

Effect of the substrate temperature and projection mode on the cristallinity, wettability and biocompatibility of the hydroxyapatite coating deposited by atmospheric thermal plasma

**Abel Fumero¹, Talles R. da Silva², Leonardo Goyos¹,
Clodomiro Alves Jr.², Haroldo M. Reis³, Moacir F. de Queiroz⁴**

¹Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría. La Habana, Cuba.

²Labplasma, Departamento de física, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), campus universitário. Natal, RN, Brazil. ³Instituto Federal de Piau, Brasil.

⁴Laboratorio de biotecnología de polímeros naturales, UFRN.
afumero@mecanica.cujae.edu.cu

Abstract

Synthetic hydroxyapatite powder has been used for years for orthopedic applications as bioceramic coatings. In this study was used a natural hydroxyapatite obtained by hydrothermal reaction, from marine coral porites. The hydroxyapatite was sprayed by atmospheric thermal plasma on grade-II titanium to explore the effect of substrate temperature and the projection mode in crystallinity, wettability and biocompatibility of the coating. Phase composition and crystallinity of the coating were determined by X-ray diffraction, wettability was measured by the drop contact method and cell proliferation was assessed by MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5)diphenyltetrazolium bromide). The results suggest that the coatings obtained preheating the substrate ensure higher crystallinity. The surfaces obtained rotating the substrate had better wettability and the coating obtained by rotating and with preheating substrate showed increased cell proliferation.

Keywords: hydroxyapatite, plasma, projection mode, substrate temperature.

Efecto de la temperatura del sustrato y el modo de proyección sobre la cristalinidad, humectabilidad y biocompatibilidad de recubrimientos de hidroxiapatita, depositados por plasma térmico atmosférico

Resumen

La hidroxiapatita sintética en polvo ha sido utilizada durante años para aplicaciones ortopédicas, en forma de recubrimientos biocerámicos. En este estudio, fue utilizada una hidroxiapatita, de origen natural, obtenida mediante una reacción hidrotermal, a partir de corales marinos porites. La hidroxiapatita fue proyectada por plasma térmico atmosférico sobre titanio grado II, para explorar el efecto de la temperatura del sustrato y el modo de proyección en la cristalinidad, humectabilidad y biocompatibilidad del recubrimiento. La composición de fase y cristalinidad del recubrimiento fueron determinadas por difracción de rayos x; la humectabilidad fue medida por el método de la gota de contacto y la proliferación celular fue evaluada por MTT [(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5)difenil tetrazolio]. Los resultados sugieren que los re-

cubrimientos obtenidos con precalentamiento del sustrato, aseguran mayor cristalinidad; las superficies obtenidas con el sustrato rotando, presentaron mejor humectabilidad y el recubrimiento obtenido con el sustrato con precalentamiento y rotando, mostró mayor proliferación celular.

Palabras clave: hidroxiapatita, plasma, modo de proyección, temperatura del sustrato.

Introducción

La hidroxiapatita sintética en polvo ha sido utilizada durante años para aplicaciones dentales y ortopédicas, en forma de recubrimientos bioce-rámicos. Se conocen varias metodologías de sín-tesis de polvo de hidroxiapatita, tales como, pre-cipitación, síntesis en estado sólido, hidrólisis y métodos sol-gel e hidrotermal. De todas ellas, la precipitación es la más comúnmente utilizada [1, 2].

La hidroxiapatita posee muy bajas tenaci-dad y resistencia a la fatiga; por tanto, en las apli-caciones médicas ortopédicas, es utilizada, habi-tualmente, como material de recubrimiento sobre la superficie de un implante metálico biocompati-ble; que aporta la resistencia mecánica necesaria. Esta solución se comenzó aplicar desde la segun-da mitad de la década de 1980, con resultados satisfactorios [3-5].

En los últimos años se han desarrollado di-versas técnicas de recubrimiento superficial; pero la proyección por plasma atmosférico, sigue sien-do la más utilizada, a pesar de las desventajas que posee de descomponer la hidroxiapatita en fosfa-tos tricálcico o tetracálcico.

