p.63-69 (2004)
47. **Sun, F.; Pang, X.; Zhitomirsky, I.** Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite-chitosan-heparin coatings. *Journal of Materials Processing Technology*, vol. 209, issue 3, p. 1597-1606 (2009)
48. **Lin, W.C.; Tseng, C.H.; Yang, M.C.** In vitro hemocompatibility evaluation of a thermoplastic polyurethane membrane with surface-immobilized water-soluble chitosan and heparin. *Macromolecular Bioscience*, vol. 5, issue 10, p. 1013-1021 (2005)
49. **Negroiu, G. [et al.]** Biocompatibility evaluation of a novel hydroxyapatite-polymer coating for medical implants (in vitro tests). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, issue 4, p. 1537-1544 (2008)
50. **Fleisch, H.** Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocrine Reviews*, vol. 19, issue 1, p. 80-100 (1999)
51. **Fleisch, H.** Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Annals of Medicine*, vol. 29, p.55-62 (1997)
52. **Oliveira, A.L. [et al.]** Biomimetic Ca-P coatings incorporating bisphosphonates produced on starch-based degradable biomaterials. *Journal of biomedical materials research part B: Applied Biomaterials*, vol. 92, issue 1, p. 55-67 (2009)
53. **Jakobsen, T. [et al.]** Local bisphosphonate treatment increases fixation of hydroxiapatite-coated implants inserted with bone compaction. *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 27, issue 2, p. 189-194 (2009)
54. **Sanpo, N.; Khor, K.A. [et al.]** Antibacterial properties of cold-sprayed HA-Ag/PEEK coating. *Journal of Thermal Spray Technology*, vol. 18, issue 1, p.10-15 (2009)
55. **Linsebigler, A.L.; Lu, G.; Yates, J.T.** Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: principles, mechanisms, and selected results. *Chemical Reviews*, vol. 95, p. 735-758 (1995)
56. **Breme, J.** Titanium and titanium alloys, biomaterials of preference. *Revue de métallurgie*, vol. 10, p. 625-637 (1989)
57. **Ochsenbein, A. [et al.]** Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol-gel process on titanium substrates. *Acta Biomaterialia*, vol. 4, issue 5, p. 1506-1517 (2008)
58. **Jaworski, R. [et al.]** Characterization of mechanical properties of suspension plasma sprayed TiO₂ coatings using scratch test. *Surface & Coatings Technology*, vol. 202, issue 12, p. 2644-2653 (2008)
59. **Lamaka, S.V. [et al.]** Nanoporous titania interlayer as reservoir of corrosion inhibitors for coatings with self-healing ability. *Process in organic coatings*, vol. 58, issues 2-3, p. 127-135 (2007)
60. **Chiu, K.Y. [et al.]** Characterization and corrosion studies of titania-coated NiTi prepared by sol-gel technique and steam crystallization. *Applied Surface Science*, vol. 253, issue 16, p. 6762-6768 (2007)
61. **Shi, P. [et al.]** Improvement of corrosion resistance of pure magnesium in Hanks' solution by microarc oxidation with sol-gel TiO₂ sealing. *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 469, issues 1-2, p. 286-292 (2009)
62. **Uchida, M. [et al.]** Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 64A, issue 1, p. 164-170 (2003)
63. **Chen, D. [et al.]** Apatite formation on alkaline-treated dense TiO₂ coatings deposited using the solution precursor plasma spray process. *Acta Biomaterialia*, vol. 4, issue 3, p. 553-559 (2008)
64. **Li, P. [et al.]** A role of hydrated silica, titania and alumina in forming biologically active bone-like apatite on implant. *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 28, issue 1, p. 7-15 (1994)
65. **Wei, D. [et al.]** Characteristic and in vitro bioactivity of a microarc-oxidized TiO₂-based coating after chemical treatment. *Acta Biomaterialia*, vol. 3, issue 5, p.817-827 (2007)
66. **Henderson, M.A.** Structural sensitivity in the dissociation of water on TiO₂ single-crystal surfaces. *Langmuir*, vol. 12, issue 21, p. 5093-5098 (1996)
67. **Liu, X. [et al.]** UV-irradiation-induced bioactivity on TiO₂ coatings with nanostructural surface. *Acta Biomaterialia*, vol. 4, issue 3, p. 544-552 (2008)
68. **Brohede, U. [et al.]** A novel graded bioactive high adhesion implant coating. *Applied Surface Science*, vol. 255, issue 17, p. 7723-7728 (2009)
69. **Cavalcanti-Adam E.A. [et al.]** Cell adhesion and response to synthetic nanopatterned environments by steering receptor clustering and spatial location. *HFSP Journal*, vol. 2, issue 5, p. 276-285 (2008)
70. **Von der Mark, K. [et al.]** Nanoscale engineering of biomimetic surfaces : cues from the extracellular matrix. *Cell and Tissue Research*, vol. 339, issue 1, p. 131-153 (2010)
71. **Advincula, M.C. [et al.]** Surface analysis and biocorrosion properties of nanostructured surface sol-gel coatings on Ti6Al4V Titanium alloy implants. *Journal of biomedical materials research. Part B: Applied biomaterials*, vol. 80, issue 1, p. 107-120 (2007)
72. **Crawford, G.A. [et al.]** Microstructure and deformation behavior of biocompatible TiO₂ nanotubes on titanium substrate. *Acta Biomaterialia*,

- vol. 3, issue 3, p. 359-367 (2007)
73. **Crawford, G.A.; Chawla, N.** Porous hierarchical TiO₂ nanostructures: processing and microstructure relationships. *Acta Materialia*, vol. 57, issue 3, p. 854-867 (2009)
 74. **Crawford, G.A.; Chawla, N.; Houston, J.E.** Nanomechanics of biocompatible TiO₂ nanotubes by Interfacial Force Microscopy (IFM). *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 2, issue 6, p. 580-587 (2009)
 75. **Von Wilmsowski, C. [et al.]** In vivo evaluation of anodic TiO₂ nanotubes: an experimental study in the pig. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: applied biomaterials*, vol. 89B, issue 1, p. 165-171 (2009)
 76. **Ma, Q. [et al.]** Enhancement of the bioactivity of titanium oxide nanotubes by precalcification. *Materials Letters*, vol. 63, issues 17-18, p. 3035-3038 (2008)
 77. **Huang, Z. [et al.]** Effect of nanofiber-coated surfaces on the proliferation and differentiation of osteoprogenitors in vitro. *Tissue Engineering: Part A*, vol. 14, issue 11, p. 1853-1859 (2008)
 78. **Bienias, J. [et al.]** The influence of SiO₂ and SiO₂-TiO₂ intermediate coatings on bond strength of titanium and Ti6Al4V alloy to dental porcelain. *Dental Materials*, vol. 25, issue 9, p. 1128-1135 (2009)
 79. **Aaritalo, V. [et al.]** Sol-gel derived TiO₂-SiO₂ implant coatings for direct tissue attachment. Part I: design, preparation and characterization. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, vol. 18, issue 9, p. 1863-1873 (2007)
 80. **Areva, S. [et al.]** Sol-gel derived TiO₂-SiO₂ implant coatings for direct tissue attachment. Part II: evaluation of cell response. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, vol. 18, issue 8, p. 1633-1642 (2007)
 81. **Wei, D. [et al.]** Formation of CaTiO₃/TiO₂ composite coating on titanium alloy for biomedical applications. *Journal of biomedical materials research, part B: applied biomaterials*, vol. 84B, issue 2, p. 444-451 (2008)
 82. **Necula, B.S. [et al.]** In vitro antibacterial activity of porous TiO₂-Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomaterialia*, vol. 5, issue 9, p. 3573-3580 (2009)
 83. **Yuan, S.J. [et al.]** Biocorrosion behaviour of titanium oxide/butoxide-coated stainless steel. *Journal of the electrochemical society*, vol. 155, issue 5, p. 196-210 (2008)
 84. **Zhang, W. [et al.]** Tribological behaviors of single and dual sol-gel ceramic film on Ti-6Al-4V. *Ceramics International*, vol. 35, issue 4, p. 1513-1520 (2009)
 85. **Wen, C.E. [et al.]** Hydroxyapatite/titania sol-gel coatings on titanium-zirconium alloy for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, vol. 3, issue 3, p. 403-410 (2007)
 86. **He, G. [et al.]** Surface modification of titanium by nano-TiO₂/HA bioceramic coating. *Applied Surface Science*, vol. 255, issue 2, p. 442-445 (2008)
 87. **Tomaszek, R. [et al.]** Microstructure of suspension plasma sprayed multilayer coatings of hydroxyapatite and titanium oxide. *Surface and Coatings Technology*, vol. 201, issues 16-17, p. 7432-7440 (2007)
 88. **Lee, S.H.; Kim, H.E.; Kim, H.W.** Nano-sized hydroxyapatite coatings on Ti substrate with TiO₂ buffer layer by E-beam deposition. *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 90, issue 1, p. 50-56 (2007)
 89. **Wang, Y.-Q. [et al.]** HA coating on titanium with nanotubular anodized TiO₂ intermediate layer via electrochemical deposition. *Transactions of Non-ferrous Metals Society of China*, vol. 18, issue 3, p. 631-635 (2008)
 90. **Albayrak, O.; El-Atwani, O.; Altintas, S.** Hydroxyapatite coating on titanium substrate by electrophoretic deposition method: effects of titanium dioxide inner layer on adhesion strength and hydroxyapatite decomposition. *Surface and Coatings Technology*, vol. 202, issue 11, p. 2482-2487 (2008)
 91. **Zhu, L. [et al.]** Biomimetic coating of compound titania and hydroxyapatite on titanium. *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 83A, issue 4, p. 1165-1175 (2007)
 92. **Sun, T.; Wang, M.** Low-temperature biomimetic formation of apatite/TiO₂ composite coatings on Ti and NiTi shape memory alloy and their characterization. *Applied Surface Science*, vol. 255, issue 2, p. 396-400 (2008)
 93. **Im, K.-H. [et al.]** Improvement of bonding strength to titanium surface by sol-gel derived hybrid coating of hydroxyapatite and titania by sol-gel process. *Surface and Coatings Technology*, vol. 202, issue 4-7, p. 1135-1138 (2007)
 94. **Han, J.Y.; Yu, Z.T.; Zhou, L.** Hydroxyapatite/titania composite bioactivity coating processed by sol-gel method. *Applied Surface Science*, vol. 255, issue 2, p. 455-458 (2008)
 95. **Joseph Nathanael, A.; Mangalaraj, D.; Ponpandian, N.** Controlled growth and investigations on the morphology and mechanical properties of hydroxyapatite/titania nanocomposite thin films. *Composites Science and Technology*, vol. 70, p. 1645-1651 (2010)
 96. **Gaona, M.; Lima, R.S.; Marple, B.R.** Nanostructured titania/hydroxyapatite composite coatings deposited by high-velocity oxy-fuel (HVOF) spraying. *Materials Science and Engineering A*, vol. 458, issues 1-2, p. 141-149 (2007)
 97. **Lima, R.S. [et al.]** HVOF-Sprayed nano TiO₂-HA coatings exhibiting enhanced biocompatibility

- ty. *Journal of Thermal Spray Technology*, vol. 19, issues 1-2, p. 336-342 (2010)
98. **Boyd, A.R. [et al.]** Characterisation of calcium phosphate/titanium dioxide hybrid coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, issue 2, p. 485-498 (2008)
99. **Boyd, A.R. [et al.]** Sputter deposition of calcium phosphate/titanium dioxide hybrid thin films. *Materials Science and Engineering C*, vol. 28, issue 2, p. 228-236 (2008)
100. **Kim, D.-Y. [et al.]** Formation of hydroxyapatite within porous TiO₂ layer by micro-arc oxidation coupled with electrophoretic deposition. *Acta Biomaterialia*, vol. 5, issue 6, p. 2196-2205 (2009)
101. **Cheng, K. [et al.]** Sol-gel preparation and in vitro test of fluorapatite/hydroxyapatite films. *Journal of Biomedical Materials Research, part B: applied biomaterials*, vol. 69B, issue 1, p. 33-37 (2003)
102. **Kim, H.-W.; Kim, H.-E.; Knowles, J.C.** Fluor-hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants. *Biomaterials*, vol. 25, issue 17, p. 3351-3358 (2004)
103. **Wang, J. [et al.]** Fluoridated hydroxyapatite/titanium dioxide nanocomposite coating fabricated by a modified electrochemical deposition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, issue 5, p. 1047-1055 (2009)
104. **Mo, A. [et al.]** Preparation and antibacterial effect of silver-hydroxyapatite/titania nanocomposite thin film on titanium. *Applied Surface Science*, vol. 255, issue 2, p. 435-438 (2008)

Anexo 2

Artículo en trámites de publicación en la revista Surface and Coatings Technology, con el título “Mechanical performance of bioceramic coatings obtained by high-velocity oxy-fuel spray for biomedical purposes”

Equivalencias nomenclatura artículo-tesis:

Tablas

| | |
|---|---------|
| 1 | VIII.4. |
| 2 | VIII.5. |
| 3 | VII.3. |
| 4 | VIII.2. |
| 5 | VIII.6. |

Figuras

| | |
|----|---------------|
| 1 | IV.7. |
| 2 | VIII.2. |
| 3 | VII.13. a 16. |
| 4 | VIII.3. |
| 5 | VIII.4. |
| 6 | VIII.5. |
| 7 | VIII.6. |
| 8 | VIII.7. |
| 9 | VIII.8. |
| 10 | X.3. |

Elsevier Editorial System(tm) for Surface and Coatings Technology
Manuscript Draft

Manuscript Number: SURFCOAT-D-13-00641R2

Title: Mechanical performance of bioceramic coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray for biomedical purposes

Article Type: Full Length Article

Keywords: Bioceramic; Coating; HVOF; adherence; fracture toughness; mechanical integrity

Corresponding Author: Ms. Hortensia Melero,

Corresponding Author's Institution: Thermal Spray Centre (CPT)

First Author: Hortensia Melero

Order of Authors: Hortensia Melero; Gemma Fargas; Javier Fernández; Josep Maria Guilemany

Abstract: Plasma-sprayed hydroxyapatite coatings were used for many years to improve the osseointegration of joint implants. However, it was observed that their mechanical properties did not meet the requirements. Consequently, as in previous studies, an HAp-TiO₂ mixture was considered. But, contrarily to these studies, where TiO₂ is the majority phase (80-90wt% into the mixture), in this work the feasibility of coatings containing only 20wt% of TiO₂ is proposed. Composite coatings were obtained via high-velocity oxy-fuel (HVOF) spray at four different set of conditions. Bond strength tests, fracture toughness calculations and scratch tests together with preliminary cell viability tests were performed and compared with those of pure hydroxyapatite coatings and a powder mixture of 60wt%HAp-40wt%TiO₂. Results showed that one of proposed 80-20 cases displayed best mechanical and biological properties than coatings commonly used.

***Manuscript**

[Click here to view linked References](#)

***Mechanical performance of bioceramic coatings obtained by high-velocity oxy-fuel spray
for biomedical purposes***

H. Melero^{1}; G. Fargas²; J. Fernández¹; J.M. Guilemany¹*

¹ Thermal Spray Centre
Universitat de Barcelona
Martí i Franqués, 1
08028 Barcelona
Spain

² CIEFMA
Universitat Politècnica de Catalunya
Diagonal, 647
08028 Barcelona
Spain

* Corresponding author:
Hortensia Melero
Thermal Spray Centre
Universitat de Barcelona
Martí i Franqués, 1
08028 Barcelona
Spain

Phone: (+34) 603 823 033

Fax: (+34) 93 402 16 38

E-mail: hortensia.melero.correas@gmail.com

Abstract

Plasma-sprayed hydroxyapatite coatings were used for many years to improve the osseointegration of joint implants. However, it was observed that their mechanical properties did not meet the requirements. Consequently, as in previous studies, an HAp-TiO₂ mixture was considered. But, contrarily to these studies, where TiO₂ is the majority phase (80-90wt% into the mixture), in this work the feasibility of coatings containing only 20wt% of TiO₂ is proposed. Composite coatings were obtained via high-velocity oxy-fuel (HVOF) spray at four different set of conditions. Bond strength tests, fracture toughness calculations and scratch tests together with preliminary cell viability tests were performed and compared with those of pure hydroxyapatite coatings and a powder mixture of 60wt%HAp-40wt%TiO₂. Results showed that one of proposed 80-20 cases displayed best mechanical and biological properties than coatings commonly used.

1. Introduction

Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) has been used for biomedical applications for decades, due to its well-known osteoconductive properties [1, 2]. As its mechanical behavior is poor, the material was soon found to be unsuitable for large bone or load-bearing replacements [3]. However, in the early 1980s a new use was envisaged: a coating on metal substrates, in order to combine the mechanical properties of the metal alloys with the biological properties of the HAp in prosthetic or dental devices [4]. Industries soon took up the idea and started to produce HAp coatings with plasma-spray [4] to resolve aseptic loosening, which is the main cause of early failure in joint replacements after short implantation times [5].

Further studies in the following years showed the problems inherent in the plasma-spraying procedure. Although the physiological behavior of the coated prosthesis is better than that of the uncoated one, with an improvement in the aseptic loosening problem, the high temperatures reached during the plasma process lead to a degradation of the initial phases of the HAp powder [6]. As a consequence, unwanted phases with poor mechanical properties appear, either in the coating-substrate interface or across the coating. In addition, hydroxyapatite is a brittle material [7], with a tendency to delaminate easily. Therefore, micrometric parts of the coating may separate from the prosthesis and damage tissues [8].

One way to solve these problems is by combining, within the coating, hydroxyapatite with another compound with better mechanical properties. Different possibilities have been considered in literature, such as carbon nanotubes to improve toughness and abrasion resistance [9, 10], silicium oxide to improve adherence and corrosion resistance [11, 12], ceramic (TiO_2 for example) interlayers [13], etc.

The addition of TiO₂ as the majority phase (≈80%) has been considered in many studies, using a nanometric titania [14]. The nanostructure allows a good proliferation and adhesion in vitro, but the lower amount of calcium into the coating would lead to a lower differentiation than for HAp coatings, because of the essential role of this ion in this biological process [15,16]. Furthermore, according to some authors [17,18], TiO₂ surfaces are bioinert when in vivo conditions are tested, and could lead to the formation of a fibrous capsule between them and the surrounding tissues. For these reasons, in this study 20wt% of TiO₂ was added to a majority phase of HAp, in order to reach a compromise between good mechanical properties and the well-known biological properties of HAp. This mixture was considered the starting material, and plasma-spray was substituted by HVOF (high-velocity oxy-fuel spray), using lower temperatures and, subsequently, resulting in a lower degradation of the coating. Adhesion, delamination and crack growth were studied using bond strength tests, scratch testing and indentations, to assess the influence of TiO₂ and HVOF. A preliminary viability test was also performed to evaluate the biological behavior of the studied samples.

2. Experimental method

2.1. Raw materials and thermal spray conditions

The starting powder was a mechanical mixture of a Sulzer-Metco TiO₂ powder (20wt%) and a Plasma-Biototal Ltd. hydroxyapatite powder (80wt%), named 80-20 in the text. For comparison purposes, in many mechanical tests other mixtures were also considered: pure HAp and 60wt%HAp-40wt%TiO₂ samples, designed as 60-40.

The morphology and structure of the two powders, HAp and TiO₂, were first characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) using a Jeol JSM-5310 equipment. A Beckman Coulter LS13320 Laser Spectrometer was used to study granulometric dispersion. Finally, a Siemens D500 X-ray diffraction Bragg-Brentano type $\theta/2\theta$ apparatus, with Cu K _{α 1+2} radiation with $\alpha_1=1.54060$ and $\alpha_2= 1.54443$ at 40 kV and 30 mA, was used to analyze their purity and crystallinity.

Ti6Al4V alloy was used as the substrate, and was alumina grit-blasted before the spraying process to obtain roughness values of over 5 μm , which guarantee good coating adhesion.

All the coatings were sprayed with an HVOF Sulzer-Metco Diamond Jet Hybrid (DJH)-2700 system under four different spraying conditions (Table 1).

2.2. Microstructural analysis and phase identification

Studied coatings were cut, ground, polished and sputtered before being observed by SEM. Matrox Inspector software was used to obtain thickness and porosity values. Phases were identified by X-ray diffraction using Rietveld method.

2.3. Mechanical characterization

Bond strength tests were carried out according to the ASTM C633-01 (2008) standard [19], with the testing machine SERVOSIS ME-402/10. Three samples were tested for each case, to produce enough results to calculate the desired statistics.

Fracture toughness was measured using indentation analysis with a Matsuzawa MXT-CX microhardness tester at 300 gf. Two tests based on Vickers indentation were performed: the

Vickers indentation fracture (VIF) test, in the middle layers of the coatings; and the interface indentation fracture (IIF) test, to analyze fracture toughness at the interface. The samples were observed by SEM to obtain sufficiently precise micrographs, and the Matrox Inspector image analysis program was used to measure dimensions and cracks.

Two steps are needed in the VIF test [20, 21] to calculate fracture toughness. The first step, which is required to calculate the Young's modulus, employs Knoop indentations and Eq.1:

$$\frac{b'}{a'} = \frac{b}{a} - \alpha \frac{H_k}{E} \quad \text{Eq.1}$$

where b' and a' are the dimensions of the Knoop diagonals after elastic recovery, b/a is a known value of 1/7.11 that corresponds to the indenter geometry, and α is a constant value of 0.45. H_k is considered the hardness measured by the Knoop indentation.

Once the Young's modulus has been calculated, the Anstis equation [21], Eq.2, can be applied:

$$K_c = 0.016 \sqrt{\frac{E}{H} \left[\frac{P}{c^{3/2}} \right]} \quad \text{Eq. 2}$$

where P is the applied load of 300 gf, c is the surface trace of the crack measured from the center of the indent, E is the Young's modulus and H is the hardness measured by Vickers indentation. This fracture toughness calculation provides a qualitative comparison of results for biomaterials [22].

The method developed by Becher et al. [23] was applied for the IIF test to obtain a qualitative and comparative measure [22] of interface toughness. The interfacial debonding response is evaluated using cracks generated by a Vickers indents performed at various

angles. In this regard, weaker interfaces display interfacial debonding at angles close to 90°. Indents were performed at 300 gf considering a ratio of the intersecting crack length to nominal crack length of around 0.5 [22, 23].

For both tests, VIF and IIF, three samples were analyzed for each studied condition and ten indentations were performed in each sample.

The adhesion strength of the TiO₂-HAp coatings on the Ti6Al4V alloy was also evaluated by the single-point scratch technique (ASTM C1624-05 [24]). The tests were performed using a CSM-Revetest scratch testing instrument at a constant speed of 10 mm/min, with a progressive increase to a normal force of 1 to 140 N. The critical scratch load (L_c) was defined as the load which caused adhesive failure, i.e., detachment and separation of the coating from the substrate by cracking and debonding at the coating-substrate interface. Scratch tracks and induced damage were examined by means of laser confocal scanning microscopy (LCSM), using an Olympus LEXT OLS 3100 microscope. Five scratch tests were performed on three different samples for each case studied in order to obtain an average value and a standard deviation.