Al seleccionar un polvo, para ser proyecta-do por plasma, deben controlarse determinados pa-rámetros del mismo; tales como, la forma, el tamaño y distribución de las partículas; así como la composición de fase del mismo.

Los trabajos experimentales han establecido que los polvos adecuados para la proyección tér-mica deben ser de morfología esférica y una distri-bución de tamaño de partículas de 20-100 μm [1].

Polvos formados por partículas esféricas con una distribución de tamaño dada es importante, pues ellos presentan el mejor comportamiento ae-rodinámico en el flujo de plasma, incrementando, de esta manera, la eficiencia en la proyección.

Existen dos técnicas, para la esferoidización de partículas; una es la esferoidización por plas-ma y la otra utiliza un atomizador, que es la más utilizada [6].

Los polvos utilizados para aplicaciones de proyección térmica son producidos por compa-ñías, como Plasma Biotal, del Reino Unido. La ob-tención de un polvo, de origen natural, mediante un proceso de molienda, que reúna las caracterís-ticas morfológicas para ser proyectado por plas-ma térmico atmosférico, no ha sido discutida en la literatura.

Los parámetros más evaluados, del proceso de plasma térmico han sido la potencia eléctrica, distancia de proyección, composición de gas de plasma, razón de flujo de gas transportador y ra-zón de alimentación del polvo [7]; pero se hace necesario investigar la influencia en la microes-tructura, cristalinidad y biocompatibilidad del recubrimiento, de otras variables del proceso; tales como, temperatura del sustrato y modo de proyección.

En este estudio, fue utilizada una hidroxi-a-patita obtenida mediante una reacción hidroter-mal [8], a partir de corales marinos porites; pos-teriormente la misma es triturada y se obtienen diferentes granulometrías. Se seleccionó la granu-lometría L (0,8-1 mm), la cual fue triturada en un molino de bolas, para obtener un polvo, con características morfológicas, para ser proyectado por plasma térmico atmosférico. El objetivo per-seguido fue verificar la factibilidad de usar este polvo como recubrimiento de implantes metáli-cos. Se evaluó además, la influencia de la tempe-ratura del sustrato y el modo de proyección, sobre la cristalinidad, humectabilidad y biocompatibili-dad de los recubrimientos.

Métodos

Materiales y obtención de los recubrimientos

El polvo de hidroxiapatita, obtenido por molienda a partir de una granulometría L, fue usado en un rango de tamaño de partículas entre 10-120 μm , con un tamaño medio de 51,74 μm (Figura 1); en la misma se observa que las partí-

culas no tienen forma esférica. Como sustrato fue utilizado titanio comercialmente puro, grado II, en forma de disco con 19×1 mm (diámetro \times espesor).

Antes de la proyección, la superficie del sustrato de titanio fue granallada con óxido de silicio, con granulometría de 355 a 710 μm . Para eliminar las partículas remanentes del óxido en la superficie, ésta fue colocada en un frasco con etanol, y se le aplicó un baño ultrasónico durante 5 minutos. La rugosidad superficial ($R_a = 2,3 \mu\text{m}$) en el sustrato, fue determinada mediante el empleo de rugosímetro modelo Surtronic 25, de la marca Taylor Hobson. El polvo de hidroxiapatita, fue proyectado con una antorcha de plasma, construida en el laboratorio de procesamiento de materiales por plasma de la UFRN (Universidade Federal Rio Grande do Norte), (Figura 2).

En la Tabla 1 se muestran las condiciones experimentales utilizadas, donde la temperatura y velocidad superficial del sustrato fueron variadas, manteniendo constante otros parámetros.

La temperatura del sustrato se aumentó precalentando la superficie con la antorcha del plasma, y fue medida con un termopar (Figura 2). La rotación del sustrato se logró con un motor de 600 rpm.

Caracterización físico-química de los recubrimientos

La morfología superficial de los recubrimientos fue examinada con un microscopio electrónico de barrido Philips, modelo XL 30 ESEM. Para obtener buenas imágenes fue necesario recubrir con oro las mismas.

Las fases presentes en los recubrimientos de hidroxiapatita fueron determinadas usando un difractómetro de rayos X Shimadzu modelo XRD 6000 con radiación de CuK_α . Las mediciones se realizaron en un rango 2θ entre $20\text{-}60^\circ$ con una velocidad de barrido de $2^\circ/\text{min}$.

La identificación de fases fue realizada haciendo uso del programa computacional Origin, versión 8.0, superponiendo los difractogramas experimentales con el de la hidroxiapatita reportado en la base de datos del comité conjunto de la sociedad de difracción del polvo (JCPDS, por sus siglas en Inglés).

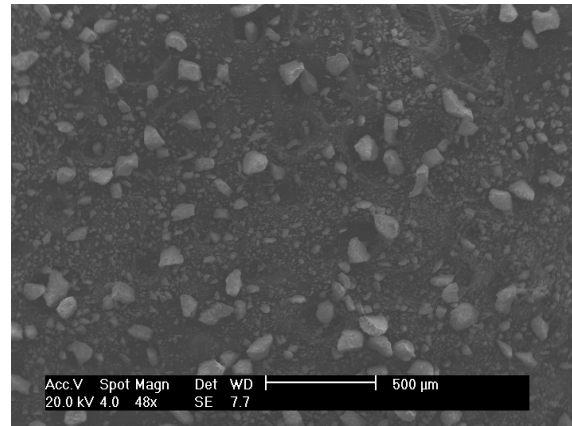


Figura 1. Polvo de hidroxiapatita.

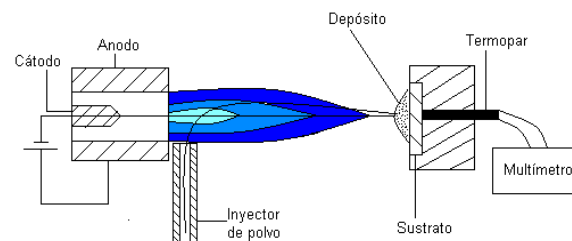


Figura 2. Configuración del sistema de proyección por plasma.

Tabla 1
Condiciones experimentales

Parámetros	Valor
Potencia eléctrica (kw)	7,5
Distancia de proyección (mm)	20
Flujo de gas argón, formador de plasma (L/min)	30
Flujo de gas argón, para arrastre de partículas (L/min)	9
Masa de polvo proyectada (g)	0,5
Tiempo de deposición (s)	30
Temperatura del sustrato ($^\circ\text{C}$)	25, 600
Movimiento del sustrato	Fijo, Rotando

La cristalinidad de los recubrimientos fue evaluada usando el método de Rutland, el cual es preciso y comúnmente usado [9-11].

$$\text{Cristalinidad (\%)} = \frac{\Sigma Ac}{\Sigma Ac + \Sigma Aa} \times 100 \quad (1)$$

donde: ΣAc , es la suma de las áreas bajo todos los picos cristalinos; ΣAa , es la suma de las áreas bajo todos los picos amorfos.

La fase amorfa representa el fondo del patrón de difracción; el área fue calculada utilizando la herramienta curva no lineal de ajuste del software Origin, en el intervalo de 30-35° (2θ), que es donde aparecen los principales picos del difractograma. El área total bajo el patrón de difracción en el mismo intervalo fue calculada con el auxilio de la herramienta de integración del mismo programa. El área de los picos cristalinos se obtuvo restando al área total el área amorfa.

Humectabilidad

La técnica utilizada fue la determinación del ángulo de contacto estático. Las muestras fueron colocadas sobre la superficie plana y enseguida fue depositada una gota de 10 μ L de agua sobre la superficie de los discos. Fueron realizados vídeos de deposición de la gota hasta completar 60 segundos. Para capturar las imágenes, a partir del vídeo en el instante de 10, 30 y 60 segundos, fue utilizado el programa Pinnacle Studio QuickStart, versión 8, y para calcular el ángulo de contacto se utilizó el programa SurfTens. Para cada tiempo se realizaron 5 mediciones, las cuales fueron promediadas.