2.4. Cell culture and viability tests

Osteoblasts were obtained for culture following the protocol described by Nacher et al. [25] from knee trabecular bone obtained after prosthesis replacement with patients' prior written informed consent. The entire study was conducted in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki, revised in 1983. Coated samples were seeded with 20000 cells for viability studies, and the medium employed for was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), containing 4.5 g/L glucose and supplemented with 10% FBS, pyruvate (1 mM),

glutamine (2 mM), penicillin (100 UI/mL), streptomycin (100 UI/mL) and ascorbic acid (100 mg/ml) (Invitrogen).

Cell viability was characterized using LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for Mammalian Cells (Invitrogen), which stains live cells cytoplasm with green-fluorescent calcein-AM and dead cells nuclei with red-fluorescent ethidium homodimer-1. The surfaces were then observed with a Leica DM 1000 optical microscope.

3. Results and discussion

3.1. Raw materials

Only hydroxyapatite and rutile were detected by XRD in the initial powders (Figure 1). The analysis also showed straight peaks, due to their crystallinity. The grain size distributions were monomodal, and the d50 values were similar: 32 μm for HAp and 35 μm for titania. SEM observation indicated a granulometric distribution coherent with the previous result, as well as a spherical morphology in the case of the atomized HAp powder and an irregular morphology in the case of the sintered and crushed TiO_2 .

3.2. Microstructural analysis and phase identification of the coatings

SEM micrographs of two cases (the best and the worst) can be observed in Figure 2, and thicknesses and porosity values are listed in Table 2. The fact that no significant differences were found by ANOVA between the thickness values simplified the comparison of the mechanical properties obtained in the different cases, as this parameter was not a variable.

Cross-section characterization pointed case D as the one with the most compact and homogeneous structure (Figure 2). The porosity was very low and very few cracks were observed. Case A, followed by the HAp case, presented the most porous and heterogeneous cross sections. Cases B, C and 60-40 had very similar microstructures, with few pores but which were larger than those in cases A, D and HAp. Case C showed porosity mainly located in the outer layers, and more cracks than case B. The 60-40 case did not show appreciable cracks but revealed a lack of cohesion between layers which was not appreciated in the other cases.

XRD results (Figure 3) show that, for all coatings, the main phases were the initial ones, hydroxyapatite and rutile. There were some small peaks that were attributed to anatase and α -TCP. Furthermore, broad bands were observed due to the presence of amorphous phases derived from the thermal degradation of hydroxyapatite and TiO_2 (especially of hydroxyapatite, according previous analysis and to the different width of both broad bands).

Rietveld calculations were performed for A to D samples to clarify which phases were present after spraying and the respective amounts of them. The results, which are listed in Table 3, quantified hydroxyapatite, rutile, anatase and α -TCP as crystalline phases and the amount of amorphous phases. There is a clear difference between sample D, on the one hand, and samples A, B and C on the other, when comparing the amount of amorphous phase. The value of amorphous phase for sample D (14%) is also similar to that previously found for 60-40 coatings and lower than that for HVOF-sprayed HAp (18%) [26]. The difference is especially noticeable if compared to HAp plasma sprayed coatings (38%) [27].

The amount of amorphous phases present in the samples depends, not only on the temperature of the beam but also on the residence time in the beam. Greater beam

temperatures facilitate the formation of amorphous phases; however, a short residence time had the opposite effect. This is the reason why it is possible to have highly energetic beams with small amounts of amorphous phases, because the shorter residence time avoids excessive heating of powder and therefore its amorphization. This explains the lowest percentage of amorphous phase being present in D samples. The residence time of the particles (t_{res}) in the beam, in this case, was the shortest of the four; thus reducing the possibility of thermal degradation. Case B was sprayed with a lower O_2 flow than in case D. As a consequence, the t_{res} of sample B was higher than t_{res} of sample D although its beam temperature was lower. The heat transfer between the beam and the powder particles was increased by increasing the residence time, and thus the amount of amorphous phase present in the samples also increases. C and A samples experienced a higher t_{res} in the flame than the other two cases, hence their higher percentage of amorphous phase.

3.3. Bond strength adhesion

Adhesion tests were performed for A to D samples and compared with the values of HAp and 60-40 from previous studies. The maximum adherence values are given in Table 4.

The results show bond strength values above 50 MPa, and even higher than 60 MPa in some cases (D samples). Surface observation after adhesion tests revealed adhesive failure of the coatings for the samples sprayed with smaller amounts of compressed air (A and C) and a percentage of cohesive failure with larger amount of compressed air (B and D). Although the standard deviations make the differences between samples relative, there is a trend for higher bond strength at higher beam velocities, which indicates the influence of particle speed in the adhesion behavior of the coatings.

The values obtained were significantly higher than other referenced values. M. Gaona et al. [26] obtained average values of 45 MPa for HAp coatings sprayed with HVOF and around 40 MPa using plasma spraying. This result indicates the positive role of titanium dioxide, which has better mechanical properties than HAp and lower residual stresses, thus improving the coating adhesion. This role is particularly evident in studies such as that by Lima et al. [14], in which values of around 70 MPa were obtained by spraying high amounts of titania (80%-90%) by HVOF.

The difference in bonding strength when using 20% or 40% of titania in the powder was negligible and the maximum bond strength results are similar according to studies performed by Ferrer et al. [28]. For this reason, a mixture with a lower percentage of TiO₂ (20wt%) was more suitable to enhance the biocompatibility of the coating due to the lower bioactivity of TiO₂ compared with HAp. The FDA regulations [29] establish a minimum tensile stress of 51 MPa for calcium phosphate coatings to be used in orthopedic and dental applications, which makes the values obtained for the best cases with 20wt% and 40wt% of TiO₂ are sufficient for the application.

Case D, with a dense microstructure, a small proportion of defects and the lowest amount of amorphous phase, showed the best value of bond strength, as expected.

3.4. Fracture toughness

3.4.1. Vickers indentation fracture test

E and K_{Ic} were calculated using cracks parallel to the coating surface, to study the situation with a higher delamination risk and provide a measure of the cohesive properties of the coating. The results are shown in Figures 4 and 5.

The Young's modulus was improved in samples with TiO₂, but its value stayed nearly constant when the amount of TiO₂ increased from 20wt% to 40wt%. Other authors [30] noted an improvement in the mechanical properties with the mere addition of TiO₂, with a further small influence of the percentage that was added. Furthermore, these differences had been widely attributed to changes in residual stresses due to the presence of TiO₂ [30, 31]. TiO₂, mainly in the rutile phase, has a thermal expansion coefficient that is lower than that of hydroxyapatite and even lower than that of the anatase phase. This may reduce the residual stresses of the coatings during the spray deposition.

The effect of residence time in the beam and the consequent amorphous phase amount was noticeable in the obtained E values for the four 80-20 cases. Although the differences among them were not significant, there was a trend obtaining higher Young modulus values (around 40 MPa) for the case D, with the lower amount of amorphous phases, which is related to the higher hardness and mechanical resistance of the crystalline phase; and obtaining lower E values for the cases with higher amorphous phases, A and C (between 25-32 MPa).

The same observation related to the E and bond strength results can be made with regard to the K_{IC} value: the presence of TiO₂ influenced fracture toughness much more than the relative amount of TiO₂ in the mixture. The presence of a second phase in an HAp matrix increased the energy required to extend a crack [32]; i.e., the presence of TiO₂ particles increased the number of interfaces that a crack had to cross to be propagated.

Focusing on the differences between the four 80-20 cases, the higher values of K_{IC} were obtained for the case with a lower amount of amorphous phases, D (almost 2 MPa.m^{1/2}), whereas the cases with a higher amount of amorphous phases, A and C, show values under 1.5 MPa.m^{1/2}. It is noteworthy that this fact conflicts with literature, where many references

agree that the amount of amorphous phase should improve the K_{Ic} values [33]. This contradiction is attributed to the higher beam velocity of the cases with a lower amorphous phase amount and residence time. This higher beam velocity led to a higher compactness of the coatings that made crack propagation more difficult, not only because of a lower porosity, but also because of a higher compactness of interfaces (HAp particle to HAp particle or HAp particle to TiO_2 particle). According to the superior values obtained for the cases with a lower amount of amorphous phase but a higher compactness, the latter would have a stronger influence in the K_{Ic} of these coatings.

Several toughening mechanisms from a ceramic matrix can be identified in this work. One example is crack deflection [34], Figure 6d. When a propagating crack encounters an interface with a TiO_2 particle, it must either cross the particle, which requires a considerable amount of extra energy, or deflects its trajectory. That is why many cracks surrounded TiO_2 particles. Another example is the presence of microcracks in the structure [35], a typical effect in thermal sprayed coatings, due to the rapid cooling and the difference between the thermal expansion coefficient of the substrate and the coating. These microcracks can absorb part of the propagation energy of the crack (Figures 6a and 6b). However, given that in this case the formation of cracks is not a controlled process, it cannot be ensured that the role of these cracks is positive.

Some authors [36, 37] point to a possible transformation-toughening mechanism with HAp derived phases. Specifically, it has been claimed that, in the presence of crack propagation-derived stresses, HAp transforms to TCP phase, with higher specific volumes, that creates a compressive field around the crack, so that more energy is required for its propagation. This

effect could also influence the trajectory of the crack. However, micro-Raman assays should be carried out to clarify whether the phenomenon also occurs in this case.

3.4.2. Interface indentation fracture test

The first observation in the IIF test was that the coating-substrate interface was considered tough because, in all four cases, only 30%-40% of indentations made with the maximum angle that caused cracks capable of reaching the interface actually arrived at the interface and caused some debonding (Figure 7a and b). As a consequence of the low amount of cracks arriving to the interface, instead of plotting the conventional l_{db} (the debonding length) versus the incident angle, only the maximum angle that caused a certain amount of debonding was considered, Table 5.

As explained in the experimental method section, the cases needing lower incidence angles (which means cracks more parallel to the interface) to induce debonding in the interface correspond to higher fracture toughness of their interfaces. The measured angles were consistent with the K_{Ic} results calculated previously. The HAp coating shows the largest angle ($\approx 80^\circ$), which is obviously related to the lower K_{Ic} value found previously; the lower angle for the 60-40 sample ($\approx 50^\circ$) is related to the increased presence of TiO_2 . This greater amount of TiO_2 particles reduces the percentage of cracks that cause debonding, due to the loss of propagation energy before the cracks reach the substrate, and increases the debonding angle. The 80-20 samples presented an intermediate behavior. There were no relevant differences in the results for A, B and C, and only D was different with slightly lower angles and a consequent higher fracture toughness of the interface. As it was argued for the K_{Ic}

values, the fact that the case D presented the highest interface fracture toughness having the lowest amorphous phase content is attributed to the important influence of the compactness of the coating (because of the highest particle velocity of case D, the highest of the four cases).

The relationship between the K_{Ic} values and interfacial fracture toughness was maintained for almost all cases (100, 80-20 and 60-40), mainly because the amorphous phase in these coatings was not located only at the interface, but was quite distributed over the coating [38]: if the amorphous phase was concentrated in the interface, the effect on the interface fracture toughness would possibly be extremely important. However, it is evident that the indentations near the substrate produce less damage around them than those in other zones of the coatings, which is a sign of higher fracture toughness. The conclusion is that, although the relationship among the samples is maintained with regard to the calculated K_{Ic} , there is a higher compactness near the substrate that may cause higher fracture toughness.

3.4.3. Scratch test

The average of critical loads and their standard deviations obtained after scratch tests are given in Figure 8.

There were no significant differences between the A, B and D samples. These samples showed the highest critical loads. Only the sample with a higher amorphous phase, C, presented a lower value for critical load. This could be explained by the fact that the amorphous phase has very low mechanical properties, which could make it easier to reach the substrate with a lower load. The tougher mass of material can more easily be dragged by

the indenter. The 100% HAp samples had an extremely low critical load; the lower hardness and mechanical properties of HAp may facilitate dragging the material with a lower load as well. The absence of TiO₂ particles and, as a consequence, of material interfaces in the structure made the indenter reach the substrate more easily. However, in the 60-40 case, the critical load was lower than in the A to D 80-20 samples. The increase of a second phase in the HAp matrix, which should hinder crack propagation and the advance of the indenter leading to a need for higher loads, was compensated by the fact that the TiO₂ phase is harder and brittle. This made crack propagation and the advance of the indenter easier in TiO₂ zones, and explains that the critical load was lower than in the 80-20 mixture. This decrease of mechanical properties with a higher percentage of TiO₂ was also observed by Khor et al. [30], who attributed it to the formation of new compounds which were not observed in this work.

All conditions showed the formation of conformal cracks which began at load values (4-10 N) and developed until the detachment and separation of the coating from the substrate, as shown in Figure 9.

3.5. Cell viability

Few differences were observed between 100%, 80-20 and 60-40 in viability tests. Results (Figure 10) for case B (80-20) samples show osteoblast distribution over the entire sample surface. The shape of the living cells cytoplasm, as well as the marked points of the dead nuclei were visible. Live cell distribution increased exponentially with time, which is a sign of the correct adhesion and proliferation of cells on the studied surfaces, and after 14 days of culture, a confluence disposition is detected, whereas osteoblast mortality is low.

The results of this viability test are an example of the excellent biological behaviour of these 80-20 coatings, and can be taken as an advance of the complete biological study, that will soon be published.

4. Conclusion

HAp coatings, which are widely employed for osseointegration purposes as coatings in joint implants, lack the desired mechanical properties. Some percentages of TiO₂ were added to HAp to study the differences induced, in order to improve mechanical behavior. The presence of TiO₂ was found to improve both adherence and fracture toughness regardless of the respective amount. However, in the scratch test, the amount of TiO₂ was shown to be important. There is a compromise between the addition of a second phase to the HAp matrix that induced barriers to crack propagation, and the fact that this second phase is brittle and facilitated crack propagation within TiO₂ zones. For example, 20wt% of TiO₂ effectively increased the critical load for detaching, but 40wt% of TiO₂ was excessive and decreased this value. Therefore, 80wt%HAp-20wt%TiO₂ coatings (case D, with better mechanical properties than A, B and C) appeared to be a better alternative to traditional HAp coatings. Preliminary viability studies are an indicator of the excellent biological behavior of the 80-20 coatings, but future detailed in vitro studies will soon be published to complete the biological characterization of these coatings.

5. References

[1] J.A.N. Shepperd, H. Arthrop, J. Bone Joint Surg.-Br. Vol. 87-B (2005) 1046-1049

- [2] M.S. Block, J.N. Kent, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 42 (1984) 793-796
- [3] E. Charrière et al., *Biomaterials* 22 (2001) 2937-2945
- [4] K. De Groot, R. Geesink, C.P. Klein, *J. Biomed. Mater. Res. Part B.* 21 (1987) 1375-1381
- [5] A.V. Lombardi et al., *J. Bone Joint Surg.-Am.* Vol. 71-A (1989) 1337-1342
- [6] J.P. Collier et al., *J. Arthroplast.* 8 (1993) 389-393
- [7] J.E. Fleming, C.N. Cornell, G.F. Muschler, *Orthop. Clin. North Am.* 31 (2000) 357-374
- [8] E.W. Morscher, A. Hefti, U. Aebi, *J. Bone Joint Surg.-Br.* Vol. 80-B (1998) 267-272
- [9] K. Balani et al., *Biomaterials* 28 (2007) 618-624
- [10] K. Balani et al., *Acta Biomater.* 3 (2007) 944-951
- [11] M.F. Morks et al., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 1 (2008) 105-111
- [12] M.F. Morks, N.F. Fahim, A. Kobayashi, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 3426-3433
- [13] R. Tomaszek et al., *Surf. Coat. Technol.* 201 (2007) 7432-7440
- [14] M. Gaona, R.S. Lima, B.R. Marple, *Mater. Sci. Eng. A-Struct. Mater. Prop. Microstruct. Process.* 458 (2007) 141-149
- [15] S. Maeno et al., *Biomaterials* 26 (2005) 4847-4855
- [16] G.Y. Jung, Y.J. Park, J.S. Han, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 1649-1654
- [17] A.R. Boccaccini et al., *J. Composites Part A* 36 (2005) 721-727
- [18] R.B. Heimann, *Engineering Mineralogy of ceramic materials*, Proceeding Workshop 8-11 June 2001, Siena
- [19] ASTM Standard C633-01 (2008). Standard test method for adhesion or cohesion strength of thermal spray coatings.
- [20] B.R. Lawn, A.G. Evans, D.B. Marshall, *J. Am. Ceram. Soc.* 63 (1980) 574-581
- [21] G.R. Anstis et al., *J. Am. Ceram. Soc.* 64 (1981) 533-538
- [22] J.J. Kruzic et al., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2 (2009) 384-395
- [23] P.F. Becher et al., *Acta Mater.* 44 (1996) 3881-3893
- [24] ASTM Standard C1624-05 (2010). Standard test method for Adhesion Strength and Mechanical Failure modes of Ceramic Coatings by Quantitative Single Point Scratch Testing.
- [25] M. Nacher et al., *Bone Miner.* 26 (1994) 231-243
- [26] J. Fernández, M. Gaona, J.M. Guilemany, *J. Therm. Spray Technol.* 16 (2007) 220-228

- [27] M. Gaona, Recubrimientos biocompatibles obtenidos por Proyección Térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. PhD Thesis, Universitat de Barcelona, 2007
- [28] A. Ferrer et al., *Adv. Mater. Forum* V 636-637 (2010) 82-88
- [29] FDA. Calcium phosphate (Ca-P) coating draft guidance for preparation of FDA submissions for orthopedic and dental endosseous implants. Food and Drug Administration, 1992. p 1–14
- [30] H. Li, K.A. Khor, P. Cheang, *Biomaterials* 23 (2002) 85-91
- [31] D.S. Metsger, M.R. Rieger, D.W. Foreman, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 10 (1999) 9-17
- [32] C.B. Carter, M.G. Norton, *Ceramic Materials: Science and Engineering*. Springer, New York, 2007
- [33] S. Saber-Samandari, K.A. Gross, *Acta Biomater.* 7 (2011) 4235-4241
- [34] J.B. Wachtman, W.R. Cannon, M.J. Matthewson, *Mechanical properties of Ceramics*. Wiley, New Jersey, 2009
- [35] D.J. Green, *An introduction to the mechanical properties of ceramics*. Cambridge University Press, Cambridge, 1998
- [36] M.A. Lopes, F.J. Monteiro, J.D. Santos, *Biomaterials* 20 (1999) 2085-2090
- [37] M.A. Lopes et al., *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 39 (1998) 244-251
- [38] H. Melero, J. Fernández, S. Dosta, J.M. Guilemany, *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.* 50 (2011) 59-64

Anexo 3

Artículo publicado en la revista *Wear*, con el título "Tribological characterization of biocompatible HAp-TiO₂ coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray".



Tribological characterization of biocompatible HAp-TiO₂ coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray



H. Melero^{a,*}, M. Torrell^a, J. Fernández^a, J.R. Gomes^b, J.M. Guilemany^a

^a Thermal Spray Centre, Universitat de Barcelona, Martí i Franqués, 1, 08028 Barcelona, Spain

^b Centre for Mechanical and Materials Technologies (CT2M) and Department of Mechanical Engineering, Universidade do Minho, Campus de Azurém, 4800-058 Guimarães, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2013

Received in revised form

13 May 2013

Accepted 27 May 2013

Available online 2 June 2013

Keywords:

Ceramics

Thermal spray coatings

Biotribology

Wear testing

ABSTRACT

Bioceramic coatings have been employed for many years to improve the biological, and consequently the mechanical, properties of bone implants. However, only a few studies have focused on wear behavior, which has been considered of secondary importance compared to other properties. The present study demonstrates that contrary to this assumption, it is important to guarantee the integrity of the coatings during and after implantation, a process that subjects the surface to high wear. Reciprocating ball-on-flat tests were performed to characterize the wear properties of HAp-TiO₂ coatings, which have previously been shown to present other good mechanical and biological properties. An alumina ball was used as counterface and the tests were conducted at 37 °C immersed in Hank's solution, to simulate physiological conditions. Three loads were employed: 5 N, 10 N and 15 N. The results show a clear advantage of more compact coatings, with a lower percentage of amorphous phases, since they present a higher friction coefficient. That could indicate, according to the literature, better implant fixation and a lower wear rate, and thus ensure the integrity of the coating.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bioactive and biocompatible coatings have been employed for many years to improve the biological behavior of bone prostheses (dental, hip and shoulder implants, etc.) [1]. The requirements of such coatings include good cell behavior on their surface and optimal mechanical behavior [2,3], in order to guarantee the stability of the coating under physiological conditions. The most commonly evaluated properties are adherence (using the bond strength test or scratch test) [1], shear strength [4] and fracture toughness [5], whereas other properties, such as the wear behavior of coatings, receive less attention. Although there are many studies of the tribological behavior of joint coatings at the wear surface of the joint [6,7], there are very few which report these kinds of test for bone-implant interface coatings, and the majority of these focus on fretting, i.e. micro-movements of the device with respect to the bone due to differences in the elastic response of the two materials [8,9]. However, coatings are subjected to considerable wear from the time the implant is placed into the bone until it is completely stabilized [10]. Following implantation, coating debris may be present between the coating itself and the surrounding bone tissue [10]. Although some studies have

reported that these particles are innocuous and even improve mechanical interlocking and fixation [11], other studies have concluded that this debris could interfere in osseointegration [12]. In fact, any lack of coating integrity that may arise could provoke contact between the bone and metallic substrate and the consequent migration of metallic ions [13] and loss of direct bonding between tissue and implant [14].

The most extensively employed materials – industrially at least – to produce biocompatible coatings are ceramics; usually hydroxyapatite and normally obtained by plasma-spraying [1]. Hydroxyapatite presents good biocompatibility because of its similitude to bone [15], but it lacks good mechanical properties [16]. Specifically, and according to studies conducted on the tribological behavior of hydroxyapatite, it is evident that it is very susceptible to wear [8]. In recent years, many options have been considered to improve the mechanical behavior of hydroxyapatite coatings. Examples include the use of interlayers between substrate and coating [17], heat treatments [18] or its combination with other compounds such as carbon nanotubes [19] or ceramics (SiO₂ for instance) [20].

In this study, two approaches are employed to obtain biomedical coatings and to study their wear behavior. One of them is to mix hydroxyapatite powder with titania powder, which shows better mechanical properties in general and better wear behavior in particular. The other consists of substituting plasma-spraying by high-velocity oxy-fuel (HVOF) spraying. Both options have been

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 13 25; fax: +34 93 402 16 38.
E-mail addresses: hmelero@cptub.eu, hortensia_melero@yahoo.es (H. Melero).

shown to have a positive influence on mechanical behavior in general [20]. The goal of this study, however, is to evaluate the influence of the two approaches on tribological behavior, in order to ensure that the coating behaves correctly and detect possible negative consequences.