Cultivo de células

Para evaluar la biocompatibilidad de los recubrimientos producidos en este estudio fue realizado un cultivo de células preosteoblásticas MC3T3-E1 que fueron cultivadas en un medio de cultivo celular Alfa-MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Antes del mismo, los discos recubiertos de hidroxiapatita fueron esterilizados en un autoclave a 120°C, durante 30 minutos.

Las cuatro superficies comparadas en este estudio fueron colocadas en dos placas de cultivo de células de 12 pozos. Cada superficie fue triplicada; se emplearon dos superficies para medir proliferación celular, y la tercera para la observación por microscopía óptica y electrónica.

En cada placa, fueron utilizados tres pozos como control, para poder comparar la proliferación celular entre éstos y las superficies estudiadas. Fue adicionado 1 mL de medio de cultivo celular sobre cada pozo y, posteriormente, las cé-

lulas preosteoblásticas en una densidad de 3000 células por pozo, las cuales fueron contadas en el microscopio utilizando una cámara de Neubauer. Por último, las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ por 7 días y cada 48 horas, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco.

Proliferación celular

La proliferación celular fue determinada por el ensayo del MTT. Al 7mo día fueron adicionadas en las placas, 1 mg/mL de solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5] difenil tetrazolio) al medio de cultivo y se dejaron incubar por otras 4 horas; pasado ese tiempo fue retirada la solución con MTT y fue adicionado 1 mL de etanol para solubilizar los cristales de formazán, de color púrpura, formados por la reducción metabólica del MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formado. La solución fue homogenizada por 10 minutos y transferida para una placa con 96 pocillos, colocando 200 μ L por pozo. Posteriormente la placa fue llevada a un microlector, para cuantificar la actividad enzimática; la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 570 nm. Mientras mayor sea la absorbancia; es decir, menor intensidad de luz transmitida, significa mayor concentración celular y, por tanto, viabilidad y proliferación celular.

Morfología celular

Para observar la morfología de las células, las mismas fueron fijadas con formaldehído al 5% y, posteriormente, deshidratadas con diferentes concentraciones de alcohol (70, 80, 90 y 100%). Fueron secadas y recubiertas con oro para ser observadas al microscopio electrónico de barrido Philips, modelo XL 30 ESEM a 15 kV y microscopio óptico BX60-M Olympus.

Resultados

Microestructura superficial de los recubrimientos

La morfología superficial de los recubrimientos, obtenidos de las diferentes condiciones experimentales, se muestra en la Figura 3.