2. Experimental method

2.1. Coatings obtention and characterization

The raw material was a mechanical mixture of TiO₂ (rutile) powder (20 wt%), supplied by Sulzer-Metco, and hydroxyapatite powder (80 wt%), obtained from Plasma-Biotol Ltd. The mixture was thermal-sprayed onto a previously grit-blasted Ti6Al4V substrate using a Sulzer-Metco DJH 2600 HVOF system. Powder characterization was as reported elsewhere [20].

Four sets of conditions, detailed in Table 1, were considered: T₀V₀, T₀V₁, T₁V₀ and T₁V₁, where *T* is the theoretical temperature of the beam the particles travel in and *V* is their velocity; and where 0 corresponds to a lower level and 1 to a higher level of either parameter.

The cross-section of the coating was analyzed by scanning electron microscopy, with a JEOL JSM-5310 apparatus, after being cut, grinded, polished and sputtered. Thickness and porosity were calculated from the obtained micrographs using the Matrox Inspector software. Hardness was measured using a Vickers indenter with a Matsuzawa MXT-CX microhardness tester at 300 gf.

The crystalline phases of the coating were analyzed by X-ray diffraction with a Siemens D500 X-ray diffraction Bragg-Brentano type $\theta/2\theta$ apparatus, using CuK $_{\alpha 1+2}$ radiation with $\alpha_1 = 1.54060$ and $\alpha_2 = 1.54443$ at 40 kV and 30 mA. Rietveld calculations were also made with scraped off coatings after conducting another slower measurement, adding 30% by weight of Al₂O₃ as standard mixed with the coating.

2.2. Tribological tests

Reciprocating ball-on-flat tests were performed with a Plint TE67/R tribometer (Phoenix Tribology Ltd., UK) in accordance with the standard ASTM G133-05(2010), employing at least two different samples and conducting four different assays per load and set of conditions. The duration of the sliding test was 1 h; long enough to reach a stable friction coefficient regime. A 10 mm diameter alumina ball was used as counterface, and all the tests were performed under physiological conditions (immersed in Hank's solution at 37 °C). The frequency of the reciprocating motion of the flat sample and the stroke length were fixed for all tests at 1 Hz and 12 mm, respectively. In addition to the friction coefficient, the wear coefficient was calculated. According to the wear coefficient definition [21], *k* (mm³/N m) is defined by Eq. (1):

$$K = V/S.P \quad (1)$$

Table 1
Spraying conditions.

| | 80%HAp–20%TiO ₂ | | | |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | T ₀ V ₀ | T ₀ V ₁ | T ₁ V ₀ | T ₁ V ₁ |
| O ₂ (l/min) | 253 | 240 | 278 | 265 |
| Propylene (l/min) | 81 | | | |
| Compressed air (l/min) | 203 | 264 | 203 | 264 |
| Oxygen/propylene | 3.65 | 3.65 | 3.96 | 3.96 |
| Number of layers | 5 | | | |
| Distance (mm) | 220 | 200 | 240 | 200 |

where *V* corresponds to volume loss in mm³ (obtained by confocal microscopy, see Section 2.3.1.), *S* to the total sliding distance (43.2 m) and *P* to the normal applied load (N).

2.3. Track observation

2.3.1. Confocal microscopy

After the different assays, the samples were observed using a confocal technique with a Leica DCM3D microscope, in order to evaluate volume loss during sliding as a measure of the wear resistance of the coating.

2.3.2. SEM observation

In order to analyze the surface of the track and determine whether the remaining surface had been damaged, as well as to identify the dominant wear mechanisms, the samples were gold-sputtered to make them conductive, then observed using a JEOL JSM-5310 scanning electron microscope.

3. Results and discussion

3.1. Phase identification

The XRD results listed in Table 2, as well as the representative XRD spectrum shown in Fig. 1 (case T₁V₁, the differences between the four cases are not evident visually) show that the main crystalline phases of the coatings are the initial ones: hydroxyapatite and rutile. The anatase and α -TCP phases appeared in smaller amounts (not indicated in the figure to avoid confusion). The amounts of amorphous phase were identified via Rietveld calculations (Table 2), thereby determining that the largest amount appeared under the T₁V₀ condition, followed by T₀V₀ and T₀V₁, with T₁V₁ presenting the lowest quantity of amorphous phase. This relation between the amounts of amorphous phase in each of the cases is given by the respective residence times of the particle and the beam temperature. T₁V₀ presents the highest percentage of amorphous phase due to its highest residence time and highest beam temperature, followed by T₀V₀, which has the second longest particle residence time. T₀V₁ and T₁V₁ have the lowest residence times – lower for T₁V₁ than for T₀V₁ – and hence the lowest percentages of amorphous phase.

3.2. Microstructural analysis

Analysis of the microstructure is essential to gaining an understanding of the wear mechanism of the material. SEM micrographs can be observed in Fig. 2, and the thicknesses values in Table 3 allow comparison between cases, since no significant differences capable of influencing wear behavior were found by ANOVA for this value.

Mere observation of the cross section of the coatings shows T₁V₁ to be the case with the most compact and homogeneous structure, with a very low porosity and almost no detectable cracks. The highest hardness value of this case is easily explained by its lowest amount of amorphous phase and the lowest porosity. In contrast, the T₀V₀ case presents the most porous and heterogeneous cross section of the four, with the lowest hardness,

Table 2
XRD results. Quantification of the phases present.

| | HAp (%) | Rutile (%) | Anatase (%) | α -TCP (%) | Amorphous+not considered |
|-------------------------------|---------|------------|-------------|-------------------|--------------------------|
| T ₀ V ₀ | 49.2 | 9.8 | 1.3 | 11.2 | 28.5 |
| T ₀ V ₁ | 48.9 | 10.4 | 1.2 | 16.7 | 22.8 |
| T ₁ V ₀ | 44.8 | 8.7 | 1.3 | 10.9 | 34.3 |
| T ₁ V ₁ | 53.4 | 10.7 | 1.5 | 20.3 | 14.1 |

probably due to the highest porosity and an important amount of amorphous phase. The other two cases, T_0V_1 and T_1V_0 , are microstructurally very similar. The latter has (visually) slightly higher porosity and presence of cracks, especially in the upper layers, as well as a larger amorphous phase content, which explains its lower hardness value. T_1V_0 is slightly harder than T_0V_0 , although it presents a higher content of amorphous phase, due to the influence of porosity.

3.3. Friction coefficient

Sliding tests show a steady-state friction regime within 15 min of the beginning of the test (Fig. 3).

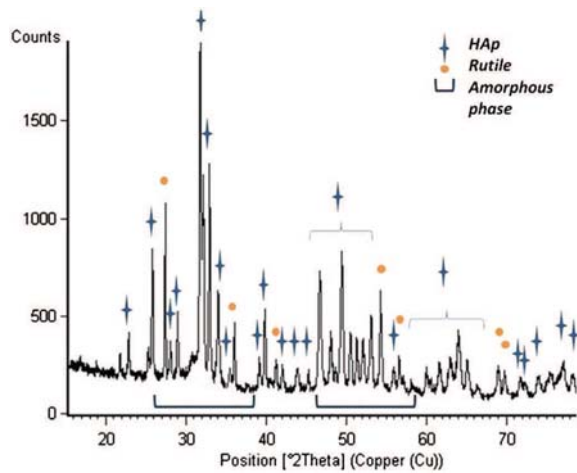


Fig. 1. XRD spectrum of T1V1 case.

Very few studies have focused on the wear behavior of hydroxyapatite coatings, and most of them have concentrated on fretting behavior [8,9], articular coatings [22] or enamel-simulated coatings [23]. Only one paper was found which reports the behavior of hydroxyapatite coatings at the moment of implantation [10], and this emphasized the role of roughness in wear behavior. In the present study, no significant differences were found between the surface roughness values of the four conditions studied ($R_a \approx 3\text{--}4 \mu\text{m}$), and since the friction coefficient becomes stationary after a few minutes, it was considered more useful to study the differences between the average friction coefficient values in the steady-state regime, as these would produce the most significant results for characterizing the frictional response of the coatings. The general trend of the friction coefficient is a decrease as the normal load increases. This is especially pronounced between 5 N and 10 N, possibly due to the high influence, at these low loads, of the initial surface roughness of the coating. In addition, the progressive decrease in the friction coefficient may be influenced by the increase in temperature with load [24,25], which could facilitate sliding and diminish friction. Between 10 N and 15 N, the decrease is not significant, and it can be concluded that once a critical load is exceeded, the initial surface roughness and the increase of the interface temperature have no significant influence, and the average steady-state friction coefficient remains constant.

Table 3
Microstructural analysis of the cases and hardness values.

| | Thickness (μm) | Porosity (%) | Presence of cracks | Vickers hardness (Hv_{300}) |
|----------|-----------------------------|--------------|------------------------|--|
| T_0V_0 | 117 ± 7 | 8–12 | Overlapped by porosity | 310 ± 37 |
| T_0V_1 | 110 ± 8 | 5–8 | Detectable | 358 ± 26 |
| T_1V_0 | 117 ± 9 | 5–8 | Detectable | 334 ± 33 |
| T_1V_1 | 122 ± 15 | < 5 | Undetectable | 364 ± 21 |

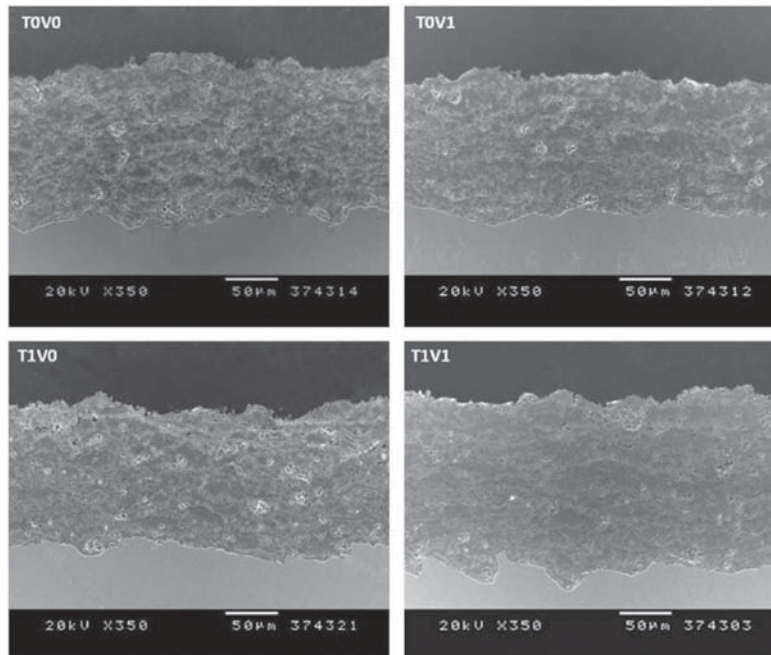


Fig. 2. Cross-section of the four studied cases.

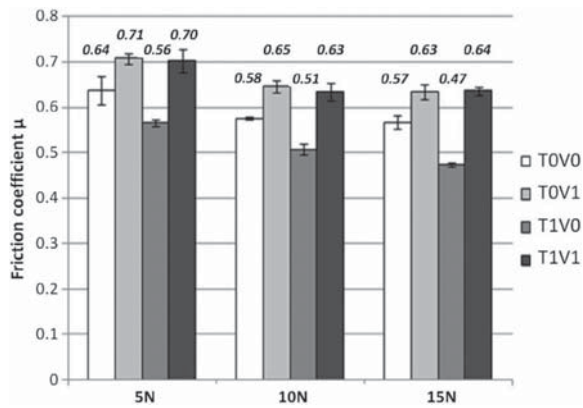


Fig. 3. Friction coefficient measure.

When the differences between conditions were analyzed, T_0V_1 and T_1V_1 presented the highest friction coefficients, whereas T_1V_0 had the lowest friction coefficient and T_0V_0 an intermediate value. As the differences between surface roughness values of the different samples were not significant, and samples no longer present initial surface roughness after running-in, the results are interpreted as being a consequence of the microstructure and composition of each case. T_0V_1 and especially T_1V_1 present the most compact microstructure and the highest hardness values, which could interfere with the easy sliding of the ball on the surface. In contrast, T_0V_0 presents the worst microstructure of the four. The presence of cracks and pores gives a general lower hardness, and, as a consequence, a lower resistance to the ball sliding. T_1V_0 presents a microstructure similar to that of T_0V_1 (see Section 3.2.), but its hardness value is lower, which could explain its intermediate behavior. Furthermore, according to Rietveld calculations, T_1V_1 and T_0V_1 present the lowest percentages of amorphous phase, whereas T_1V_0 and T_0V_0 present the highest percentages of amorphous phase. This could be related to hardness values and friction coefficients by the fact that the crystalline phase, which is mechanically more resistant than the amorphous phase, endows the system with wear resistance and has a stronger interaction with the alumina ball, a higher energy dissipation due to friction and, as a consequence, a higher friction coefficient. In fact, the literature corroborates the assertion that crystalline areas are the main contributors to insertion forces and the resulting abrasion, whereas smooth areas are easily pulled off during abrasion [10]. Consequently, the T_1V_0 condition, with a higher percentage of amorphous phase, presents a lower resistance to the sliding of the ball and a lower friction coefficient, while in contrast, the more crystalline conditions, T_0V_1 and T_1V_1 , show higher friction coefficients. As mentioned above, T_0V_0 has an intermediate amount of amorphous phase and an intermediate friction coefficient. According to the literature [26], a higher friction coefficient can facilitate the fixation of the implant once sited in its location together with providing the stability necessary for bone growth; thus it can be concluded that in this respect, higher friction coefficients are preferable. However, the friction response studied corresponds to the dynamic friction coefficients values, and other studies are required to determine static friction coefficients, which are indicative of fixation under static conditions, in order to corroborate the behavior reported in this work.

3.4. Wear coefficient and track observation

Fig. 4 shows the wear coefficient results for each condition and load.

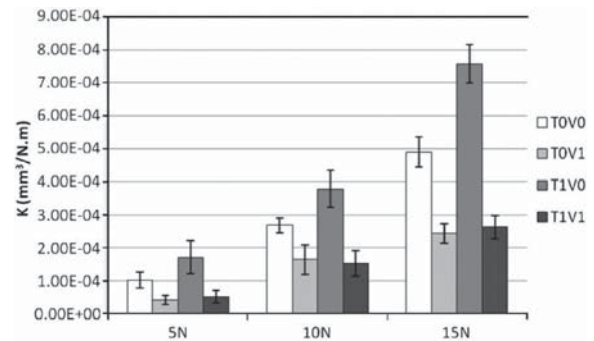


Fig. 4. Wear coefficient for each condition and load.

Increased wear volume with load – one of the basic laws of wear, because a greater normal load implies more contact stress and a subsequent increased loss of volume [21] – is observed. An analysis of the differences between the conditions shows that for the three normal loads, the highest wear volume is obtained for the T_1V_0 case, followed by the T_0V_0 case, while lower volumes are obtained for the T_1V_1 and T_0V_1 cases. Relating this behavior to microstructure and the phases present in the coatings, it is possible to conclude that the condition with the highest percentage of amorphous phase and a medium microstructure, and a consequent lower hardness (T_1V_0) presents the highest wear volume; while lower wear volumes are obtained for the conditions with high compaction, lower porosity and crack presence, less amorphous phase and consequently superior hardness (T_1V_1 and T_0V_1). This can be explained by the same reason given for the friction coefficients. Pores and cracks facilitate the loss of coating with ball sliding, while amorphous phase has lower mechanical resistance and wears easily as a result of interaction with the alumina ball. Therefore, the cases with pores, cracks or/and an important amount of amorphous phase (T_0V_0 , T_1V_0) have a lower hardness, and a greater volume is lost with the sliding of the ball, even with a lower friction coefficient. In contrast, the cases with a more compact and homogeneous microstructure, without so many pores or cracks, or/and a lower amount of amorphous phase (T_1V_1 , T_0V_1), present higher hardness values, and a lower wear rate but a higher friction coefficient.

For biomedical purposes, it is important to avoid damage to the coating during implantation, in order to maintain functionality [12]. Thus, a lower wear volume is preferable, since this will ensure a better condition of the coating. The fact that lower wear volumes are obtained for the conditions which present higher friction coefficients indicates that these conditions would be better for this use.

As the contact pressure changes, it is to be expected that the main wear mechanisms change, which is coherent with an increase in the wear coefficient, observed in Fig. 4. According to the literature, this is indeed what is frequently found [21], corroborating the idea that “wear is accelerated with load”, but always accompanied by an increase in the action of wear mechanisms and the intervention of new ones. SEM analysis of the surfaces enables these mechanisms to be studied. The first observation is that the ball counterface shows no signs of wear and no alumina debris has been found at the extremities of the track, where it would have accumulated. The differences identified through surface observation between the four conditions are not significant, but differences between loads are more pronounced. For all the loads, the track tends to present zones with pulling out or delamination, and the incidence of these zones is more frequent at higher loads. Other studies have also corroborated the

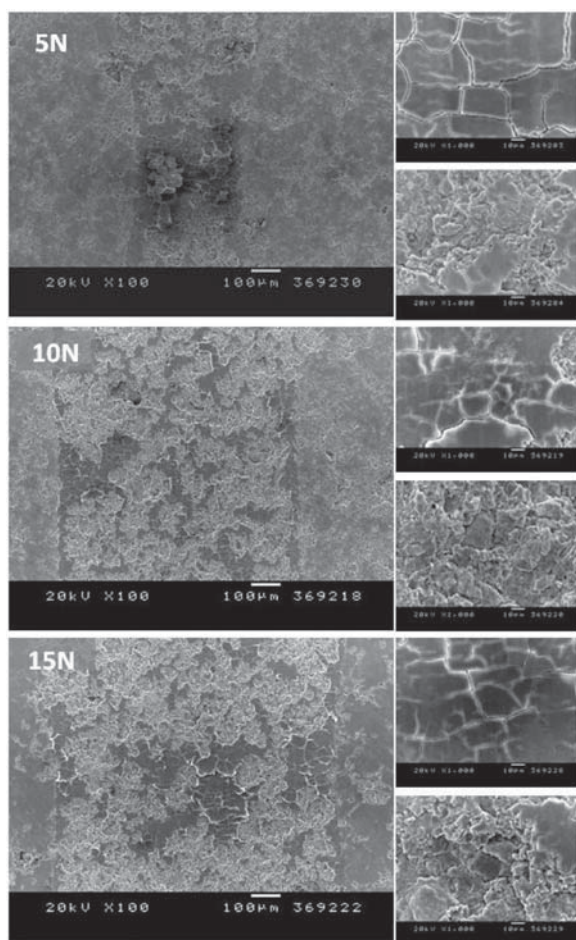


Fig. 5. SEM micrographs of the wear track at 5, 10 and 15 N. Details of the micro-crack zone and the delamination zone for each load.

occurrence of delamination for HAp subjected to wear, due to a small-scale fracture process which frequently occurs during abrasive wear of brittle polycrystalline materials [27,28]. However, at lower loads, zones with cracks appear (derived from fatigue behavior) and there is no evidence of delamination. This behavior was expected in general terms, because a higher load implies more energy to induce the occurrence of other wear mechanisms, such as three-body abrasion – with coating debris, for example – which causes delamination and pulling out, in addition to the fatigue – and cracking – of the surface that occurs with lower loads. The increase in the wear coefficient can also be explained by the micrographs in Fig. 5, since higher loads promote delamination over fatigue cracks. Other Refs. [27], however, find that both zones (cracks and delamination) are in fact a transfer layer of coating debris with different structures for high and low loads.

As can be seen in Fig. 5, the damage to the track caused by higher loads induces an increase in surface roughness, which could lead to an increase in the friction coefficient. However, in accordance with the previous results, it has been shown that that is not the case. This may be due to different causes: First, the differences between the loads are noticeable but not exaggerated, as both wear mechanisms appear in all conditions; second, the influence of load may be overshadowed by the influence of an

increase in temperature, as mentioned in the friction coefficient section. A possible hole-filling action of coating debris may be proposed as alternative explanation, since according to reports on similar materials, a transfer layer composed of compacted wear debris is produced [27]. Another possibility is the influence of the Hanks solution [10]. It is possible that the presence of this solution softens some areas of the coating, dissolving material and facilitating pulling out – and volume loss – without an increase in the friction coefficient. This dissolution process, called wash-out, has been observed to provoke a loss of 7% of total weight for a 65% crystalline coating after one hour of immersion [10]. The SEM images do not show evidence of this dissolution process, but this could be considered logical given that dissolution wear is a continuous process.

4. Conclusions

The friction and wear behavior of bioactive coatings in contact with bone have not been widely studied, but are important in order to ensure good performance and integrity of the coating once implanted, and satisfactory bone fixation. Performing reciprocating ball-on-flat tests on these HAp-TiO₂ coatings is a good first step to evaluate their friction and wear response. Surface studies reveal a fatigue mechanism in certain zones of the track (presence of cracks), but an abrasion mechanism is also present that intensifies at higher loads. The results show a higher friction coefficient together with a lower volume loss and wear coefficient for the conditions with fewer imperfections, a lower percentage of amorphous phase and increased hardness, which would be therefore the preferable conditions. Further research is required to complete wear studies of these coatings, using highly accurate simulations of implantation and subsequent quasi-static conditions.

References

- [1] K. De Groot, R. Geesink, C.P. Klein, P. Serekian, Plasma-sprayed coatings of hydroxylapatite, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 21 (1987) 1375–1381.
- [2] H.P. Cook, Immediate reconstruction of the mandible by metallic implant following resection for neoplasm, *Annals of The Royal College of Surgeons of England* 42 (1968) 233–259.
- [3] T. Albrektsson, P.I. Brånemark, H.A. Hansson, J. Lindström, Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man, *Acta Orthopaedica* 52 (1981) 155–170.
- [4] R.Y. Whitehead, W.R. Laceyfield, L.C. Lucas, Structure and integrity of a plasma sprayed hydroxylapatite coating on titanium, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 27 (1993) 1501–1507.
- [5] M.J. Filiaggi, N.A. Coombs, R.M. Pilliar, Characterization of the interface in the plasma-sprayed HA coating/Ti-6Al-4V implant system, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 25 (1991) 1211–1229.
- [6] V.-M. Tiainen, Amorphous carbon as a bio-mechanical coating – mechanical properties and biological applications, *Diamond and Related Materials* 10 (2001) 153–160.
- [7] M.T. Raimondi, R. Pietrabissa, The in-vivo wear performance of prosthetic femoral heads with titanium nitride coating, *Biomaterials* 21 (2000) 907–913.
- [8] Y. Fu, A.W. Batchelor, Y. Wang, K.A. Khor, Fretting wear behaviors of thermal sprayed hydroxyapatite (HA) coating under unlubricated conditions, *Wear* 217 (1998) 132–139.
- [9] Y. Fu, A.W. Batchelor, K.A. Khor, Fretting wear behavior of thermal sprayed hydroxyapatite coating lubricated with bovine albumin, *Wear* 230 (1999) 98–102.
- [10] K.A. Gross, M. Babovic, Influence of abrasion on the surface characteristics of thermally sprayed hydroxyapatite coatings, *Biomaterials* 23 (2002) 4731–4737.
- [11] J.T. Edwards, J.B. Brunski, H.W. Higuchi, Mechanical and morphologic investigation of the tensile strength of a bone-hydroxyapatite interface, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 36 (1997) 454–468.
- [12] I. Önsten, A.S. Carlsson, L. Sanzén, J. Besjakov, Migration and wear of a hydroxyapatite-coated hip prosthesis, *Journal of Bone and Joint Surgery—British* 78-B (1996) 85–91.
- [13] K. Merritt, S.A. Brown, Metal sensitivity reactions to orthopedic implants, *International Journal of Dermatology* 20 (1981) 89–94.
- [14] T.-J. Oh, J. Yoon, C.E. Misch, H.L. Wang, The causes of early implant bone loss: myth or science? *Journal of Periodontology* 73 (2002) 322–333.

- [15] J.A.N. Shepperd, H.A. Arthorp, A contemporary snapshot of the use of hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery, *Journal of Bone and Joint Surgery—British* 87 (2005) 1046–1049.
- [16] E. Charriere, S. Terrazzoni, C. Pittet, Ph. Mordasini, M. Dutoit, J. Lemaitre, Ph. Zysset, Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements, *Biomaterials* 22 (2001) 2937–2945.
- [17] L. Gengembre, J. Laurens, L. Pawlowski, R. Tomasek, A. Le Maguer, Microstructure of suspension plasma sprayed multilayer coatings of hydroxyapatite and titanium oxide, *Surface and Coatings Technology* 201 (2007) 7432–7440.
- [18] X. Yang, B. Zhang, J. Lu, J. Chen, X. Zhang, Z. Gu, Biomimetic Ca-P coating on pre-calcified Ti plates by electrodeposition method, *Applied Surface Science* 256 (2010) 2700–2704.
- [19] K. Balani, Y. Chen, S.P. Harimkar, N.B. Dahotre, A. Agarwal, Tribological behavior of plasma-sprayed carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite coating in physiological solution, *Acta Biomater.* 3 (2007) 944–951.
- [20] H. Melero, J. Fernández, S. Dosta, J.M. Guilemany, Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad, *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 50 (2011) 59–64.
- [21] G.W. Stachowiak, A.W. Batchelor, *Engineering Tribology*, Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford, 2005.
- [22] M. Younesi, M.E. Bahrololoom, Optimizations of wear resistance and toughness of hydroxyapatite nickel free stainless steel new bio-composites for using in total joint replacement, *Materials & Design* 31 (2010) 234–243.
- [23] H.M. Rootare, J.M. Powers, R.G. Craig, Sintered hydroxyapatite ceramic for wear studies, *Journal of Dental Research* 57 (1978) 777–783.
- [24] N.P. Suh, An overview of the delamination theory of wear, *Wear* 44 (1977) 1–16.
- [25] S. Bahadur, The development of transfer layers and their role in polymer tribology, *Wear* 245 (2000) 92–99.
- [26] J.D. Bobyn, K.K. Toh, S.A. Hacking, M. Tanze, J.J. Krygier, Tissue response to porous tantalum acetabular cups. A canine model, *Journal of Arthroplasty* 14 (1999) 347–354.
- [27] M. Kalin, S. Jahanmir, L.K. Ives, Effect of counterface roughness on abrasive wear of hydroxyapatite, *Wear* 252 (9–10) (2002) 679–685.
- [28] H.H.K. Xu, S. Jahanmir, Microfracture and material removal in scratching of alumina, *Journal of Materials Science* 30 (9) (1995) 2235–2247.

Anexo 4

Artículo enviado a la revista Journal of Applied Electrochemistry, con el título “Corrosion resistance evaluation of HVOF-sprayed bioceramic coatings under simulated physiological conditions”.

Equivalencias nomenclatura artículo-tesis:

Tablas

| | |
|---|---------|
| 1 | VIII.4. |
| 2 | IX.1. |
| 3 | IX.2. |
| 4 | IX.3. |

Figuras

| | |
|----|-------|
| 1 | IX.1. |
| 2 | IX.2. |
| 3 | IX.2. |
| 4 | IX.3. |
| 5 | IX.4. |
| 6 | IX.5. |
| 7 | IX.6. |
| 8 | IX.7. |
| 9 | IX.8. |
| 10 | IX.9. |

Journal of Applied Electrochemistry
Corrosion resistance evaluation of HVOF-sprayed bioceramic coatings under simulated physiological conditions
 --Manuscript Draft--

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | Corrosion resistance evaluation of HVOF-sprayed bioceramic coatings under simulated physiological conditions |
| Article Type: | Manuscript |
| Keywords: | bioceramic; HVOF; impedance; cyclic polarization; open circuit; physiological conditions |
| Corresponding Author: | Hortensia Melero Barcelona, SPAIN |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Hortensia Melero |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Hortensia Melero R T Sakai P H Suegama Claudia Vignatti Assis Vicente Benedetti Javier Fernández Josep Maria Guilemany |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Abstract: | The electrochemical behavior of HVOF-sprayed bioceramic coatings (HAp and HAp-TiO ₂ compared to metallic TiAlV substrates) was investigated using open circuit potential measurements, cyclic polarization (CP) curves and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in natural aerated Hank's solution for 30 days. All samples presented some open circuit potential oscillations, which were associated to the porous nature of the coating that allows the electrolyte reaches the substrate causing pitting formation with activation - repassivation at the bottom of the pores. The polarization studies indicated that the HA-TiO ₂ coating (80-20 sample) was the only one that showed a clear passive region from around -0.4 V to 0 V in the presence and absence of BSA, indicating the beneficial influence of the addition of TiO ₂ to the HA coating stability. The impedance data were interpreted based on the presence of a metallic oxide layer between the HA or AH-TiO ₂ coating which are attacked and / or dissolved by the Hank's solution with significant influence of the bovine serum albumin (BSA) when it is present in the electrolyte solution. Equivalent electrical circuits (EECs) with two or three time constants were used to fit the experimental data. Our results indicated that BSA in Hank's solution diminishes the stability of the metallic oxide layer present on the Ti-based alloy and accelerates the hydroxyapatites dissolution due to its chelating ability. |
| Suggested Reviewers: | Chi Tat Kwok University of Macau fstck@umac.mo Related field |

| | |
|--|--|
| | <p>Hicham Benhayoune Université de Reims Champagne-Ardenne hicham.benhayoune@univ-reims.fr Related field</p> |
| | <p>Mario Barbosa University of Porto mbarbosa@ineb.up.pt Related field</p> |
| | <p>Carmel Breslin National University of Maynooth carmel.breslin@nuim.ie Related field</p> |
| | <p>Julia Claudia Mirza Rosca Universidad de las Palmas de Gran Canaria jmirza@dim.ulpgc.es Related field</p> |

*Manuscript

[Click here to download Manuscript: Corrosion resistance evaluation of HVOF-sprayed bioceramic coatings under simulated physiologi](#)

Corrosion resistance evaluation of HVOF-sprayed bioceramic coatings under simulated physiological conditions

H. Melero^{1*}, R. T. Sakai², P. H. Suegama², C. Vignatti¹, A. V. Benedetti³, J. Fernández¹, J.M. Guilemany¹

¹Thermal Spray Centre, CPT, University of Barcelona. Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona, Spain

²Departamento de Química, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, CEP 79.825-070, Brazil

³Instituto de Química, Univ. Estadual Paulista-UNESP, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

Abstract

The electrochemical behavior of HVOF-sprayed bioceramic coatings (HAp and HAp-TiO₂ compared to metallic TiAlV substrates) was investigated using open circuit potential measurements, cyclic polarization (CP) curves and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in natural aerated Hank's solution for 30 days. All samples presented some open circuit potential oscillations, which were associated to the porous nature of the coating that allows the electrolyte reaches the substrate causing pitting formation with activation – repassivation at the bottom of the pores. The polarization studies indicated that the HA-TiO₂ coating (80-20 sample) was the only one that showed a clear passive region from around -0.4 V to 0 V in the presence and absence of BSA, indicating the beneficial influence of the addition of TiO₂ to the HA coating stability. The impedance data were interpreted based on the presence of a metallic oxide layer between the HA or AH-TiO₂ coating which are attacked and / or dissolved by the Hank's solution with significant influence of the bovine serum albumin (BSA) when it is present in the electrolyte solution. Equivalent electrical circuits (EECs) with two or three time constants were used to fit the experimental data. Our results indicated that BSA in Hank's solution diminishes the stability of the metallic oxide layer present on the Ti-based alloy and accelerates the hydroxyapatites dissolution due to its chelating ability.

*Corresponding author

1. Introduction

During the XXth century, one of the main concerns in medicine has been the deterioration of articular joints in old people, as a consequence of aging phenomenon. Metals were chosen as bone replacement materials because of their higher mechanical properties. However, other properties, such as biocompatibility and corrosion resistance in body fluids, are an important issue too [1]. Actually, these two properties are related: corrosion damage may cause an adverse reaction and avoid stability, biocompatibility and functional properties [2]. Some of the most employed metals, that combines good mechanical properties with corrosion resistance, are titanium and its alloys, especially Ti6Al4V, extensively used as medical orthodontic implants. These alloying ions may improve the corrosion stability of titanium [3], but if corrosion finally occurs, they can be incorporated in the surrounding tissue, damaging it [2,4] and inducing inflammatory, allergy, osteolysis processes or cancer [5].

Industries started to employ bioceramic coatings, concretely hydroxyapatite coatings obtained by plasma spraying, to improve biocompatibility and avoid the migration of metallic ions to the body. However, further studies showed a loss of functionality after a few days at physiological conditions, due to the dissolution of the amorphous phases derived from the thermal degradation of hydroxyapatite [4,6,7]. Its arrangement with other compounds such as carbon nanotubes, ceramic or other components, as well as the substitution of plasma spraying by other deposition techniques were deemed to overcome these limitations [8-11].

Electrochemical behavior of bioceramic coatings over metallic substrates is a main concern, to ensure that the coating maintain its functionality and keeps acting as a barrier against metallic ions over time. Many works [3-5,12,13-23] used potentiodynamic polarization, linear polarization and frequently E_{oc} measurements to rank the different HA-based coatings, and also to compare with the Ti or mainly Ti-6Al-4V alloy substrate. However, only around twenty articles in the past two years used EIS to characterize similar coatings, and only a few of them measured the impedance of these systems for times longer than 48 hours of immersion [13,18,24], which makes this technique an interesting way to be deeply explored.

This study focus on electrochemical analysis of bioceramic coatings via EIS and other traditional electrochemical techniques. The chosen material is an HAp-TiO₂ coating sprayed using high velocity oxy-fuel (HVOF) onto Ti6Al4V. The presence of TiO₂ is expected to improve both mechanical (which has been previously checked) and electrochemical performance of HAp coatings [8,25], and plasma-spraying has been substituted by HVOF to avoid massive thermal degradation of the initial powders. The HAp-TiO₂ coatings was compared to fully HAp

coatings and to the TiAlV substrate, using Hank's solution with and without the presence of bovin serum albumin (BSA).

2. Experimental procedure

Three surfaces were considered in this work. Firstly, grit-blasted TiAlV samples, with a roughness over $5\mu\text{m}$; HAp coated samples; and HAp-TiO₂ coated samples.

The initial powders were a Plasma-Biotol Ltd. Hydroxyapatite powder and a Sluzer-Metco rutile powder, and their characterization is reported elsewhere [25]. For the HAp-TiO₂ combination, the respective amounts of powder in the initial mixture were 80wt%HAp-20wt%TiO₂. Hydroxyapatite and HAp-TiO₂ mixture were sprayed onto a previously grit-blasted ($R_a \geq 5\mu\text{m}$) TiAlV substrate with a Sulzer-Metco DJH 2600 HVOF system, and the spraying conditions are listed in Table 1.

The corrosion resistance of the different surfaces was evaluated by means of electrochemical measurements carried out in an 80 mL three-electrode conventional electrochemical cell with exposing area of 0.74 cm^2 to the solution. A commercial Hanks' solution (Sigma Chemical Co. Product no. H8264, with a $\text{pH} \approx 7.4$) with and without 4.2 g L^{-1} of bovine serum albumin (BSA - Sigma Chemical Co. Product no. A3912) was used as electrolyte. An Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{3\text{mol/L}}$ electrode, connected to the working solution through a Luggin capillary, was used as reference, and a Pt network as auxiliary electrode. Open circuit potential (E_{oc} versus time), potentiodynamic polarization, cyclic polarization, and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were carried out using a potentiostat-galvanostat Irvium, model VERTEX equipped with an impedance modulus.

E_{oc} measures were recorded for 24 hours, in Hanks' solution without and with BSA, in order to reach a steady-state value and then, potentiodynamic polarizations were recorded from $-0.200\text{ V}/E_{\text{oc}}$ to $+2.0\text{ V}/E_{\text{oc}}$ at 5 mV/s . Before cyclic polarization (CP), the study solution was also put in contact with the electrode at open circuit conditions for 24 h, then the potential sweep was performed, starting the polarization scan at $-0.200\text{ V}/E_{\text{CORR}}$, and once $+2.0\text{ V}/E_{\text{CORR}}$ was reached, the direction of scanning was reversed, and it was maintained in the anodic direction until 1 V below the E_{CORR} . The employed scan rate for the entire test was 5 mV/s .

For EIS measurements the electrode was also maintained in contact with the solution for 24 h and then the impedance experiment was initiated. The EIS diagrams were acquired for immersion times up to 30 days, and performed by applying a 10 mV (rms) sinusoidal perturbation signal to the E_{OC} , from 1×10^5 to 1×10^{-3} Hz, recording 10 points per frequency decade. For quantitative analysis, EIS data were fitted using equivalent electrical circuits (EEC) by means of the Z-view[®] program. Prior to this procedure, the experimental data were validated with the Kramers–Kronig transform, and only the data included in the validated frequency range were used to perform the EEC fitting.

All electrochemical tests were conducted in triplicate in order to ensure the reproducibility of results, at 36°C.

3. Results and discussion

Open circuit potential and polarization studies

Although the majority of studies only employed short periods of open-circuit before initiating the electrochemical measurements, it has been considered more appropriate to wait for 24 hours, since the studied materials did not show a stabilization of the electrode/solution interface for shorter times of immersion. Open circuit potential *versus* time curves of the bare and coated Ti-6Al-4V alloy (HA and 80-20) samples in contact with Hanks' solution with and without BSA in solution are depicted in **Figure 1**.

Firstly, all samples presented some potential oscillations which are normally associated to pitting formation or the presence of porous film. According to literature [23], thick HA coatings showed broad potential variations, that in fact can also be observed in Figure 1, attributed to the existence of a diffusion path inside the coating, i.e. porosity [13]. Furthermore, the high number of points recorded, 1 point/s, made that events occurring in a very short time were detected (probably related to the interaction of the electrolyte with the substrate producing activation-repassivation at the bottom of the pores).

The bare electrode presents the highest E_{OC} value when BSA is absent; possibly due to the formation of an oxide layer between the grit-blasting process and the OCP measurement. The deposition of the coatings on the Ti-6Al-4V substrate shifted the E_{OC} to more active values in the following order: bare Ti-6Al-4V > 80-20 > HA. It would be expected that HA, an inert material, when applied on the substrate surface will move the E_{OC} to nobler values, as found in

many studies [4,14,16-18,23,26,27]. Two phenomena can be proposed to explain this contradiction. The first one is the dissolution of the amorphous phase that occurs in these coatings during the first 24h [25, 22], and the second one is a consequence of the previous, the porosity of the coating, growing as time goes by. When this porosity appears, the electrolyte may achieve the substrate across the coating, forming a local cell [28] that induces the latter corrosion. Also the dissolution of the amorphous phase and the subsequent porosity increase can be accelerated by a mechanism proposed by references [29], where proton is formed by a corrosion reaction of the substrate (Ti for instance) with water on the bottom of the pore; the pH decreases locally due to the fact that H^+ is almost closed at the interface due the difficulty to go away out; and in a second step the proton dissolves the HA near substrate / HA interface.

Both 80-20 and bare samples immersed in BSA presented lower values of E_{OC} than their correlates immersed in Hanks' solution. As BSA adsorbs on the coating surface it is probably that some interaction may occur and considering that, it is possible that the potential of the electrode / solution interface could decrease. Although literature finds out that BSA moves the E_{OC} to negative values due to chelating effect of the protein for HAp coatings [15], in this study HAp coatings showed nobler potential in the presence of BSA, which can be associated to an instability of the coating itself due to the previously described dissolution of the amorphous phase (lower for the 80-20 than for the HAp sample [25]), since E_{OC} and E_{CORR} values are linked to the thermodynamic stability of the coating / solution interface [16].

Figure 2 shows the potentiodynamic polarization curves, where the potential was scanned from 0.2 V/ E_{OC} to 2.0 V at 5 mV s⁻¹. The E_{CORR} values are around -0.50 ± 0.05 V for all samples, except for Ti-6Al-4V in the absence of BSA, and present the same tendency observed at open circuit with a little shifting due to the high scan rate employed [30]. The three surfaces analyzed did not present any substantial difference in the corrosion current density, with and without BSA in solution. The 80-20 sample was the only one that showed a clear passive region from around -0.4 V to 0 V in the presence and absence of BSA, indicating the beneficial influence of TiO₂ addition to the coating, as recently observed by Lee [17]. The HA sample showed a slight increase of the current density for potentials higher than E_{CORR} exhibiting no passive region, which suggests some dissolution. In the presence of BSA the current density was always higher than in its absence, indicating that BSA facilitates the attack to the coating and / or substrate due to its cited chelating ability [31]. In the case of Ti-6Al-4V with BSA, characteristic peaks of Ti oxidation are observed and the passive current is the highest measured for the studied samples. The Ti-6Al-4V surface without BSA exhibited a high corrosion potential suggesting some passivation, but the anodic current continuously increased from around 0 to 0.8 V, probably to the natural and defective oxide formed at the

activated and rough surface. Potentiodynamic polarization curves of TiO₂-coated, HA-TiO₂-coated and uncoated Ti alloys [14] showed that both coatings presented higher E_{CORR} and lower i_{CORR} than the uncoated sample (Ti-6Al-4V), which corroborates the results in this study. The presence of pores may be excellent on osteointegration, but can be a problem to fight corrosion.

Cyclic polarization curves were performed in Hanks' solution with and without BSA at 1 mV s⁻¹ (**Fig. 3**). These curves show no breakdown with a positive hysteresis, which means that no pit is formed at the electrode surface. This result agrees with the previous one obtained by Kwok *et al.* [4] by polarizing the HA-coated Ti-Al-V electrodes, fabricated by electrophoretic deposition, up to 4 V/SCE, and by Sousa and Barbosa [23] who polarized the coatings up to 3 V/SCE. The anodic branch for the different samples are similar to those shown in **Figure 2** and again sample 80-20 was the only which presented a passive region at low potential range, all the others showed a continuous increase of current density with some tendency to passive at around +1 V, with slightly lower slope in the E-log i curve. After the scan was reversed the curves showed a very different E-log I profile, being the response almost characteristic of each curve. All of them both in the presence and absence of BSA showed characteristics of repassivation, i. e., at the same potential the current was lower in the reverse than in the direct scan: the repassivation potential (E_{rep}) was always higher than the corrosion one, but the presence of BSA resulted in the appearing of more than one repassivation potential, except for the BSA-80-20 sample, which showed only one E_{rep} value. In the absence of BSA no significant difference was observed in the estimated i_{CORR}: 1.3 x 10⁻⁶ A cm⁻² (Ti-Al-V and HA) 0.8 x 10⁻⁶ A cm⁻² (80-20), and E_{rep} values were: +0.49 V (Ti-Al-V); -0.20 V (HA) and +0.15 V (80-20) indicating again that the presence of TiO₂ improves the coating performance.

In the presence of BSA the estimated values of i_{CORR} and the values of E_{rep} were: 1 x 10⁻⁶ A cm⁻² and +0.56 V (Ti-Al-V); 0.5 x 10⁻⁶ A cm⁻² and +0.62 V (HA) and 1 x 10⁻⁶ A cm⁻² and +0.48 V (80-20). However, in the presence of BSA, HA coating showed two more "E_{rep}" values at lower potentials (+0.25 and -0.27 V), and Ti-Al-V one more at -0.32 V, making difficult establishes a ranking between the coatings in the presence of BSA based on the these parameters. These curves also show the following important features: (a) the Ti-6Al-4V depicts two anodic current peaks at 0.8 V and at around 1.7 V followed by an increase in the current to reach 2.4 mA cm⁻² at 2.0 V. No current peaks are observed in the reverse scan and the current decreases rapidly to zero. Similar behavior is observed for 80-20 sample with smaller anodic current peak at 0.8 V and a shoulder at 1.6 V; the current density at 2.0 V is 2.7 mA cm⁻²; (b) the HA presents no anodic current peaks, but an increase in the current at potentials higher than 1.4 V reaching

1.08 mA cm⁻² at 2.0 V. In the reverse scan only an exponential decrease of the current is observed. Based on these comments HA sample seems to be the best in the absence of BSA in the Hanks' solution. The presence of BSA practically does not change the I-E profile of the substrate, but anticipate and broaden the two anodic current peaks to 0.7 and 1.3 V. In the reverse scan the current decreases exponentially to around zero and small cathodic peaks appear from 0.2 to -0.2 V. The 80-20 sample presents the same I-E profile that observed in the absence of BSA. On the other hand, the presence of BSA in the Hanks' solution increases the anodic current density at 2.0 V to the similar to substrate and 80-20 samples and presents broaden small anodic current peak at around 0.7 V. It is clear that BSA affected more pronouncedly the HA coating.

Electrochemical impedance studies

Figures 4-6 show the experimental and fitted EIS diagrams for the bare Ti-6Al-4V, HA and 80-20 samples, respectively, immersed in Hanks' solution. The equivalent circuits used are separately discussed after the presentation of the experimental EIS diagrams.

The bare substrate (**Fig. 4a**) did not displayed significant changes on its capacitive loop and its impedance modulus as well. In phase angle diagram (**Fig. 4c**), it presented overlapped time constants at the region from the medium to low frequency (MF/LF) indicating accelerated interfacial processes. It can be seen that the system exhibits capacitive behavior over a relatively wide-frequency region, which is typical of passive systems. For longer immersion times it is seen that the impedance response evolves towards of a more active system. The complex plane plots of the HA sample (**Fig. 5a**) show a gradual grow of the capacitive loop which may be related with development of oxide at the bottom of the coating pores. This can be seen clearly in the Bode plots (**Fig. 5c**) in which at the first and second period it displayed two distinct time constants: one related to the dielectric proprieties of the coating at the HF domain and another at the LF region related to the interfacial processes at the metal surface. As time elapse, the phase angle of this LF time constants increases till it reaches values similar to the bare substrate response. As well as the neat substrate, the 80-20 sample did not presented substantial changes in its capacitive loop (**Fig. 6a**). It also presented similar response to the HA sample with two time constants (**Fig. 6c**) but its LF time constant presented higher values since the first immersion, which could be related to the presence of TiO₂ in its formulation.