Identificación de fases mediante difracción de rayos x

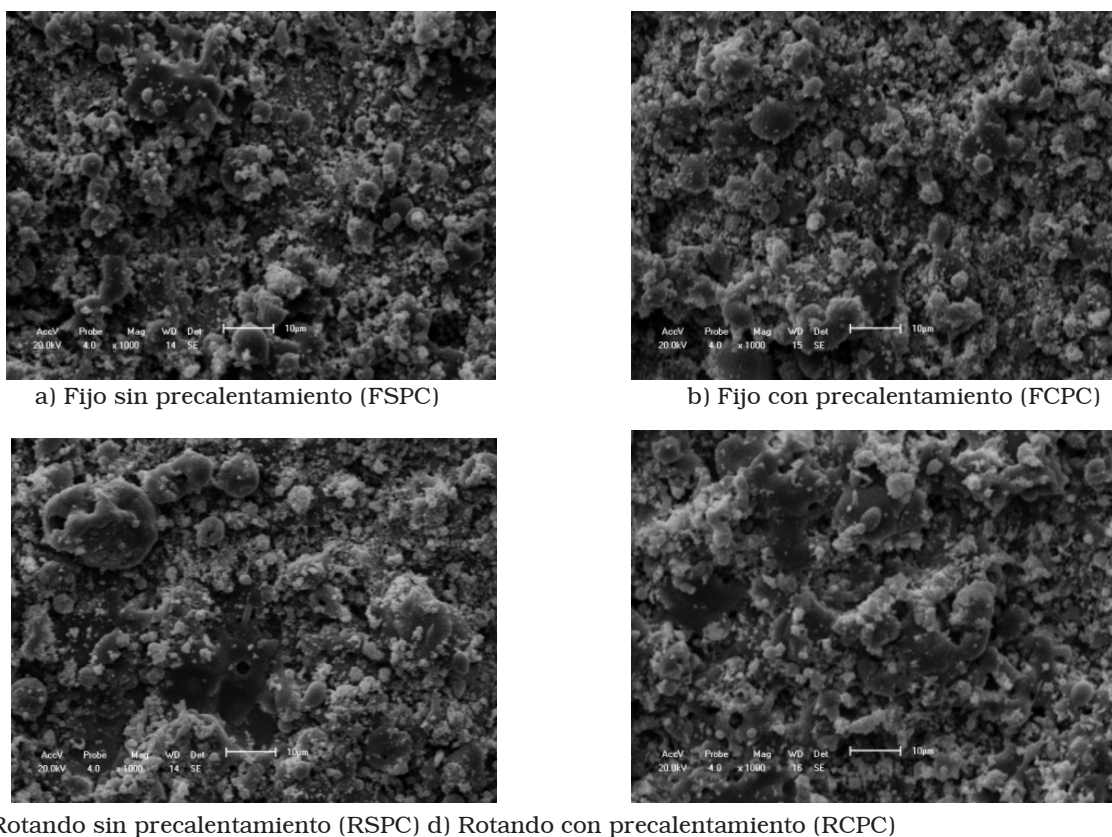
El patrón de difracción de la hidroxiapatita, reportado por el comité conjunto de la sociedad de difracción del polvo y el de los recubrimientos, para las diferentes condiciones de tratamiento, se muestran en la Figura 4.

Cristalinidad de los recubrimientos

En la Figura 5 se muestra la cristalinidad de los diferentes recubrimientos obtenidos.

Humectabilidad de los recubrimientos

En la Figura 6 se muestra una secuencia en el tiempo de la adsorción de la gota en la superficie de los recubrimientos.



c) Rotando sin precalentamiento (RSPC) d) Rotando con precalentamiento (RCPC)

Figura 3. Morfología superficial de los diferentes recubrimientos.

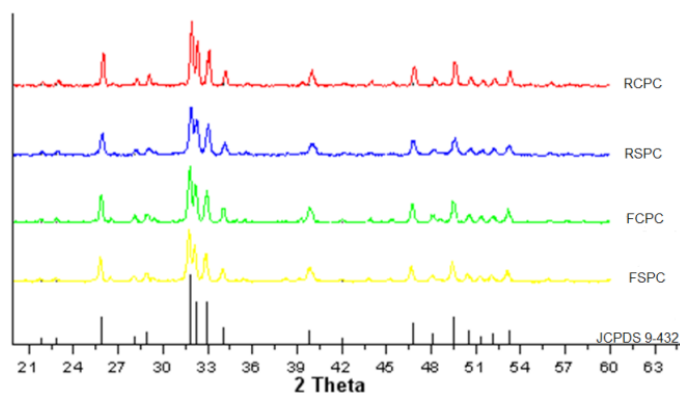


Figura 4. Comparación de difractogramas.