Figures 7- 9 display the experimental and fitted EIS diagrams for the bare Ti-6Al-4V, HA and 80-20 samples, respectively, immersed in Hanks' solution with 4.2 g L⁻¹ BSA. The phase

angle plot for the bare substrate displayed overlapped time constant (**Fig. 7c**) pointing to an accelerated interfacial process, similar behavior as in contact with pure Hanks' solution. However, it presented a decrease of the capacitive loop and the impedance modulus (**Fig. 7a and b**) also after 14 days of immersion. Hydroxyapatite coating displayed at least 2 time constants, one related to coating response (MF) and the other to the interfacial process at metal surface (LF). After 3 days of immersion they evolved to overlapped time constants resembling the substrate response. Then, after 14 days the HF phase angle decreases and another time constant appears at MF pointing that something might be covering the exposed area. The gradual increase of the solution resistance presented in **Figure 8b** can be related to the change in the ionic strength (26). **Figures 8b,c** and **9b,c** showed at least 2 time constants one at MF/HF region related to the coating and the other at LF corresponding to the response of the electrode/solution interface.

In order to analyze in more detail the EIS response, the equivalent electrical circuit (EEC) model was used to treat the experimental data. **Figure 10** shows the different electrical equivalent circuits (EECs) used to fit the electrochemical impedance data obtained for Ti-Al-V (substrate) and, HA-TiAl-V and HA-20TiO₂-Ti-Al-V coatings with the immersion time in Hank's solution in the absence and presence of BSA in solution.

The EEC was chosen according to the following physical model: the substrate, in the absence of BSA, is covered by a compact Ti,Al,V-oxide film (represented in the EEC by the sub-circuit containing the elements C_2 or CPE_2 for shorter immersion times, and $C_2, CPE_2 // R_2$ for longer immersion times), and the charge transfer reaction occurs at the metallic / oxide film interface which is represented by $CPE_3 // R_3$ sub-circuit. For longer immersion times, pores can be formed inside the metallic oxide layer and the charge transfer reaction can be also developed at the bottom of this pores. R_3 is the charge transfer resistance associated with the redox process. The CPE_3 element is associated with the capacitance of the electrical double layer. In the presence of BSA, the protein adsorbs on the oxide film and modifies the charge distribution on the oxide surface. When hydroxyapatites or hydroxyapatites + TiO₂ are deposited, a new sub-circuit $C_1, CPE_1 // R_1$ was added to account for the presence of the coating, which is porous and is partially or complete dissolved at different velocities depending on the presence of TiO₂ in the coating and / or BSA in the Hank's solution. In the circuits sometimes a constant phase element (CPE) is substituted by the capacitance (C) with the increase of the immersion time, or, initially, a C fits the data; this is the reason that both elements are indicated in the EECs and in the tables. When the exponent ($CPE-P$ or n) appears in the tables means that a constant phase element was used. The constant phase element represents the

deviation from the true capacitive behavior. The *CPE* is constituted by the admittance *CPE-T* and the exponent *CPE-P* or *n*. A value of *CPE-P* of 1 corresponds to the response of an ideal capacitor, *C*; *CPE-P* value of 0.5 suggests a diffusion response or a porous material response (at high frequency), and $0.5 < CPE-P < 1$ values are associated to heterogeneous, rough or non-homogeneous current distribution at the electrode surface [32].

The EEC of **Figures 10a** and **10b** were used to fit the data obtained for the substrate in the absence and presence of 4.2 g L^{-1} BSA. The EEC of **Fig. 10b** fitted the data obtained for longer immersion times, which was shortened in the presence of BSA. R_s corresponds to the solution resistance. Both EECs refer to two time constants which can be represented by two in series sub-circuits related to the response of the metallic oxides, and the charge transfer reaction at the electrode / solution interface, mainly at metallic /metallic oxide interface. The substrate presented very compact oxide film, and in the absence of BSA and for short immersion times a high capacitive behavior is observed, suggesting that the current pass through the capacitor. Therefore, in this case, the first sub-circuit is given by a C_2 which was associated to the capacitance of the Ti,Al,V-oxides. For long immersion times, 30 days in the absence of BSA, the capacitor C_2 changes to a constant phase element CPE_2 , and R_2 must be included in the sub-circuit. It means that the oxide layer is being degraded. The second sub-circuit $R_3//CPE_3$ was associated to the charge transfer reaction occurring at the bottom of the pores and / or defects of the oxide film. The parameters of the EECs for the substrate in the absence and presence of BSA are in **Table 2**.

In the absence of BSA, the value of C_2 is almost constant around $4 \times 10^{-4} \text{ F cm}^{-2}$ (**Table 2**). The CPE_3-T and CPE_3-P are almost constant with immersion time, with values of $1.4 \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-2} \text{ s}^{-n}$ and 0.80, respectively. Similar EEC as in **Fig. 10b** was also used in (33,27) to describe the corrosion behavior of Ti and its alloys in chloride-containing medium.

In the presence of BSA, the impedance data were also fitted using two in series time constants. The oxide layer, which was fitted by a C_2 element in the absence of BSA, now was fitted by a constant phase element (CPE_2) with an almost constant CPE_2-T value, around $2 \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-2} \text{ s}^{-n}$ and CPE_2-P around 0.80 up to 6 days of immersion (**Table 2**). For immersion times ≥ 12 days the CPE_2 or C sub-circuit changes to $R_2//CPE_2$ in which the meaning of the elements is the same described above for 30 days immersion. R_2 values showed some oscillation probably due to the adsorption/desorption of BSA from the electrode surface. The BSA acts as a cationic complexant agent and facilitates the formation of defects in the oxide film, besides to cause a heterogeneous charge distribution on the electrode surface [34]. The second time constant is

described by the $R_3//C_3$ where R_3 represents the charge transfer resistance due to the electrochemical activity at the bottom of pores (pinholes) present in the oxide film and / or the activity at the metallic/metallic interface. C_3 represents the capacitance of the electrical double layer. The charge transfer resistance diminished and the capacitance increased with immersion time (**Table 2**), suggesting an increase in the attacked area, which can be due to the oxide layer degradation and metallic surface oxidation.

When HA was deposited on the Ti-Al-V alloy in the absence of BSA a new constant phase element appeared at HF region which was fitted by adding a $R_1//CPE_1$ sub-circuit to the EEC used to fit the data obtained for the bare substrate. In this new circuit (**Fig. 10c**) R_1 represents the resistance of the HA layer and the solution resistance inside the pores of this layer and CPE_1-T is related with the capacitance of the HA layer and CPE_1-P is the exponent. This EEC explains the experimental impedance data until 12 days immersion. CPE_1-P values suggest a diffusion process through the HA layer for the first two days immersion, and a heterogeneous charge distribution for longer immersion times. For 18 days immersion the EEC evolves to the one of **Fig. 10d**, in which the resistance R_2 was added, similar to that observed for the substrate at 30 days immersion, suggesting that the metallic oxide-layer resistance diminished and the current can pass also through the oxide film. For 24 and 30 days immersion the EIS data were fitted with the same EEC of the substrate in the absence of BSA (**Fig. 10b**), suggesting that the HA layer was dissolved or shows no influence in the impedance response. The presence of an amorphous HA phase facilitates the dissolution of hydroxyapatites dissolution. The system under this condition resembles the substrate behavior. The data obtained using these different EECs are in **Table 3**. For short immersion times small R_1 values were obtained, probably due to the presence of the amorphous phase and high porosity. The value of this resistance increased between 4 and 6 days immersion, which can be due to the dissolution/precipitation of HA causing some blocking of the pores. On the 12th day immersion the resistance decreased again probably due to the intense dissolution of the coating that predominates over its precipitation inside the pores. The EIS data obtained on the 18th day immersion were fitted including the R_2 resistance (**Fig. 10d**), suggesting that the metallic oxide is also being degraded and the HA coating almost lost its influence. From the 24th day immersion the same EEC used to fit the data for the bare substrate (**Fig. 10b**) was used to fit the experimental data for HA, indicating no more influence of the coating.

For HA coating with BSA in the solution the behavior was described by two EECs (**Figs. 10c and 10b**), the elements have the same meaning as above described, and the parameters are given in **Table 3**. The $R_1//CPE_1$ sub-circuit was unnecessary to fit the experimental data

after 12 days immersion, and the EIS data were fitted with the EEC used for the bare electrode for long immersion times. This behavior was only observed after 24 days immersion in the absence of BSA in solution. Therefore, the presence of BSA accelerated the degradation of HA layer due to its interaction with HA. These results clearly indicated that the HA has no more influence on the electrochemical response after 12 days in contact with the Hank's solution containing BSA. CPE_1-P values suggest a diffusion process through the HA layer from the first to sixth day immersion, and the coating influence disappeared after 12 days immersion. The metallic oxide was simulated by a capacitance C_2 as in the absence of BSA in solution, and only for immersion times ≥ 12 days, when no more influence of the coating was detected, the R_2 element was included, and the EIS response was similar to the bare substrate. For all the immersion times the sub-circuit R_3/CPE_3 fitted the experimental data. R_3 values were around $10^4 \Omega \text{ cm}^2$ and increased by 1 order of magnitude for long immersion time suggesting an increase in the attacked area of the substrate. CPE_3-P values indicate a very heterogeneous surface and in some immersion times suggest some diffusion contribution when the $CPE-P$ values are near 0.5.

For sample 80-20 in the absence and presence of BSA in solution the EECs of **Figs. 10c**, **10d** and **10b** were used to fit the experimental data as the immersion time increased. The meaning of the EEC elements was above described. In the absence of BSA in solution, the EEC of **Fig. 10c** described the data until 6 days of immersion in the absence and 12 days in the presence of BSA in solution, respectively. The EEC of **Fig. 10d** was used for the immersion time from 12 to 24 days in the absence and for on 18th day in the presence of BSA in solution, respectively. For longer immersion times the EEC of **Fig. 10b** was used to fit the experimental data, the same EEC which was used to describe the bare substrate. The parameters of the circuits are in **table 4**. In the absence of BSA, the $R_1//CPE_1$ sub-circuit fitted well the time constant at high frequency region with an almost constant R_1 value around $40 \Omega \text{ cm}^2$, and a CPE_1-T around $9.1 \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-2} \text{ s}^{-n}$, except for the 1st day immersion, which was $4.6 \times 10^{-4} \text{ S cm}^{-2} \text{ s}^{-n}$. A CPE_1-P fixed at 0.5 was used and denotes a diffusion of the electrolyte through the HA-TiO₂ layer. From 12 to 24 days immersion the R_1 value decreased probably due to the dissolution of the coating, and for 30th day immersion the coating influence disappeared. The metallic oxide behavior, for the first 6 days immersion, was described by the constant phase element CPE_2-T which was almost constant around $7.4 \times 10^{-5} \text{ S cm}^{-2} \text{ s}^{-n}$ with a CPE_2-P value around 0.85, typically of a surface with a heterogeneous charge distribution. A resistance R_2 was added to the EEC in **Fig. 10c** to describe the impedance response from 12 to 24 days immersion (**Fig. 10d**) and its value increased, suggesting some precipitation inside the pores of

the metallic oxide layer. For the 30th day the contribution of the coating disappeared and the simple sub-circuit used for the bare substrate (**Fig. 10b**) fitted well the experimental data. The R_3 value slightly increased with time, and it was accompanied by some increase in the capacitance of the system and a slightly increase in CPE_3-P values. This behavior is difficult to explain but, indicates that the presence of the TiO_2 modified the impedance response of the HA sample.

The presence of BSA in Hank's solution suggests some diffusion through the HA- TiO_2 coating during the first 2 days immersion and then a behavior of a heterogeneous surface predominated. The resistance R_1 of the coating was small and slightly increased in the first 3 days, increased significantly for the next 3 days, then decreased on the 12th and 18th days and its influence disappeared for longer times suggesting the dissolution of the coating. The metallic oxide layer was described by a capacitor with alternating values of capacitance and for immersion time ≥ 18 days a parallel combination of CPE_2 and R_2 was used to fit the experimental data, indicating a degradation of the metallic oxide layer. R_3 values were always lower than that obtained in the absence of BSA denoting that BSA also attacks the coating and substrate as already observed for the bare substrate. In agreement with these results CPE_3-T values were higher in the presence of BSA in Hank's solution, suggesting an increase of the attacked area.

Considering the evolution of EECs with immersion time one can observe that the addition of TiO_2 to HA coating delayed the action of BSA. It is indicated by the fact that the EEC of **Fig. 10c** was used to describe the HA- TiO_2 coating behavior until 12 days immersion while in the absence of TiO_2 it was applied up to 6 days.

Conclusions

The results obtained for HVOF produced hydroxyapatite coatings in Hank's solution for 30 days immersion allow obtaining the following conclusions:

- The HA- TiO_2 coating (80-20 sample) was the only one that showed a clear passive region from around -0.4 V to 0 V in the presence and absence of BSA, indicating the beneficial influence of the addition of TiO_2 to the HA coating stability.

- The HA coating dissolves with immersion time and after 18 in the absence and 6 days in the presence of bovine serum albumin (BSA) in Hank's solution presents no influence on the impedance response, resemble the bare substrate behavior.
- The addition of TiO₂ to the HA coating delayed the HA dissolution increasing the coating stability. The influence of the HA-TiO₂ coating on the EIS diagrams disappeared after 18 days for HA and after 24 days immersion for HA-TiO₂ coating.
- In the presence of BSA in Hank's solution the addition of TiO₂ to the HA coating delayed the influence of the coating in EIS diagrams from 6 days for HA to 24 days for HA-TiO₂ coatings.
- Our results also indicated that BSA in Hank's solution diminishes the stability of the metallic oxide layer present on the Ti-based alloy and accelerates the hydroxyapatites coatings dissolution.
- The following physical model was proposed draw the equivalent electrical circuits (EEC) and explain EIS data: the Ti-A-V alloy is covered by a compact metallic oxide film which is degraded with immersion time in Hank's solution, and the response of this substrate can be simulated by two in series time constants. The HA or HA-TiO₂ coating deposition on the substrate shows a new time constant which requires a new sub-circuit with a constant phase element or capacitor in parallel with a resistance to accounts for the response at higher frequency. The influence of this coating decreases as the immersion time increases due to attack of the Hank's solution and BSA to the surface of the coating and substrate.

Acknowledgements

The authors thank the CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas, Brazil) for the researcher scholarship (Proc. 305890/2010-7).

References

1. Banerjee R, Nag S, Stechschulte J, Fraser HL. Strengthening mechanisms in Ti–Nb–Zr–Ta and Ti–Mo–Zr–Fe orthopaedic alloys. *Biomaterials*. 2004;25(17):3413-9p.
2. González JEG, Mirza-Rosca JC. Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1999;471(2):109-15p.
3. Tomashov ND, Chernova GP, Ruscol YS, Ayuyan GA. The passivation of alloys on titanium bases. *Electrochimica Acta*. 1974;19(4):159-72p.

4. Kwok CT, Wong PK, Cheng FT, Man HC. Characterization and corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V fabricated by electrophoretic deposition. **Applied Surface Science**. 2009;255(13–14):6736–44p.
5. Hiromoto S, Mischler S. The influence of proteins on the fretting–corrosion behaviour of a Ti6Al4V alloy. **Wear**. 2006;261(9):1002–11p.
6. Charrière E, Terrazzoni S, Pittet C, Mordasini P, Dutoit M, Lemaître J, et al. Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements. **Biomaterials**. 2001;22(21):2937–45p.
7. Goyenvalle E, Aguado E, Nguyen J-M, Passuti N, Le Guehennec L, Layrolle P, et al. Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered calcium phosphate coating. **Biomaterials**. 2006;27(7):1119–28p.
8. Melero H, Torrell M, Fernández J, Gomes JR, Guilemany JM. Tribological characterization of biocompatible HAP-TiO₂ coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray. **Wear**. 2013;305(1–2):8–13p.
9. Kumar A, Biswas K, Basu B. On the toughness enhancement in hydroxyapatite-based composites. **Acta Materialia**. 2013;61(14):5198–215p.
10. Chien C-Y, Liu T-Y, Kuo W-H, Wang M-J, Tsai W-B. Dopamine-assisted immobilization of hydroxyapatite nanoparticles and RGD peptides to improve the osteoconductivity of titanium. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. 2013;101A(3):740–7p.
11. Liu P, Song J. Sulfobetaine as a zwitterionic mediator for 3D hydroxyapatite mineralization. **Biomaterials**. 2013;34(10):2442–54p.
12. Feliu V, González JA, Andrade C, Feliu S. Equivalent circuit for modelling the steel-concrete interface. II. Complications in applying the stern-geary equation to corrosion rate determinations. **Corrosion Science**. 1998;40(6):995–1006p.
13. Cabrini M, Cigada A, Rondell G, Vicentini B. Effect of different surface finishing and of hydroxyapatite coatings on passive and corrosion current of Ti6Al4V alloy in simulated physiological solution. **Biomaterials**. 1997;18(11):783–7p.
14. Nie X, Leyland A, Matthews A. Deposition of layered bioceramic hydroxyapatite/TiO₂ coatings on titanium alloys using a hybrid technique of micro-arc oxidation and electrophoresis. **Surface and Coatings Technology**. 2000;125(1–3):407–14p.
15. Cheng X, Roscoe SG. Corrosion behavior of titanium in the presence of calcium phosphate and serum proteins. **Biomaterials**. 2005;26(35):7350–6p.
16. Drevet R, Aaboubi O, Benhayoune H. In vitro corrosion behavior of electrodeposited calcium phosphate coatings on Ti6Al4V substrates. **J Solid State Electrochem**. 2012;16(9):3069–77p.
17. Zhang B, Kwok C. Hydroxyapatite-anatase-carbon nanotube nanocomposite coatings fabricated by electrophoretic codeposition for biomedical applications. **J Mater Sci: Mater Med**. 2011;22(10):2249–59p.
18. Vasilescu C, Drob P, Vasilescu E, Demetrescu I, Ionita D, Prodana M, et al. Characterisation and corrosion resistance of the electrodeposited hydroxyapatite and bovine serum albumin/hydroxyapatite films on Ti–6Al–4V–1Zr alloy surface. **Corrosion Science**. 2011;53(3):992–9p.

19. Zhou X, Mohanty P. Electrochemical behavior of cold sprayed hydroxyapatite/titanium composite in Hanks' solution. **Electrochimica Acta**. 2012;65(0):134-40p.
20. Lee C-K. Fabrication, characterization and wear corrosion testing of bioactive hydroxyapatite/nano-TiO₂ composite coatings on anodic Ti-6Al-4V substrate for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: B**. 2012;177(11):810-8p.
21. Zhou X, Siman R, Lu L, Mohanty P. Argon atmospheric plasma sprayed hydroxyapatite/Ti composite coating for biomedical applications. **Surface and Coatings Technology**. 2012;207(0):343-9p.
22. Singh G, Singh H, Sidhu BS. Characterization and corrosion resistance of plasma sprayed HA and HA-SiO₂ coatings on Ti-6Al-4V. **Surface and Coatings Technology**. 2013;228(0):242-7p.
23. Sousa SR, Barbosa MA. Effect of hydroxyapatite thickness on metal ion release from Ti6Al4V substrates. **Biomaterials**. 1996;17(4):397-404p.
24. Souto RM, Laz MaM, Reis RL. Degradation characteristics of hydroxyapatite coatings on orthopaedic TiAlV in simulated physiological media investigated by electrochemical impedance spectroscopy. **Biomaterials**. 2003;24(23):4213-21p.
25. H. Melero JF, S. Dosta, J.M. Guilemany. Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**. 2011;50(2):59-64p.
26. Mohamed SG, Abdeltawab AA, Shoeib MA. Corrosion behaviour and bioactivity of electrophoretically deposited hydroxyapatite on titanium in physiological media (Hanks' solution). **Mater Sci-Pol**. 2012;30(3):231-9p.
27. Roland T, Pelletier H, Krier J. Scratch resistance and electrochemical corrosion behavior of hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V in simulated physiological media. **J Appl Electrochem**. 2013;43(1):53-63p.
28. Lavos-Valereto IC, Costa I, Wolyne S. The electrochemical behavior of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in Hank's solution. **Journal of Biomedical Materials Research**. 2002;63(5):664-70p.
29. Zhang Z, Dunn MF, Xiao TD, Tomsia AP, Saiz E. Nanostructured Hydroxyapatite Coatings for Improved Adhesion and Corrosion Resistance for Medical Implants. **MRS Online Proceedings Library**. 2001;703:null-nullp.
30. Aziz-Kerrzo M, Conroy KG, Fenelon AM, Farrell ST, Breslin CB. Electrochemical studies on the stability and corrosion resistance of titanium-based implant materials. **Biomaterials**. 2001;22(12):1531-9p.
31. Lvovich VF. Impedance-Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena. Impedance Spectroscopy: John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
32. Boukamp BA. Small signal response of the BiCuVO_x/noble metal/oxygen electrode system. **Solid State Ionics**. 2000;136-137(0):75-82p.

33. González JEG, Mirza-Rosca JC. Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 1999;471(2):109-15p.
34. Kratz F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. 2008;132(3):171-83p.

Anexo 5

Artículo enviado a la revista Bio-medical Materials and Engineering, con el título "In vitro performance of ceramic coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray".

Equivalencias nomenclatura artículo-tesis:

Tablas

| | |
|---|--------|
| 1 | VII.3. |
|---|--------|

Figuras

| | |
|---|------|
| 1 | X.1. |
| 2 | X.2. |
| 3 | X.3. |
| 4 | X.4. |
| 5 | X.5. |
| 6 | X.6. |

In vitro performance of ceramic coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray

H Melero^{1}, N Garcia-Giralt², J Fernández¹, A Díez-Pérez^{2,3} and J M Guilemany¹*

¹ Thermal Spray Centre - Universitat de Barcelona. Martí i Franqués, 1, 08028 Barcelona, Spain

² URFOA, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), RETICEF. Doctor Aiguader, 80, 08003 Barcelona, Spain

³ Servei de Medicina Interna, Hospital del Mar, Barcelona

* Corresponding author

Hortensia Melero

Thermal Spray Centre - Universitat de Barcelona. Martí i Franqués, 1, 08028 Barcelona, Spain

Phone: (+34) 93 402 13 25

Fax: (+34) 93 402 16 38

e-mail: hmelero@cptub.eu

Abstract

Hydroxyapatite coatings obtained by plasma-spraying have been used for many years to improve biological performance of bone implants, but several studies have drawn attention to the problems arising from high temperatures and the lack of mechanical properties.

In this study, plasma-spraying is substituted by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray, with lower temperatures reached, and TiO₂ is added in low amounts to hydroxyapatite in order to improve the mechanical properties. Four conditions have been tested to evaluate which are

those with better biological properties. Viability and proliferation tests, as well as differentiation assays and morphology observation, are performed with human osteoblast cultures onto the studied coatings.

The hydroxyapatite-TiO₂ coatings maintain good cell viability and proliferation, especially the cases with higher amorphous phase amount and specific surface, and promote excellent differentiation, with a higher ALP amount for these cases than for polystyrene controls. Observation by SEM corroborates this excellent behaviour.