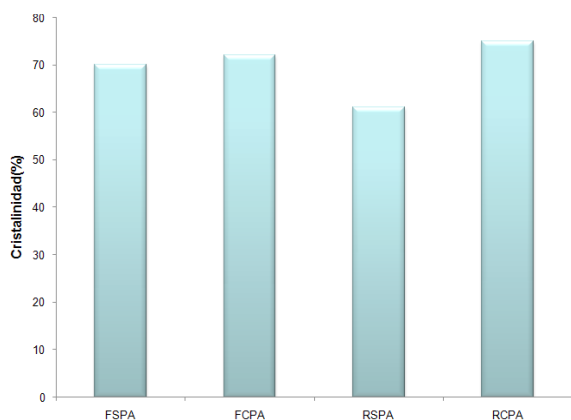


Figura 5. Cristalinidad de los recubrimientos.

En la Figura 7 se muestra el ángulo de contacto, medido en el tiempo, para las diferentes condiciones experimentales.

Proliferación celular

La Figura 8 representa la absorbancia para los diferentes recubrimientos obtenidos.

Morfología celular

La Figura 9 muestra la morfología de las células cultivadas para los diferentes tratamientos, utilizando la técnica de microscopía óptica.

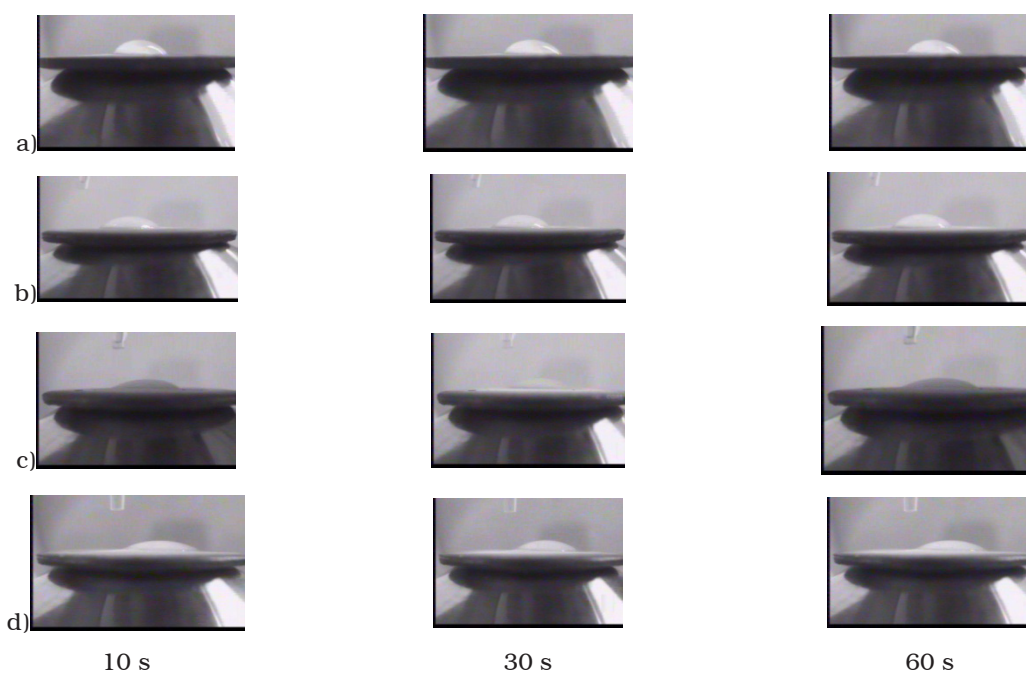


Figura 6. Secuencia en el tiempo de la adsorción de la gota sobre la superficie de los recubrimientos a)FSPC, b) FCPC, c) RSPC, d) RCPC.

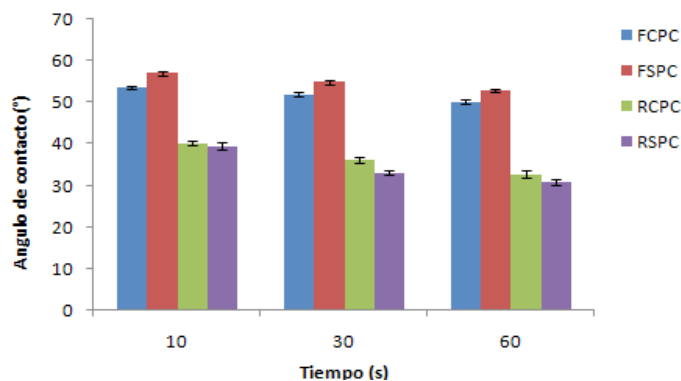


Figura 7. Ángulo de contacto.