In conclusion, these coatings are a good alternative to those used industrially, and an interesting issue would be improving biological behaviour of the worst cases, which in turn show the better mechanical properties.

Keywords

Bio-ceramic; Coating; In vitro behaviour; Thermal Spray; HVOF

I. Introduction

Hydroxyapatite, Ca₁₀(PO₄)₆OH in its chemical formula, has been used for decades for bone regeneration purposes, due to its well-known osteoconductive properties, and different studies over time have corroborated this positive behaviour [1,2]. However, it has been argued that, as a bioactive material, it is not the best one, but one of the most stable [3]; furthermore, as a material for large bone replacements, it lacks of sufficient mechanical properties [4]. These factors explain the use of this ceramic as a coating for metal prostheses -with more suitable mechanical properties-, as well as its utilization with thermal spraying (specifically, with plasma-spraying) since the beginning of the 1980's, to make the coatings osteoconductive but as stable as possible [5,6].

Despite these attempts, hydroxyapatite coatings obtained by plasma spraying pose many problems. Among these are the degradation of the coating due to extremely high temperatures on the beam; and the subsequent formation of phases that can be harmful to the surrounding tissues or amorphous phases that can easily dissolve under physiological conditions [7,8]. Either of these two possibilities can disable the prosthesis, the first one through possible infection and the second due to early displacement of the device, causing inappropriate distribution of stresses and early failure. These are the reasons of the several solutions proposed by different groups in order to improve the mechanical properties without the loss of biological properties [9], such as the addition of carbon nanotubes to increase toughness [10,11] or of silica to increase adherence [12,13], the use of TiO₂ interlayers [14], etc. Two have been chosen for this study: the first is the addition of TiO₂ in a rutile phase to the hydroxyapatite, because of the clear improvement in the mechanical properties of the coatings; the second involves the substitution of plasma-spraying by high velocity oxy-fuel (HVOF), with lower temperatures reached, to avoid the formation of damaging third phases during the coating process. Although these two issues have been adopted previously to improve the performance of traditional plasma-sprayed hydroxyapatite coatings with high amounts of TiO₂, the objective in this study is try to reduce the amount of TiO₂ in order to maintain the biological properties of the coating closer to those of hydroxyapatite whereas the mechanical properties are improved (results concerning this will be soon published).

The biological performance of the coatings must be studied in order to assess the behaviour of the materials under physiological conditions. In this study, biocompatibility has been examined by means of different tests at several culture times: a study of cell adhesion and viability, of proliferation, of osteoblast differentiation and of cell morphology on the surface. Furthermore, the surfaces have been observed by fluorescence and by scanning electron microscopy to corroborate the results. Also, cell behaviour has been related to other characteristics of the coatings, such as the present phases and the specific surface.

II. Experimental method

II.1. Preparation of the coatings

The initial powder is a mechanical mixture of a Sulzer-Metco TiO₂ (rutile) powder (20wt%) and a Plasma-Biotol Ltd. hydroxyapatite powder (80wt%), that has been sprayed on a previously grit-blasted Ti6Al4V substrate (5x5 mm² sheets) with a Sulzer-Metco DJH 2600 HVOF system. The powder characterization and the spraying parameters have been reported elsewhere [15].

Four conditions have been considered: T0V0, T0V1, T1V0 and T1V1, where T is the theoretical temperature of the beam where the particle travels and V its velocity; and where 0 corresponds to a lower level and 1 to a higher one (of temperature or velocity), at distances where the maximum coating adherence is obtained [15].

Before the cell experiments, all the coated samples have been sterilized by gamma radiation (25kGy).

II.2. Phases characterization

The crystalline phases of the coating have been analyzed by X-ray diffraction, using a Siemens D500 X-ray diffraction Bragg-Brentano type $\theta/2\theta$ apparatus, with Cu K _{α 1+2} radiation ($\alpha_1=1,54060$ and $\alpha_2= 1,54443$), at 40kV and 30mA. Moreover, some Rietveld calculations have been performed on scraped-off coatings after a new slower measure, adding 30% in weight of Al₂O₃ as a standard mixed with the coating.

II.3. Real surface area

To assess the specific area of the surface of the coating, a Leica DCM 3D microscope has been used, employing a confocal technique to measure the real surface over the apparent surface of the coating.

II.4. Cell culture

Osteoblastic cells have been obtained for culture following the protocol described by Nacher et al. [16], and the entire study has been conducted in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki, revised in 1983, and with the approval of the Hospital del Mar-IMIM Ethics Committee. Briefly, knee trabecular bone obtained after prosthesis replacement (with patients' prior written informed consent) has been dissected into 1-2 mm pieces. The samples have been washed in phosphate-buffered solution (PBS) to remove blood, marrow cells and any other soft tissue. Finally, the pieces have been placed into a 10 cm diameter Petri dish containing 20 mL Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose and supplemented with 10% FBS, pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), penicillin (100 UI/mL), streptomycin (100 UI/mL) and ascorbic acid (100 mg/ml) (Invitrogen). The explants have been incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, changing the medium twice a week until cell confluence, then these cells have been passaged into new 75 cm² flasks until the needed number has been reached. A maximum of a third subculture has been used in the experiments. For materials testing, the coated samples have been placed on a 24-well polystyrene culture plate (Nunc A/S) and immersed in Hanks' balanced solution (HBSS, Sigma Aldrich) overnight at room temperature. After removing Hanks' solution, samples have been seeded with 20000 cells for viability and proliferation studies, as well as for SEM observation, and with 50000 for cell differentiation studies. The medium employed for adhesion, proliferation and morphology studies has been DMEM supplemented with 10% FBS. For the differentiation assays, the same medium was used, but supplemented with 10⁻⁸M of vitamin K and D.

Before the different cell functional tests, the coated samples have been removed from the original well and put into another one in order to ensure the results obtained are provided only by the cells present on the studied coating, and not by the cells on the plate surface. For

quantitative tests, osteoblasts cultured in polystyrene wells were used as a positive control. A quarter of the number of cells employed for each assay onto each material surface (5000 for viability and proliferation tests and 12500 for cell differentiation studies) has been seeded on the plate, to balance out the cell number with regard to the materials. Samples without seeded cells have been employed as negative controls, and their respective values in the different assays have been subtracted from the absolute values obtained for each case.

II.5. Cell viability and proliferation

Cell viability has been evaluated using an MTT colorimetric assay kit (Roche Diagnostics GmbH), at 3, 7 and 14 days of culture. This test is based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt (MTT) to purple formazan made by metabolically active cells. These ones are incubated with the MTT solution for 4h, then the resulting formazan crystals are solubilized in the solution before the measurement in a scanning multi-well spectrophotometer (ELISA reader) at 550 nm (reference wavelength > 650nm). The measured absorbance is directly linked to the number of live cells adhered to the coating. Moreover, attachment and distribution have been characterized using LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for Mammalian Cells (Invitrogen). Live cells can be easily distinguished from dead cells by simultaneously staining them with green-fluorescent calcein-AM to indicate intracellular esterase activity (live cells) and red-fluorescent ethidium homodimer-1 to indicate loss of plasma membrane integrity (dead cells). The surfaces have been then observed with a Leica DM 1000 optical microscope.

In parallel, cell proliferation onto the coatings has been quantified, at the same times, employing a BrdU colorimetric immunoassay kit (Roche Diagnostics GmbH) based on the incorporation of BrdU (5-bromo-2'-desoxyuridine) in place of thymidine into the DNA of cycling cells. Then, cells are fixed, and a monoclonal antibody is added that bounds to the BrdU incorporated into the newly synthesized cellular DNA. Immune complexes are formed that can

be detected by a substrate reaction. The reaction product is quantified by measuring the absorbance using a scanning multi-well spectrophotometer (ELISA reader) at 450 nm (reference wavelength of 690 nm).

Differences among coatings were tested using ANOVA with a p-value of 0.05. Eight samples have been tested for each assay and test time for MTT, BrdU and ALP quantification, and two samples have been employed for fluorescence and SEM observation.

II.6. Osteoblast differentiation

Osteoblastic differentiation levels have been evaluated through alkaline phosphatase (ALP) activity, with Abcam's Alkaline Phosphatase Assay Kit. This assay uses p-nitrophenyl phosphate (pNPP) as a phosphatase substrate which turns yellow when dephosphorylated (it turns to p-nitrophenol) by ALP. The resulting absorbance is also measured using a scanning multi-well spectrophotometer, at 405nm.

II.7. Cell morphology on surfaces of coatings

Cell morphology has been determined by fixing cells on the coating surface with 2.5% glutaraldehyde in cacodilate buffer for 2h followed by conservation in cacodylate buffer until their progressive dehydration with alcohol and critical point drying. The samples have been observed using a Jeol JSM-840 microscope, after being sputtered to turn them conductive.

III. Results and discussion

III.1. Phases identification

Firstly, the composition of the different coatings has been characterized in order to establish a relation between XRD results and biomaterials properties. These results show the presence of the same phases in all coatings, and the fact that the majority phases are the initial ones, i.e.,

hydroxyapatite and rutile. Other peaks that appear can be attributed to anatase and α -TCP. Furthermore, broad bands around the main peaks of hydroxyapatite and rutile are observed, due to the presence of amorphous phases. Rietveld calculations make possible to quantify the detected phases, as listed in Table 1. Since the listed phases are the same for all cases, specific cell behaviour cannot be due to the presence of a given phase. With coatings that have similar compositions, a factor of great importance in cell behaviour on surfaces is the amount of amorphous phase. The vast majority of studies agree that amorphous phase, which preferentially dissolves, leads to an accumulation of calcium and phosphate ions, which reach saturation in micro-vicinity of the coatings, and precipitate on their surfaces in the form of an apatite layer, which would have a positive effect on osteoblastic differentiation [17]. The T1V0 case is, by far, the case with the highest percentage of amorphous phase, due, on the one hand, to a higher particle temperature because of a higher residence time of the particle in the beam compared to T0V1 and T1V1 cases, and, on the other hand, to a higher level of temperature beam than in the T0V0 case. The T0V0 case has the second highest percentage of amorphous phase, due to the residence time of the particle, which is higher than in the T0V1 and T1V1 cases. Both of the latter two cases, by contrast, have a lower residence time in the beam (and therefore a lower particle temperature), which is lower for the T1V1 case than for the T0V1 one, and that accounts for why they have the lowest percentages of amorphous phase (in the same order).

III.2. Specific surface

The specific surface of the four cases, plotted in Figure 1, follows the same order of the amount of amorphous phase. The T1V0 case is the case with the highest specific surface and T0V1 and T1V1 are the cases with the lowest specific surface. This fact is not casual, and a certain relationship between the two phenomena exists. The case with the highest percentage of amorphous phase is the case with the highest particle temperature reached, but its particle

velocity is one of the lowest. This could be the reason for obtaining a less compact, but more melted coating, and, as a consequence, a rougher topography and a higher specific surface. On the contrary, the case T1V1, with the lowest percentage of amorphous phase, is the one with the lowest particle temperature reached. In this case, the contraction due to cooling is lower, and the particle velocity is higher, which creates more highly compacted coatings, without a cooling deformation. This effect of velocity is also seen in the T0V1 case, with a similar specific surface to the T1V1 one.

Measuring specific surface is also a good way to assess, -when added to other properties, of course- the biocompatibility of a material. According to references [18], a higher specific surface is associated with greater cell activity on the surface. Different reasons support this fact. Firstly, roughness is always desirable, as the presence of a certain roughness allows a better gripping of the cell to the surface (although it is well known that nanometric roughness is preferable to micrometric one [19,20]); secondly, a higher specific surface assures a greater possibility of proliferation and a higher cell density for the same apparent surface; and finally, the more significant the quotient between the real surface and the apparent one, the higher the number of vicinities where the precipitation mechanism explained in the previous section can occur. These reasons lead to the expectation of obtaining better osteoblast behaviour for cases with a higher specific surface.

III.3. Cell viability and proliferation

In order to test the viability and proliferation of osteoblasts on the different studied coatings in comparison to polystyrene controls, three complementary methodologies have been carried out (MTT, live/dead fluorescence and BrdU).

MTT results, plotted in Figure 2, indicate that none of the studied materials is cytotoxic. At 3 days, differences between specimens are not statistically significant. At 7 and 14 days, the relation between the cases remains steady. The best viability value is obtained for the positive

control, although the T1V0 case is able to reach comparable viability rates. The poorest result appears in the T1V1 culture. Significant differences have been found between the T1V0 and T1V1 cases. The other two cases show an intermediate behaviour. Previous studies done by our group have also shown good cell viability with 100% hydroxyapatite coatings obtained by HVOF, which were comparable for the majority of the cases to polystyrene (PS) controls [21]. The presence of 20% titania only slightly inhibits viability on the coating surfaces. Other groups have also studied cell viability through MTT assays with combinations of HAp and titania. Ramires et al. [22,23] have obtained similar or slightly lower values than PS controls for different combinations of TiO₂/HAp onto Ti made by sol-gel technique (in general without significant differences). Biological studies with titania tend to employ anatase due to its supposedly better cell behaviour [24]. However, many other studies have proved the biological behaviour of rutile to be comparable to anatase one [25,26,27], and, as rutile has better mechanical properties and more stability at physiological conditions [28], it has been chosen in this case, with good results.

Fluorescence tests corroborate MTT results and allow an observation of osteoblast distribution over the biomaterial surface, as can be seen in Figure 3. For all cases, the cell number on the surface increases exponentially with time. The distribution is homogeneous all across the surface, and osteoblast mortality is extremely low. However, as this methodology is qualitative, differences between cases are not evident for this assay. Only the T1V0 case shows, at 14 days, a distribution typical of confluence, indicating a higher adhesion and proliferation for this case.

The increase of cell viability detection observed at different times is explained by cell proliferation, as shown in the BrdU results (Figure 4). The studied materials allow good proliferation over time, which is, at least for the T1V0 case, very similar to the positive control. For the case of 100% HAp coatings, absorbance measurements similar to the PS controls were

obtained too [21]. At 3 days the differences between cases are not significant, while at 7 and 14 days significant differences appear between almost all the cases. The relation among the different cases is very similar to the relation obtained for the MTT results. This fact can be expected, because the two measures are related, with MTT measuring the amount of live cells on the surface and BrdU the number of proliferating cells, which is proportional to the first one.

As it has been explained in detail with specific surface results, a relationship would be expected between the specific surface and the cell viability and proliferation onto the coating. In fact there is a higher viability and proliferation for the cases with a higher specific surface, namely T1V0 and T0V0.

III.4. Cell differentiation

In order to test osteoblast differentiation status in the biomaterial cultures, alkaline phosphatase activity has been measured until 14 days post-culture (Figure 5). At 3 days, differences between cases are negligible, while at 7 and especially at 14 days of culture, T1V0 specimens, with a higher amount of amorphous phase, show the highest quantity of ALP detected, followed by the T0V0 case, with the second-highest amorphous phase amount. Interestingly, the T1V0 and T0V0 cases show a higher ALP production than positive controls.

Seeded cells are primary osteoblasts in 3th subculture as maximum, and they are expected to be differentiated. As a material may favour the maintenance of differentiation and activity over time, or, on the contrary, promote dedifferentiation and a loss of osteoblast activity, it is expected for the studied materials to observe an improvement in osteoblast differentiation, due to the content of calcium and phosphate ions around the coating –which, in turn, is due to the coating dissolution- and to the consequent re-precipitation of an apatite layer on the

coating surface (see Rietveld calculations and discussion). Specifically, following this reasoning, the cases with a higher amount of amorphous phase should produce a greater quantity of ALP. As can be observed from the results, the performed hypothesis reveals its effectiveness, and the dissolution of amorphous phase has a positive effect on cell differentiation (cases T1V0 and TOV0). Even the worst cases have similar or slightly better cell differentiation results than the positive control, due to the mere presence of calcium and phosphate. Previous studies with plasma-sprayed hydroxyapatite coatings showed higher ALP production for HAp coatings than for PS controls [21], which also corroborates the hypothesis done previously, although other papers relating HAp-TiO₂ coatings obtained by sol-gel show an ALP production similar or lower than the amount obtained with PS controls [22,23], possibly due to the absence of amorphous phase.

All results showed clearly that T1V0 coating is the best option for osteoblast growing and implant assembly. In contrast, T1V1 gave the worst cell parameters, due (as it has been explained before) to its lower specific surface and percentage of amorphous phase. Interestingly, this case is the one with the best mechanical properties (results soon to be published). Due to this conflict, a possible future avenue for research would be to try to improve the biological properties of this case through a procedure that has yet to be determined.

III.5. Morphology observation

Finally, SEM observation provides a detailed look at the morphology of the adhered osteoblasts. There are no differences among cases. In all of them, cells maintain the osteoblastic shape, with filopodia extending over them (coating TOV0 in Figure 6a and T1V0 in Figure 6b). Moreover, in both images it is possible to observe the apatite layer formed on the

surface of the coatings, as well as some Ca-P globules, an indication of the beginning of mineralization arising from cell differentiation.

IV. Conclusions

Several hydroxyapatite (80wt%)-Titania (20wt%) coatings onto Ti substrates have been obtained using high velocity oxy-fuel (HVOF). Cell viability, proliferation, differentiation and morphology have been studied for the different cases. In addition to achieving viability and proliferation comparable to PS controls for the case with the highest specific surface, T1V0, the cases with the highest percentage of amorphous phase, T1V0 and T0V0, show a far higher ALP production than PS controls, due to the presence of calcium and phosphate. This latter observation indicates the promotion of bone formation in T1V0 and T0V0, and makes the obtained coatings a good alternative to those commonly used as coating prostheses.

V. References

- [1] Shepperd JAN, Apthorp H. A contemporary snapshot of the use of hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg [Br]*. 2005; 87-B(8): 1046.
- [2] Block MS, Kent JN. Long-term radiographic evaluation of hydroxyapatite-augmented mandibular alveolar ridges. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1984; 42(12): 793.
- [3] Epinette JA, Manley MT. Fifteen years of clinical experience with hydroxyapatite coatings in joint arthroplasty. France: *Springer-Verlag*; 2004.
- [4] Charriere E, et al. Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements. *Biomaterials*. 2001; 22(21): 2937.
- [5] De Groot K, Geesink R, Klein CP. Plasma-sprayed coatings of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 1987; 21(12): 375.
- [6] Soballe K, et al. Fixation of titanium and hydroxyapatite-coated implants in arthritic osteopenic bone. *J. Arthroplast.* 1991; 6(4): 307.
- [7] Collier JP, et al. Loss of hydroxyapatite coating on retrieved, total hip components. *J. Arthroplast.* 1993; 8(4): 389.
- [8] Dalton JE, Cook SD. In vivo mechanical and histological characteristics of HA-coated implants vary with coating vendor. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 1995; 29(2): 239.
- [9] Melero H, Fernández J, Guilemany JM. Recubrimientos bioactivos: hidroxiapatita y titania. *Biomecánica*. 2011; 19: 35.
- [10] Balani K, et al. Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*. 2007; 28(4): 618.

- [11] Balani K, et al. Tribological behavior of plasma-sprayed carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite coating in physiological solution. *Acta Biomater.* 2007; 3(6): 944.
- [12] Morks MF, et al. Fabrication and characterization of plasma-sprayed HA/SiO₂ coatings for biomedical application. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2008; 1(1): 105.
- [13] Morks MF, Fahim NF, Kobayashi A. Structure, mechanical performance and electrochemical characterization of plasma-sprayed SiO₂-Ti-reinforced hydroxyapatite biomedical coatings. *Appl. Surf. Sci.* 2008; 255(5): 3426.
- [14] Tomaszek R, et al. Microstructure of suspension plasma sprayed multilayer coatings of hydroxyapatite and titanium oxide. *Surf. Coat. Technol.* 2007; 201(16-17): 7432.
- [15] Melero H, et al. Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.* 2011; 50(2): 59.
- [16] Nacher M, et al. Effect of cyclosporine A on normal human osteoblasts in vitro. *Bone Miner.* 1994; 26(3): 231.
- [17] Legeros RZ, Orly I. Substrate surface dissolution and interfacial biological mineralization. In: Davies JE, editor. *The Bone-Biomaterial Interface*. Toronto: University of Toronto Press; 1991. p. 76.
- [18] Hossain MM, Gao W. How is the surface treatments influence on the roughness of biocompatibility? *Trends Biomater. Artif. Organs.* 2008; 22(3): 144.
- [19] Wang RCC, Hsieh MC. Effects of nanometric roughness on surface properties and fibroblast's initial cytocompatibilities of Ti6Al4V. *Biointerphases.* 2011; 6(3): 87.
- [20] Webster TJ, et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2000; 51(3): 475.

- [21] Gaona M. Recubrimientos biocompatibles obtenidos por Proyección Térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. Universitat de Barcelona; 2007. PhD Thesis.
- [22] Ramires PA, et al. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biomaterials*. 2001; 22(12): 1467.
- [23] Ramires PA, Torricelli P. In vitro response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite composite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells. *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 2002; 13(8): 797.
- [24] Uchida M, et al. Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2002; 64A(1): 164.
- [25] Vallés G, et al. Rutile and titanium particles differentially affect the production of osteoblastic local factors. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2008; 84(2): 324.
- [26] Han W, Wang Y, Zheng Y. In vivo biocompatibility studies of nano TiO₂ materials. *Adv. Mater. Res.* 2009; 79-32: 389.
- [27] Wu JM, Hayakawa S, et al. Low-temperature preparation of anatase and rutile layers on titanium substrates and their ability to induce in vitro apatite deposition. *J. Am. Ceram. Soc.* 2004; 87(9): 1635.
- [28] Forberg S. Ceramic containers for spent nuclear fuel: on the corrosion resistance of rutile. In: Clark DE, White WB, editors. *Advances in Ceramics*, vol. 20, Nuclear Waste Management II. Westville, Ohio: The American Ceramic Society; 1986. p. 321.

Anexo 6

Artículo enviado a la revista Applied Surface Science, con el título “Comparison of in vitro behavior of as-sprayed, alkaline-treated and collagen-treated bioceramic samples obtained by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray”.

Equivalencias nomenclatura artículo-tesis:

Tablas

| | |
|---|-------|
| 1 | XI.1. |
|---|-------|

Figuras

| | |
|---|-------|
| 1 | XI.1. |
| 2 | XI.2. |
| 3 | XI.3. |
| 4 | XI.4. |
| 5 | XI.5. |
| 6 | XI.6. |
| 7 | XI.7. |
| 8 | XI.8. |

Elsevier Editorial System(tm) for Applied Surface Science
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Comparison of in vitro behavior of as-sprayed, alkaline-treated and collagen-treated bioceramic samples obtained by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray

Article Type: Research Paper

Keywords: In vitro tests; coatings; hydroxyapatite; collagen; nanostructure

Corresponding Author: Ms. Hortensia Melero,

Corresponding Author's Institution: Thermal Spray Centre

First Author: Hortensia Melero

Order of Authors: Hortensia Melero; Natália Garcia-Giralt; Javier Fernández; Adolfo Díez-Pérez; Josep Maria Guilemany

Manuscript Region of Origin: SPAIN

Suggested Reviewers: Mingxing Zhang
University of Queensland
mingxing.zhang@uq.edu.au
Related field (surface engineering)

John S. Colligon
Manchester Metropolitan University
J.Colligon@mmu.ac.uk
Related field (surface engineering and biomaterials)

Anoop N. Samant
University of Arkansas
asamant@uark.edu
Related field (surface engineering)

***Highlights (for review)**

Highlights:

Two surface treatments were compared to improve bioactivity of sprayed coatings.