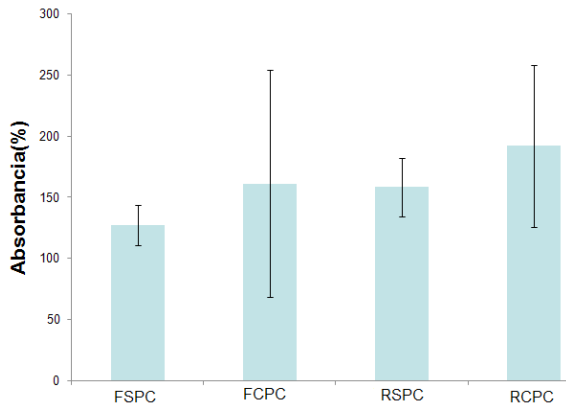


Figura 8. Absorbancia de los recubrimientos.

En la Figura 10 se aprecia la morfología de las células en una zona ampliada del recubrimiento obtenido con el sustrato fijo sin precalentamiento.

Discusión

Análisis de la microestructura superficial

No se aprecian diferencias significativas en la topografía superficial de las diferentes condiciones experimentales, observándose, en todas, una camada porosa con partículas fundidas y no

fundidas. Esto es debido a que se mantuvieron los mismos parámetros de proyección y fue utilizado el mismo tamaño de partículas de polvo para todos los experimentos.

Análisis de los difractogramas

Puede apreciarse que hay coincidencia entre el patrón de difracción de la hidroxiapatita (JCPDS 9-432) y los de los diferentes recubrimientos; por lo que puede afirmarse que en los mismos existe un elevado porcentaje de fase cristalina de hidroxiapatita y no se observan otras fases producto de la descomposición de ésta en la pluma de plasma; esto último pudiera estar asociado a que fue utilizado un polvo con una gama elevada de tamaño de partícula y que fue proyectado a pequeña distancia de proyección. En la figura también se observa que los recubrimientos obtenidos con el sustrato precalentado presentan mayor cristalinidad; pues los picos del patrón son más puntiagudos.

Cristalinidad de los recubrimientos

Puede observarse que la cristalinidad de todos los recubrimientos es superior a 45%, que es el valor que especifica la norma ISO 13799-2:2000 [12].