As-sprayed and alkaline- and collagen- treated samples were analysed.

Collagen treated samples showed the best biological behaviour.

Alkaline treated samples showed an intermediate bioactivity.

Collagen can be successfully bonded to hydroxyapatite-TiO₂ coatings.

***Manuscript**

[Click here to view linked References](#)

Comparison of in vitro behavior of as-sprayed, alkaline-treated and collagen-treated bioceramic samples obtained by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray

H Melero^{1*}, N Garcia-Giralt², J Fernández¹, A Díez-Pérez^{2,3} and J M Guilemany¹

¹ Thermal Spray Centre - Universitat de Barcelona. Martí i Franqués, 1, 08028 Barcelona, Spain

² URFOA, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), RETICEF. Doctor Aiguader, 80, 08003 Barcelona, Spain

³ Servei de Medicina Interna, Hospital del Mar, Barcelona

* Corresponding author

Hortensia Melero

Thermal Spray Centre - Universitat de Barcelona. Martí i Franqués, 1, 08028 Barcelona, Spain

Phone: (+34) 93 603 823 033

Fax: (+34) 93 402 16 38

e-mail: hortensia.melero.correas@gmail.com

Abstract

Hydroxyapatite (HAp)-TiO₂ samples obtained by high velocity oxy-fuel spray (HVOF), that had previously proved an excellent mechanical behaviour, were innovately treated on their surface in order to improve their biological performance. The chosen treatments were an alkaline treatment to induce an increase of –OH radicals on surface (especially on TiO₂ zones), and a collagen treatment to bond collagen fibrils to –OH radicals present in hydroxyapatite. These coatings were analysed by scanning electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy and infrared spectroscopy, as well as tested for human osteoblast biocompatibility and functionality. In the case of alkaline treatment, although the density of –OH radicals was not increased compared to as-sprayed coatings, a nanostructured layer of sodium hydroxycarbonate precipitated on surface, improving biological behaviour as a consequence of nanoroughness effect. For the collagen-treated samples, collagen fibrils appeared well-adhered to the surface, and *in vitro* cell culture tests showed that these surfaces allowed an excellent cell adhesion and differentiation, better than the as-sprayed and alkaline-treated samples. These results pointed the collagen-treatment as a very promising way to improve bioactivity of HAp-TiO₂ thermal-sprayed coatings.

Key-words: In vitro tests, coatings, hydroxyapatite, collagen, nanostructure

I. Introduction

Nowadays, population ageing is a worldwide phenomenon [1] associated with many problems. One of the most important is the increase of common diseases in elderly people [2,3], such as joint dysfunctions [4]. Metallic materials have been used since the first replacements for their mechanic properties [5], but it was soon noticed that bone growth was not allowed directly on their surface [6]. To solve this problem, hydroxyapatite (HAp) coatings, preferentially obtained by plasma-spraying, have been used for decades to improve in vivo behavior of implants [7,8]. Many studies have shown the problems inherent in this procedure, such as thermal degradation or lack of adhesion and cohesion after a few days at physiological conditions [9,10]. Other coating compositions and obtention techniques have been evaluated to find a suitable alternative to these industrial coatings [11]. Good results and an improvement in long-term performance have been obtained by combining HAp with other ceramics [12,13], or with a tougher phase as carbon nanotubes [14,15], and by using bond layers between the bioceramic coatings and the metal substrate [16].

Another approach for implant devices has been to replace biocompatible coatings on the metal implant with different treatments applied directly to the metal surface to improve the biological behavior. Some examples are alkaline treatments to increase the density of hydroxyl groups on the surface [17,18], which promote the migration of adhesion proteins to this area [19]. Alkaline treatments have been found to improve bioactivity, particularly on metallic surfaces, but also in ceramic (TiO_2) phases. According to Chen et al. [17] and Zhao et al. [18], an extra formation of -OH bonds onto the TiO_2 zones, or a formation of sodium titanate for TiAlV surfaces [20], that

would give an additional bioactivity to the base material, could be expected. Other possibilities derived from this involve grafting peptides (a very common option are peptides with the recognition sequence RGD) [21,22] or proteins present in the physiological environment (collagen is a good example) [23,24] onto the treated surface. According to many studies, collagen is a bioactive compound that induces the expression of osteogenic genes directly [25], which leads to the formation of new bone [26]. Impregnation of the base material [27] as well as a direct bond through –OH radicals [28], in general for metallic surfaces were considered in literature, as well as the formation of HAp-collagen coatings through biomimetic approaches. On the contrary, no studies were found to graft collagen onto –OH radicals present on hydroxyapatite coatings.

The aim of this study was to combine both approaches, comparing different treatments to improve bioactivity, after the deposition of a HAp-TiO₂ coating through high velocity oxy-fuel, at the spraying conditions that, according to previous analyses performed by our team, gave the best mechanical properties [29] but the worst biological behavior (results will soon be published).

As-sprayed samples, samples with an alkaline treatment (to try to increase –OH density on TiO₂ zones) and samples grafted with collagen through –OH radicals of hydroxyapatite were seeded with osteoblasts, and cell viability and differentiation were analyzed.

II. Experimental method

II.1. Preparation of the samples

The initial powder was a mechanical mixture of a Sulzer-Metco TiO₂ (rutile) powder (20wt%) and a Plasma-Biototal Ltd. hydroxyapatite powder (80wt%). It was sprayed onto a previously grit-blasted Ti6Al4V substrate (5x5 mm² sheets) with a Sulzer-Metco DJH 2600 HVOF system. The powder characterization has been reported elsewhere [30], and the spraying conditions are listed in Table 1.

An alkaline treatment was applied to as-sprayed samples in order to increase –OH density on surface, which according to literature should have a positive effect on surface biocompatibility, and compare its properties with as-sprayed samples. This treatment was an immersion for 24h in a 5M NaOH solution at 80°C.

A collagen treatment was carried out for as-sprayed samples to graft this protein directly to the –OH present in the studied surfaces. The employed protocol was based on the protocols proposed by references [28,31] for TiO₂ and Ti surfaces: type I collagen (Sigma-Aldrich) was dissolved in 40 mM acetic acid, obtaining a final concentration of 4 mg/mL. The resulting solution was then diluted 1:10 with deionized water until a final concentration of 0.4 mg/mL. The samples were immersed in the prepared solution overnight at 4°C, then for 48h at 37°C, followed by drying at room temperature.

II.2. Microstructural study of the coatings

Samples surfaces were observed using a scanning electron microscope after being completely dried (critical point drying in the case of collagen-treated surfaces) and sputtered. Analyses using Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were also carried out in order to identify whether new elements had been incorporated on the free surface. The same process was followed with the cross-section of the samples, after

metallographic preparation, to verify that the structural integrity of the samples was preserved. Infrared spectroscopy was used to identify the functional groups present in each sample surface.

II.3. Cell culture and *in vitro* tests

Human osteoblasts were obtained from the trabecular bone of total knee replacement surgery patients, following the protocol described by Nacher et al. [32]. The study was conducted in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki, revised in 1983, and with the approval of the Hospital del Mar-IMIM Ethics Committee. Written informed consents were obtained before patient surgeries. Bone was cut into explants of 1-2mm, washed in phosphate-buffered solution (PBS) to remove blood, marrow cells and any other soft tissue, and placed into a 10 cm diameter Petri dish containing 20 mL Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), penicillin (100 UI/mL), streptomycin (100 UI/mL) and ascorbic acid (100 mg/ml) (Invitrogen). The explants were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, changing the medium twice a week until cell confluence. Full plate coverage was obtained at four to five weeks, at which point cells were treated with 0.25% trypsin/EDTA (Biological Industries), subcultured or frozen with liquid nitrogen.

All the coated samples were sterilized by gamma radiation (25kGy) and placed on a 24-well polystyrene culture plate (Nunc A/S) with Hanks' balanced solution (HBSS, Sigma Aldrich) overnight at room temperature before material seeding. After removing Hanks' solution, wells were seeded with 20000 cells for viability studies and SEM observation, and with 50000 for cell differentiation studies. The medium employed for

adhesion, proliferation and morphology studies was DMEM supplemented with 10% FBS. The same medium was used for the differentiation assays, but supplemented with 10^{-8} M of vitamin K and D.

Before cell behavior evaluation, specimens were removed from the original well and put into another one, to ensure that the results obtained were provided only by the cells adhered on the studied coating. Osteoblasts cultured in polystyrene wells were used as a positive control in differentiation tests. In this case, a quarter of the number of cells employed for seeding material surface (around 12500) were seeded on the plate polystyrene wells, to balance out the cell number with regard to the materials. Materials without seeded cells were employed as negative controls, and their respective values were subtracted from the absolute values obtained for each case.

LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for Mammalian Cells (Invitrogen) was used to characterize osteoblast attachment, viability and distribution over the surfaces. Green-fluorescent calcein-AM dyes live cells, indicating intracellular esterase activity; red-fluorescent ethidium homodimer-1 stains dead cells, showing loss of plasma membrane integrity. The surfaces were then observed with a Leica DM 1000 fluorescent microscope. Two samples for each culture time and case were observed.

Osteoblast differentiation was evaluated measuring alkaline phosphatase (ALP) activity, with Abcam's Alkaline Phosphatase Assay Kit. The transformation from p-nitrophenyl phosphate (phosphatase substrate) to p-nitrophenol (yellow) by ALP, is the basis of the assay. The resulting absorbance was measured using a scanning multi-well spectrophotometer, at 405 nm. Six to eight samples for each culture time and case were measured.

Osteoblasts on the coating surfaces were fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer for 2 h at 4°C, followed by conservation in cacodylate buffer until progressive dehydration with alcohol and critical point drying for cell morphology evaluation using SEM. Osteoblasts were observed using a Jeol JSM-840 microscope, after being sputtered to make them conductive. Two samples for each culture time and case were observed.

III. Statistics

The results obtained for the differentiation assays samples (n=6-8) were analyzed to establish if for each study time, the differences among cases were significant. ANOVA, through the employ of Minitab software, was used for this purpose. In the corresponding figure, the significant difference of one sample with the rest of them (for each study time) is marked with an asterisk over the data column (confidence interval of 95%).

IV. Results and discussion

IV.1. Microstructural integrity and study of the surfaces

One of the main requirements of the post-spraying treatments is to have the minimum effect on the properties of the coatings, in order to maintain their functionality [29]. Cross-sections of the coatings were observed by SEM after the treatments in order to evaluate whether the structure conserved its continuity and consistency (Figure 1).

No differences were found among the three tested coatings. Cohesion between layers and pore distribution were very similar. No significant amount of the coatings was dissolved in any of the samples, and the coating-substrate interphase maintained similar continuity in all cases. It was previously reported [30] that after immersion in solutions similar to plasma, a fast dissolution of HAp amorphous phases appeared which reduced the adhesion of the coating to the substrate. The fact that that this dissolution did not appear for these treatments is considered an indicator that both treatments could be acceptable with regard to mechanical functionality of the coatings.

Although microstructural observation did not show considerable alteration of the interfaces, further research should be carried out in order to ensure that the mechanical properties are effectively conserved.

Figures 2a to c show the surfaces of the three studied coatings. Figure 2a presents the typical surface of an as-sprayed sample of similar materials [33]. Splats, as well as unmelted particles and splashes of the melted particles can be identified in the micrographs. EDX spectrum showed the expectable elements, Ca, P, Ti, O, and Au from sputtering. Calcium and phosphate were present in the initial powder, hydroxyapatite, but were also present in new phases produced after the thermal degradation during spraying, as tricalcium phosphates (α -TCP); Ti was due to the initial presence of rutile, but also to the presence of other titania phases after the thermal spray (anatase) (as found in previous studies performed by our team [29]).

The NaOH treated surface (Figure 2b) showed clear differences with the previous one. Many elements present in the EDX spectrum were the same than in the as-sprayed sample, as it could be expected. The structure appears as very similar, but covered

with flower-like precipitates in many zones, with nanometric size. This precipitates could correspond to sodium that was attracted by the negative charge (OH^- of hydroxyapatite) of the surface. A cross-section of the region of the coating near the surface was mapped (atomic distribution is shown in Figure 3), and results make this assertion appear as evident. The sodium was deposited on the surface, preferentially on the calcium phosphate zones, while the Ti zone was free of sodium.

Figure 2c indicates that the structure of the surface of the collagen-treated coating is similar to the as-sprayed coating one. The only noticeable difference is the lower amount of splashes. These splashes, which were less adhered to the coating, could have been removed after the treatment due to the successive rinses. Collagen fibrils were not observed at these magnifications, and EDX results did not show considerable differences with as-sprayed coatings.

FESEM images were also obtained (Figure 4) in order to identify the collagen on surface. Collagen fibrils, pointed by red arrows, were completely visible at higher magnifications. The fact that the samples were rinsed with PBS and distilled water many times, as well as immersed in alcohol and dried, was considered an indicator of the existence of a direct bond between the collagen and the coating. This collagen, that remained on the surface, was well bonded to it (either mechanically, as the collagen fibrils into the surface pores, or chemically), and not just deposited.

IV.2. Infrared spectroscopy spectra

Coatings were analyzed by infrared spectroscopy in order to identify functional groups (Figure 5). Figure 5a shows the presence of $-\text{OH}$ radicals on the as-sprayed coatings and the consequent negative charge of the surface, which was expected according to

literature [34]. These samples showed a clear peak around a wavelength of 3574cm^{-1} , due to the presence of $-\text{OH}$ radicals on the surface, which corroborates the previous assertion that, for the NaOH treated sample, the sodium migrated to these radicals and precipitated on surface. The NaOH-treated sample still presents an $-\text{OH}$ peak, which could be attributed to the existence of $-\text{OH}$ that was not covered by the precipitated sodium, as well as the possible new formation of $-\text{OH}$ radicals over the titania zones after the NaOH treatment [17,18].

A noticeable difference between the NaOH-treated sample and the as-sprayed one is the presence of carbonate, detected by peaks at around 2920 , 2496 and 876 cm^{-1} (Figure 5b). After the treatment in an aqueous alkaline solution at 80°C for 24h, the presence of carbonate was detected. The carbonate substitution in hydroxyapatite provides a better *in vitro* behavior than the obtained for not-substituted hydroxyapatite [35], mainly because of the physical characteristics induced, such as the variation of the grain size of the hydroxyapatite [36]. In this case, and according to Cerruti and Mortera [37], the carbonate is present on surface as a consequence of carbonation in presence of an excess of water, under the form of a layer of hydroxycarbonate. As sodium was also present on surface, it can be argued that the precipitation on surface detected by SEM is a nanostructured sodium hydroxycarbonate.

The presence of collagen on the surface of collagen-treated sample was identified by the peaks typical of proteins, at around 1646 and 1556 cm^{-1} (Figure 5c), corroborating the observations made for FESEM images.

IV.3. *In vitro* tests

Fluorescent live/dead staining was carried out in order to test the viability and distribution of osteoblasts cultured on the three studied coatings. At 1 and 3 days there were still few cells on surface (data not shown), but at 7 days there were enough cells to make a comparison among the three coatings (Figure 6). In the non-treated sample, the number of cells on surface is much lower than for the treated samples. Both treatments, specially the collagen one, clearly improved cell adhesion and growing, but death cells were not detected for any case. The osteoblastic bioactivity of the collagen proved its effectiveness in the corresponding samples. In the NaOH treated samples, the presence of $-OH$ radicals was not considered to be causative of this positive effect, as they were also present for the as-sprayed sample, nor the presence of sodium, which has an important role in bone density [38], though not through direct contact. However, the fact that a nanostructured layer of sodium hydroxycarbonate had precipitated on surface could be also a cause of the improvement of cell behavior, because of the well-known bioactivity of nanometric roughness, that increases surface energy, and leads to higher select protein interactions to increase specific cell adhesion [39,40].

Alkaline phosphatase activity was measured until 7 days post-culture (Figure 7) in order to test osteoblast differentiation status in the biomaterial cultures. At first day of culture, ALP activity, although significant differences between cases were detected, was considered still too low to draw any conclusion. The differences became important among the three studied cases after the third day of culture. NaOH-treated cases showed a better behavior than the as-sprayed samples although values did not reach control results. Cells seeded on the collagen-treated samples achieved the best ALP activity, with values comparable to positive controls at three days of culture and higher

at 7 days. These differences among the cases were attributed, as explained in the previous section, to the osteogenic bioactivity promoted by the presence of collagen in the collagen-treated samples, and to the bioactivity induced by the nanometric sodium carbonate precipitate in the alkaline-treated samples. Although both treatments represent an improvement of *in vitro* cell behavior, the difference is especially noticeable for the collagen-treated sample, which presented ALP activities higher than the positive control and much higher than as-sprayed samples at 7 days of culture.

Samples were studied by SEM to evaluate cell morphology and attachment to the surfaces. As-sprayed samples (Figure 8a) presented low cellular density with wide zones without cells. Although the cells preserved the osteoblastic shape, with filopodia extending over the surface, the as-sprayed samples could not create a microenvironment where osteoblasts could adhere and proliferate easily. In contrast, NaOH and collagen-treated samples (Figure 8b), presented a higher amount of cells on their surfaces, where it is even possible to identify CaP globules (see red arrows in Figures 8a and 8b), an indication of the beginning of mineralization arising from cell differentiation. Especially the collagen-treated sample shows a higher cell density than the NaOH-treated sample, which is again a proof of the better osteogenic behavior of the collagen over the other studied possibilities.

V. Conclusions

A base material that proved excellent mechanical performance, HAp combined with rutile HVOF-sprayed underwent two different treatments to improve its biological behavior. Biological response to surfaces demonstrated important differences: the

alkaline treatment facilitated cell behavior on the surface, and the collagen treatment, which was not used before for HAp coatings, appeared as the best option, with excellent osteoblast viability and differentiation on the treated surfaces. This work demonstrated the effectiveness of the post-spraying collagen-grafting in hydroxyapatite coatings, and opens a door to a future research line on this subject.

VI. References

- [1] J.R. Beard, S. Biggs, D.E. Bloom, L.P. Fried, P. Hogan, A. Kalache, S.J. Olshansky, Global Population Ageing: Peril or Promise. Geneva: World Economic Forum; 2011.
- [2] World Health Organization. Global Health and Aging. NIH Publication 11-7737; 2011.
- [3] J.M. Wiener, J. Tilly, Population ageing in the United States of America: implications for public programmes. *Int J Epidemiol* 31 (2002) 776-781.
- [4] A.D. Woolf, B. Pflieger, Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81 (2003) 646-656.
- [5] H.U. Zwicker, H.J. Schmid, Mechanical properties of metallic materials for longterm use in highly stressed locomotor systems. *Eng Med* 2 (1976) 257-272.
- [6] C. Ali, L. Bacakova, P. Dungal, J FencI, R. Kubes, Z. Matejovsky, Adhesion, growth and differentiation markers in human osteoblast-like cells cultured on Surface-modified metallic materials designed for bone implants. *J Bone Joint Surg Br* 92 (2010) 614-617.
- [7] K. De Groot, R. Geesink, C.P. Klein, Plasma-sprayed coatings of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* 21 (1987) 375-381.

- [8] K. Soballe, E.S. Hansen, H. Brockstedt-Rasmussen, V.E. Hjortdal, G.I. Juhl, C.M. Pedersen, I. Hvid, C. Bunger, Fixation of titanium and hydroxyapatite-coated implants in arthritic osteopenic bone. *J Arthroplasty* 6 (1991) 307-316.
- [9] J.P. Collier, V.A. Surprenant, M.B. Mayor, M. Wrona, R.E. Jensen, H.P. Surprenant, Loss of hydroxyapatite coating on retrieved, total hip components. *J Arthroplasty* 8 (1993) 389-393.
- [10] J.E. Dalton, S.D. Cook, In vivo mechanical and histological characteristics of HA-coated implants vary with coating vendor. *J Biomed Mater Res A* 29 (1995) 239-245.
- [11] H. Melero, J. Fernández, J.M. Guilemany, Recubrimientos bioactivos: hidroxiapatita y titania. *Biomecánica* 19 (2011) 35-48.
- [12] M.F. Morks, Fabrication and characterization of plasma-sprayed HA/SiO₂ coatings for biomedical application. *J Mech Behav Biomed Mater* 1 (2008) 105-111.
- [13] M.F. Morks, N.F. Fahim, A. Kobayashi, Structure, mechanical performance and electrochemical characterization of plasma-sprayed SiO₂-Ti-reinforced hydroxyapatite biomedical coatings. *Appl Surf Sci* 255 (2008) 3426-3433.
- [14] K. Balani, R. Anderson, T. Laha, M. Andara, J. Tercero, E. Crumpler, A. Agarwal, Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 28 (2007) 618-624.
- [15] K. Balani, Y. Chen, S.P. Harimkar, N.B. Dahotre, A. Agarwal, Tribological behavior of plasma-sprayed carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite coating in physiological solution. *Acta Biomater* 3 (2007) 944-951.
- [16] R. Tomaszek, L. Pawlowski, L. Gengembre, J. Laureyns, A. Le Maguera, Microstructure of suspension plasma sprayed multilayer coatings of hydroxyapatite and titanium oxide. *Surf Coat Technol* 201 (2007) 7432-7440.

- [17] D. Chen, E.H. Jordan, M. Gell, M. Wei, Apatite formation on alkaline-treated dense TiO₂ coatings deposited using the solution precursor plasma spray process. *Acta Biomater* 4 (2008) 553-559.
- [18] X. Zhao, X. Liu, C. Ding, P.K. Chu, *In vitro* bioactivity of plasma-sprayed TiO₂ coating after sodium hydroxide treatment. *Surf Coat Technol* 200 (2006) 5487-5492.
- [19] V. Milleret, S. Tugulu, F. Schlottig, H. Hall, Alkali treatment of microrough titanium surfaces affects macrophage/monocyte adhesion, platelet activation and architecture of blood clot formation. *Eur Cell Mater* 21 (2011) 430-444.
- [20] C.X. Wang, X. Zhou, M. Wang, Mechanism of apatite formation on pure titanium treated with alkaline solution. *Biomed Mater Eng* 14 (2004) 5-11.
- [21] J.Y. Choi, U.W. Jung, C.S. Kim, T.K. Eom, E.J. Kang, K.S. Cho, C.K. Kim, S.H. Choi, The effects of newly formed synthetic peptide on bone regeneration in rat calvarial defects. *J Periodontal Implant Sci* 40 (2010) 11-18.
- [22] H. Schliephake, D. Scharnweber, M. Dard, S. Rössler, A. Sewing, J. Meyer, D. Hoogestraat, Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 13 (2002) 312-319.
- [23] W.J. Chang, K.L. Ou, S.Y. Lee, J.Y. Chen, Y. Abiko, C.T. Lin, H.M. Huang, Type I collagen grafting on titanium surfaces using low-temperatures glow discharge. *Dent Mater J* 27 (2008) 340-346.
- [24] Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, C. Poh, W. Wang, Titanium with Surface-grafted dextran and immobilized bone morphogenetic protein-2 for inhibition of bacterial adhesion and enhancement of osteoblast functions. *Tissue Eng Part A* 15 (2009) 417-426.

- [25] H.W. Kim, L.H. Li, E.J. Lee, S.H. Lee, H.E. Kim, Fibrillar assembly and stability of collagen coating on titanium for improved osteoblast responses. *J Biomed Mater Res A* 75 (2005) 629-638.
- [26] M. Morra, C. Cassinelli, L. Meda, M. Fini, G. Giavaresi, R. Giardino, Surface analysis and effects on interfacial bone microhardness of collagen-coated titanium implants: a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20 (2005) 23-30.
- [27] H.F. Hildebrand, N. Blanchemain, G. Mayer, F. Chai, M. Lefebvre, F. Boschin, Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. *Surf Coat Technol* 200 (2006) 6318-6324.
- [28] B. Li, X. Liu, C. Cao, C. Ding, Biocompatibility and antibacterial activity of plasma sprayed titania coating grafting collagen and gentamicin. *J Biomed Mater Res A* 83 (2007) 923-30.
- [29] H. Melero, M. Torrell, J. Fernández, J.R. Gomes, J.M. Guilemany, Tribological characterization of biocompatible HAp-TiO₂ coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray. *Wear* 305 (2013) 8-13.
- [30] H. Melero, J. Fernández, S. Dosta, J.M. Guilemany, Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad. *Bol Soc Esp Ceram V* 50 (2011) 59-64.
- [31] J. Hauser, M. Koeller, S. Bensch, H. Halfmann, P. Awakowicz, H.U. Steinau, S. Esenwein, Plasma mediated collagen-I-coating of metal implant materials to improve biocompatibility. *J Biomed Mater Res A* 94 (2010) 19-26.
- [32] M. Nàcher, J. Aubia, S. Serrano, M.L. Mariñoso, J. Hernández, J. Bosch, A. Díez, J.M. Puig, J. Lloveras, Effect of cyclosporine A on normal human osteoblasts in vitro. *Bone Miner* 26 (1994) 231-243.

- [33] M. Gaona. Recubrimientos biocompatibles obtenidos por Proyección Térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. PhD Thesis. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2007.
- [34] E.M. Rivera-Muñoz, Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. In: Prof. Reza Fazel, editor. Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges. In Tech; 2011.
- [35] N. Ohashi, M. Nakamura, A. Nagai, Y. Tanaka, Y. Sekijima, K. Yamashita, Comparison of hydroxyapatite with carbonate apatite in osteoclastic cell resorptive activity. *Key Eng Mater* 361-363 (2008) 1039-1042.
- [36] A. Porter, N. Patel, R. Brooks, S. Best, N. Rushton, W. Bonfield, Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. *J Mater Sci Mater Med* 16 (2005) 899-907.
- [37] M. Cerrutti, C. Mortera, Carbonate formation on bioactive glasses. *Langmuir* 20 (2004) 6382-6388.
- [38] R.P. Heaney, Role of dietary sodium in osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 25 (2006) 271S-276S
- [39] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res A* 51 (2000) 475-483.
- [40] T. Raimondo, S. Puckett, T.J. Webster, Greater osteoblast and endothelial cell adhesion on nanostructured polyethylene and titanium. *Int J Nanomedicine* 5 (2010) 647-652.

Anexo 7

Artículo en trámites de publicación en la revista Journal of Thermal Spray Technology, con el título “Comparing two antibacterial treatments for bioceramic coatings at short culture times”.

Equivalencias nomenclatura artículo-tesis:

Tablas

| | |
|---|-------|
| 1 | XI.1. |
|---|-------|

Figuras

| | |
|---|--------|
| 1 | XI.20. |
| 2 | XI.21. |
| 3 | XI.22. |
| 4 | XI.23. |
| 5 | XI.24. |
| 6 | XI.25. |
| 7 | XI.26. |



Comparing two antibacterial treatments for bioceramic coatings at short culture times

| | |
|---|--|
| Journal: | <i>Journal of Thermal Spray Technology</i> |
| Manuscript ID: | JTST-13-09-1843 |
| Select "Peer-Reviewed Paper" unless otherwise advised.: | Peer-Reviewed Paper |
| Date Submitted by the Author: | 06-Sep-2013 |
| Complete List of Authors: | Melero, Hortensia; Thermal Spray Centre, Madrid, Cristina; Universitat de Barcelona, Departament de microbiologia Fernández, Javier; University of Barcelona, Material Science and Metallurgical Engineering Guilemany, Jose Maria; University of Barcelona, Materials Science and Engineering |
| Area of Expertise/Keywords: | biomaterials < Applications, antibacterial coatings < Applications, hydroxyapatite < Feedstock, TiO2 < Feedstock, HP/HVOF < Processing |
| | |



Comparing two antibacterial treatments for bioceramic coatings at short culture times

H Melero¹, C Madrid², J Fernández¹, JM Guilemany¹

¹ Thermal Spray Centre - Universitat de Barcelona. Martí i Franqués, 1, 08028 Barcelona, Spain

² Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

* Corresponding author

Hortensia Melero

Thermal Spray Centre - Universitat de Barcelona. Martí i Franqués, 1, 08028 Barcelona, Spain

Phone: (+34) 93 603 823 033

Fax: (+34) 93 402 16 38

e-mail: hortensia.melero.correas@gmail.com

Abstract

As infection after joint replacement surgery is one of the most critical concerns when considering implant performance, it is necessary to study possible ways to reduce or eliminate it. Two treatments were chosen for this study: addition of a percentage of ZnO, and immersion in gentamicin for 24 h. Furthermore, three bacteria were considered: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The evolution of bacteria viability in solution was measured at 0, 2 and 4 hours; and plate assays were performed to study antibacterial effects by diffusion. The results show an important antibacterial effect of the as-sprayed coating, attributed to the presence of –OH radicals on the surface. The presence of ZnO did not have any additional influence on bacteria viability, but gentamicin-treated samples showed an improvement in antibacterial behaviour for gram-positive and gram-negative bacteria in solution, as well as a bactericidal effect in diffusion conditions. Further research over longer times is required to study the release kinetics of zinc ions and gentamicin.

I. Introduction

Infection in joint prostheses has been a major concern for years as it is the main cause of implant failure after short implantation times [1]. Prosthesis implantation requires exceptional asepsis because of the large exposition area and the influence of a massive implant that lead to an important contamination risk [2]. The patient's skin, airborne particles of the medical staff or contaminated surgical material are the main sources of bacteria found in infected prostheses after removal [2,3], which means that bacteria such as *S. aureus*, or different kinds of *Pseudomonas* or *Streptococcus* are some of the most common in these situations [3,4].

As infection has devastating effects on the patient, research into possible solutions to this problem is a pressing field. In recent years, improvements in operational theatre design and

the use of systemic or local antibiotics and other antibacterial compounds directly present on the implant have decreased infection rates [3].

Among the use of these antibacterial compounds, the use of nanometric species is very well-known and has many advantages. A small particle size, high surface area and the capacity to produce oxygen species make nanometric species toxic, and this toxicity can be harnessed for bactericide purposes [5]. ZnO nanoparticles are commonly used, due to the proven toxicity of the dissolved metallic ions, and the generation of oxyradical species in solution (this oxidative stress weakens and kills many kinds of bacteria). Furthermore, ZnO is itself an essential micro-nutrient for eukaryote organisms, and a “safe” product widely used in personal care [6].

Another possibility considered to prevent infection directly on the prosthesis is antibiotic loading. This approach is very common for bone cements [7] or biomimetic hydroxyapatite coatings [8], where it is easy to incorporate the antibiotic into the production of the cement or coating. Gentamicin sulphate, which belongs to the aminoglycoside antibiotic family, is extremely efficient against the majority of microorganisms responsible for bone infection, even when the infection is deep. It is therefore one of the most employed antibiotics, extensively used with success in orthopaedics since 1970s, in combination with bone cements [9].

This work focuses on a first comparison between the two approaches cited above applied to hydroxyapatite-titania coatings obtained by high-velocity oxy-fuel spraying. The production process of the treated coatings, as well as the bacterial tests performed with three bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) at different short times are reported in this paper.

II. Experimental method

The initial powder was a combination that previously proved to have good biological and mechanical properties [10]. It was a mechanical mixture of a Sulzer-Metco rutile powder (20wt%) and a Plasma-Biotol Ltd. hydroxyapatite powder (80wt%), and its characterization is reported elsewhere [11]. The substrate used was a previously grit-blasted Ti6Al4V (5x5 mm² sheets), and the thermal spray equipment was a Sulzer-Metco DJH 2600 HVOF system. The spraying conditions are listed in Table 1.

The ZnO was an American Elements agglomerated nano-powder. Its granulometric distribution was analysed by laser light scattering (Beckman Coulter LS 13320), and the morphology observed by scanning electron microscopy (SEM), with a Jeol JSM-5310 equipment. The phases present were analysed by X-ray diffraction. The powder was incorporated into the previous mixture in percentages of 2wt% and 5wt% [6, 12, 13], and the resulting mixture was sprayed using the same conditions as for the initial powder.

The sulphate gentamicin (Sigma Aldrich) treatment, after initial tests, was chosen to be 24-hour immersion in Hank's solution with a concentration of 2 mg/mL, at 37°C, followed by 60 minutes of drying at 55°C [9, 14, 15].

The surface of the coatings was observed by SEM, in order to identify changes in the microstructure. Additionally, energy-dispersive X-ray spectroscopy was used to analyse the

three surfaces and to identify element distribution, and infrared spectroscopy was used to identify functional groups in the as-sprayed samples.

The antibacterial activity of ZnO-treated and gentamicin-treated samples was tested against the Gram negative *E. coli* CECT405 and *P. aeruginosa* CECT116, and the Gram positive *S. aureus* CECT 239, obtained from the Spanish Type Culture Collection. Overnight cultures of bacteria on LB medium at 37°C with aeration were diluted into a fresh medium, and incubated until the culture reached an optical density of 0.6 OD at 600 nm (mid logarithmic phase of growth). The cells were harvested by centrifugation (5 min; 3000 xg), washed twice with Ringer ¼ solution, and adjusted to a final optical density of 0.6-0.7 (600 nm) with Ringer ¼ solution. All the samples were poured into a vial with 1 ml of a 1:10 dilution of the bacterial suspension in Ringer ¼ solution. The initial bacteria concentration in the vial was approximately 5×10^7 CFU/mL. To ensure that any decrease in the bacterial number was due to the exposure to different samples, a control was included with bacterial cells at the same initial concentration in Ringer ¼ solution without any sample. The bacterial suspensions were incubated for up to 4 h at 37°C and 200 rpm. Samples were taken at the beginning (0 h) and after 2 and 4 h. After appropriate dilutions, the samples were plated in LB agar and incubated at 37°C. The viable bacteria were monitored by counting the number of colony-forming units from the appropriate dilution. To assay the antibacterial effect by diffusion in plates, suspensions of the bacteria to be assayed were prepared and dispersed in solid medium (LB agar plates), and the different samples were dropped in different zones on the agar plate. After overnight incubation at 37°C, the presence of inhibition growth zones was determined.

III. Results and discussion

ZnO XRD characterization revealed that the powder was in a crystalline wurtzite phase. Its granulometric distribution, a Gaussian bell curve between 10 and 50 microns, was very similar to those of the other two powders. The morphology of the particles can be observed in Figure 1. They had a spherical shape and porous structure resulting from the agglomeration of the nanopowder.

The observation of the coating surfaces by SEM (Figure 2a to c) showed that the surface of the as-sprayed sample is typical in this kind of spray process. Splats, unmelted particles and splashes of the melted particles can be identified in the micrographs. EDX analysis indicated, as expected, the elements present in the initial powder and the derived phases (tricalcium phosphates and anatase), Ca, P, Ti, O, C. Infrared spectroscopy of these samples (Figure 3) allowed the identification of a peak indicating the strong presence of –OH radicals on the surface.

The surface of the sample with ZnO (Figure 2b) was very similar to that of the as-sprayed one. The presence of small amounts of ZnO did not influence the surface microstructure. EDX analysis showed the presence of the expected elements (the same than for the HAp-TiO₂ samples) and also a peak corresponding to zinc. Quantification indicated that the amount of zinc by weight was very close to the amount in the initial powder: 1.7wt% for the sample with 2wt% ZnO into the powder mixture; and 4.4wt% for the sample with 5wt% ZnO into the powder mixture. The ZnO was therefore considered to be incorporated into the coating.

The surface of the gentamicin-treated sample (Figure 2c) showed the typical microstructure of a bioceramic coating after a 24 h of immersion under physiological conditions. An apatite layer

on the surface had started nucleation in different zones, in the form of globules. EDX analysis identified nitrogen (present in the gentamicin) on the surface, but the limitations of the equipment made it extremely difficult to detect this element. Only the expected elements (present in the initial powder mixture), plus peaks corresponding to sodium and chlorine (present in Hank's solution) appeared. An EDX mapping of the cross section (Figure 4) revealed that sodium chloride penetrated to the layers near the substrate, by interconnected porosity derived from the partial dissolution of the coating after 24 h of immersion. The presence of a sodium chloride precipitation deep in the coating could be interpreted as an indicator of the presence of the gentamicin at the same levels. One consequence that could be expected is a slow liberation of the gentamicin over time, as this gentamicin must be released from such a deep level. The progressive coverage of the surface by an apatite layer is also expected to act as a stopper and help the prevention of the complete liberation of the antibiotic in the initial stage of implantation.

The bacterial test results are shown in Figures 5 and 6. The results with the samples with ZnO (Figure 5) indicate that the addition of this compound did not have a significant effect on the behaviour of any of the three bacteria. The non-treated sample showed an equivalent antibacterial effect as the samples with zinc oxide; or even higher. The infrared spectra of the non-treated sample showed an important peak attributed to the presence of -OH radicals. According to the literature [20,21], these radicals are an important factor in the bactericide compounds, and cause an oxidative stress that has a strong effect on some kinds of bacteria. This could explain the antibacterial effect of the as-sprayed samples. The bactericidal effect was similar for the three bacteria, which could be an indicator of the effect of oxidative stress on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The mere presence of the coatings reduces by approximately 4-5 orders of magnitude the presence of bacteria in the solution with regard to the controls, and consequently the presence of bacteria is reduced 100%. An interpretation of the slightly lower bactericide effect of the ZnO samples could be the lower presence of -OH radicals on the surface due to the partial coverage of the surface with ZnO. The fact that a well-known bactericide compound such as ZnO showed no effect in this case could be attributed to the bactericidal effect of zinc only for Zn^{2+} concentrations above 4-8 mM (the minimum inhibitory concentration) [6], and it is possible that this concentration was not reached in these cases. Further research is required to clarify the evolution of the concentration of zinc ions in solution at different culture times.

Concerning the tests with gentamicin, the results in Figure 6 show that the blank coating (without gentamicin) also induced a reduction of bacteria viability; again a sign of the important antibacterial effect of the non-treated samples (the reduction of the viability was nearly 100%). Nevertheless, an improvement was detected for the treated samples. The addition of gentamicin clearly allowed an extra antibacterial effect against Gram-negative bacteria (which is especially important for resistant microorganisms such as *P. aeruginosa*), whereas for *S. aureus* there was no marked difference with and without gentamicin.

Antibactericidal tests under diffusion conditions allowed the identification of differences between the samples. As an example, the *E. coli* assay can be observed in Figure 7. Whereas for the ZnO and the non-treated samples the antibactericidal effect by diffusion was not detectable, the gentamicin-treated samples clearly showed a growth inhibition zone around them. This capacity against bacteria by diffusion mechanisms makes the treatment with gentamicin a good alternative, since it combines excellent antibacterial behaviour in solution with an antibacterial effect by contact and diffusion, which makes it more appropriate for

physiological conditions (both solution and diffusion conditions are important in such a situation).

IV. Conclusion

Two treatments were compared over short times in order to establish which one was the most appropriate for biomedical applications. Non-treated samples showed an important bactericidal effect in solution with the three bacteria analysed, provided by the presence of –OH radicals. ZnO was found not to add any extra antibacterial activity to the samples, and the treated coatings showed comparable bactericide effects to the non-treated ones. Nevertheless, it was the gentamicin treatment that showed best behaviour in solution as well as an important antibacterial effect by diffusion. Further research should be performed in order to study the antibacterial behaviour over longer times, and the release kinetics of gentamicin and zinc ions.

V. References

- [1] O.M. Lidwell, E.J.L. Lowbury, W. Whyte, R. Blowers, S.J. Stanley, D. Lowe, Infection and sepsis after operations for total hip or knee-joint replacement: influence of ultraclean air, prophylactic antibiotics and other factors, *J Hyg Camb*, 1984, 93, p. 505-529, in English.
- [2] O.M. Lidwell, R.A. Elson, E.J.L. Lowbury, W. Whyte, R. Blowers, S.J. Stanley, D. Lowe, Ultraclean air and antibiotics for prevention of postoperative infection, *Acta Orthop Scand*, 1987, 58, p. 4-13, in English.
- [3] N. Davis, A. Curry, A.K. Gambhir, H. Panigrahi, C.R.C. Walker, E.G.L. Wilkins, M.A. Worsley, P.R. Kay, Intraoperative bacterial contamination in operations for joint replacement, *The Journal of Bone and Joint Surgery Br.*, 1999, 81-B, p. 886-889, in English.
- [4] S.A. Hedstrom, L. Lidgren, C. Torholm, R. Onnerfalt, Antibiotic containing bone cement beads in the treatment of deep muscle and skeletal infections, *Acta Orthop scand*, 1980, 51, p. 863-869, in English.
- [5] W. Jiang, H. Mashayekhi, B. Xing, Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles, *Environmental Pollution*, 2009, 157, p. 1619-1625, in English.
- [6] I. Perelshtein, G. Applerot, N. Perkas, E. Wehrschetz-Sigl, A. Hasmann, G.M. Guebitz, A. Gedanken, Antibacterial properties of an In Situ generated and simultaneously deposited nanocrystalline ZnO on Fabrics, *Applied Materials & Interfaces*, 2009, 1, p. 361-366, in English.
- [7] H. Wahlig, E. Dingeldein, H.W. Buchholz, M. Buchholz, F. Bachmann, Pharmacokinetic study of gentamicin-loaded cement in total hip replacements, *The journal of bone and joint surgery Br.*, 1984, 66B, p. 175-179, in English.
- [8] V. Alt, A. Bitschnau, J. Osterling, A. Sewing, C. Meyer, R. Kraus, S.A. Meissner, S. Wenisch, E. Domann, R. Schnettler, The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for

cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model, *Biomaterials*, 2006, 27, p. 4627-4634, in English.

[9] M. Teller, U. Gopp, H.G. Neumann, K.D. Kuhn, Release of gentamicin from bone regenerative materials: an in vitro study, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007, 81, p. 23-29, in English.

[10] H. Melero, M. Torrell, J. Fernández, J.R. Gomes, J.M. Guilemany, Tribological characterization of biocompatible HAp-TiO₂ coatings obtained by high velocity oxy-fuel spray, *Wear*, 2013, 305, p. 8-13, in English.

[11] H. Melero, J. Fernández, S. Dosta, J.M. Guilemany, Caracterización de nuevos recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita-TiO₂ obtenidos mediante Proyección Térmica de Alta Velocidad (Characterization of new bioactive coatings of hydroxyapatite and TiO₂ obtained by High-Velocity Oxy-Fuel), *Bol Soc Esp Ceram V*, 2011, 50, p. 59-64, in Spanish.

[12] J.T. Seil, T.J. Webster, Antibacterial zinc oxide nanoparticles in polymer biomaterial composites, *MRS Proceedings*, 2011, 1316, in English.

[13] T. Xu, C.S. Xie, Tetrapod-like nano-particle ZnO/acrylic resin composite and its multifunction property, *Progress in organic coatings*, 2003, 46, p. 297-301, in English.

[14] A. Bignon, F. Laurent, J. Goldnadel, J. Chevalier, G. Fantozzi, E. Viguier, T. Roger, G. Boivin, D. Hartmann, ATLANTIK Genta, a new concept of gentamicin loaded HAp/TCP bone substitute for prophylactic action – In Vitro releasing mechanisms study, *Key Engineering Materials*, 2008, 361-363, p. 1203-1206, in English.

[15] S. Radin, J.T. Campbell, P. Ducheyne, J.M. Cuckler, Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin, *Biomaterials*, 1997, 18, p. 777-782, in English.

[16] M. Gaona, Recubrimientos biocompatibles obtenidos por proyección térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica, PhD Thesis, Universitat de Barcelona, 2007, in Spanish.

[17] J. Fernández, M. Gaona, J.M. Guilemany, Tribological study of plasma hydroxyapatite coatings, *Key Engineering materials*, 2004, 254-256, p. 383-386, in English.

[18] J. Fernández, M. Gaona, J.M. Guilemany, Effect of heat treatments on HVOF hydroxyapatite coatings, *Journal of Thermal Spray Technologies*, 2007, 16, p. 220-228, in English.

[19] R.A. Rosu, I. Bran, M. Popescu, C. Opris, In vitro characterization of hydroxyapatite layers deposited by APS and HVOF thermal spraying methods, *Ceramics – Silikaty*, 2012, 56, p. 25-31, in English.

[20] P.C. Maness, S. Smolinski, D.M. Blake, Z. Huang, E.J. Wolfrum, W.A. Jacoby, Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism, *Applied and environmental microbiology*, 1999, 65, p. 4094-4098, in English.

[21] Y. Kikuchi, K. Sunada, T. Iyoda, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 1997, 106, p. 51-56, in English.

VI. Figure captions

Figure 1. ZnO particles. Morphology by SEM

Figure 2. Surfaces of the three samples: a) as-sprayed, b) with ZnO (5%), c) gentamicin-treated

Figure 3. IR spectra of the as-sprayed sample, -OH zone

Figure 4. EDX mapping of the cross section of the gentamicin-treated sample

Figure 5. Effect of the ZnO treatment on the evolution of bacteria survival in solution at 0, 2 and 4 hours: a) *E. coli*, b) *P. aeruginosa*, c) *S. aureus*

Figure 6. Effect of gentamicin on the evolution of bacteria survival in solution at 0, 2, and 4 hours: a) *E. coli*, b) *P. aeruginosa*, c) *S. aureus*

Figure 7. Antibacterial test against *E.coli* of: a) samples treated with ZnO and b) samples treated with gentamicin

*Recubrimientos biocompatibles de HAp-TiO₂ obtenidos mediante Proyección
Térmica de Alta Velocidad (HVOF)*