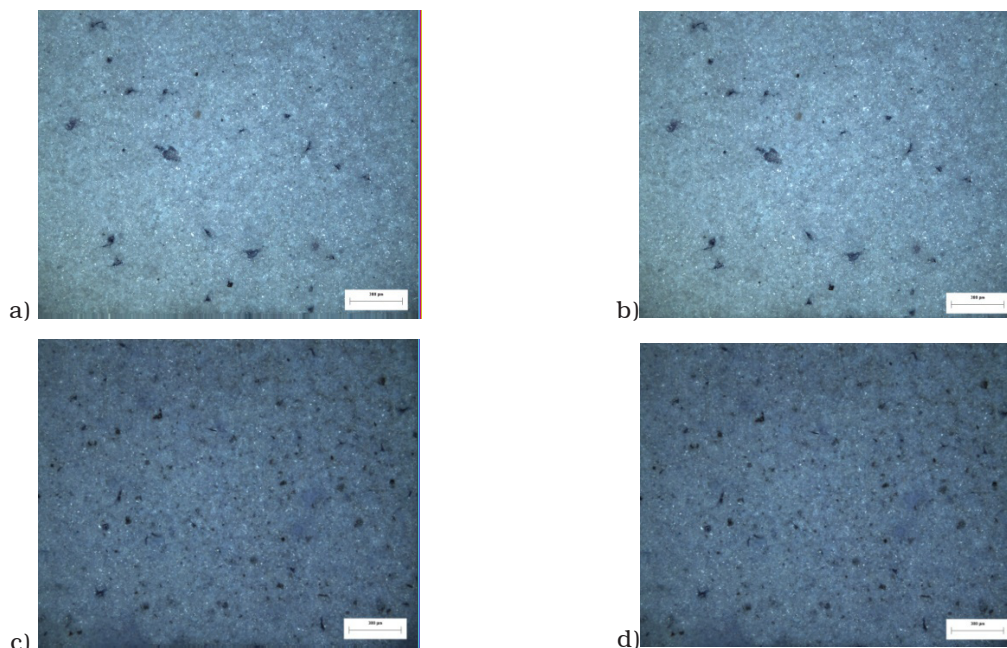


Figura 9. Morfología celular. a) FSPC, b) FCPC, c) RSPC, d) RCPC.

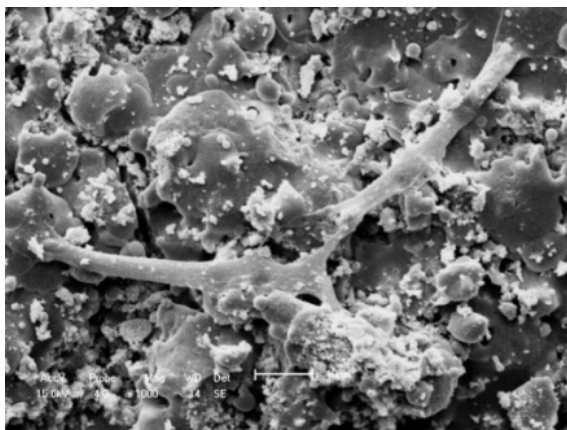


Figura 10. Morfología de las células en el recubrimiento (FSPC).

Los recubrimientos obtenidos con el sustrato precalentado presentan mayor cristalinidad, corroborando lo que muestra el difractograma. Este resultado está en concordancia con lo documentado en la literatura; pues al estar el sustrato en ambos tratamientos a 600°C, la velocidad de enfriamiento disminuye al chocar las partículas con la superficie del sustrato y, por tanto, se forma menos fase amorfa. Adicionalmente la acumulación del calor promueve la recrystalización de la fase amorfa, previamente formada, dado que la temperatura de recrystalización de esta fase está en el intervalo de 500-700° [13]. También, como el intervalo de deposición entre partículas, en un mismo punto del recubrimiento, es del orden de 0,1 s (106 veces el tiempo de solidificación de las partículas, que es del orden de 10^{-5} - 10^{-7} s) la fase amorfa del recubrimiento puede incorporar iones OH de la atmósfera. La rehidroxilización ocurre a temperaturas superiores a 400°C y se incrementa con la temperatura [12].

Análisis de la humectabilidad

La humectabilidad, es fundamental para el éxito en la adhesión celular y consecuentemente en la osteointegración. Se observó que los recubrimientos obtenidos con el sustrato rotando presentaron mejor humectabilidad que aquellos obtenidos con el sustrato fijo; es decir, menor ángulo de contacto; por lo que pudiera esperarse, en la superficie de los primeros, mayor proliferación celular, pues se ha comprobado que la adhesión celular es, generalmente, mayor sobre superficies hidrofílicas que sobre superficies hidrofóbicas [14, 15].

Análisis de la absorbancia de los recubrimientos

Se observa que la mayor absorbancia, lo cual significa mayor proliferación celular, la tuvo el sustrato rotando, con precalentamiento, debido a su mayor cristalinidad y ser una superficie hidrofílica. Xue y otros, han evaluado, en vivo, recubrimientos de diferente cristalinidad, y sus resultados mostraron, que los recubrimientos altamente cristalinos presentaron la más baja disolución y la más alta resistencia entre el implante y el hueso [16]. A continuación, con valores en magnitud muy cercanos, el sustrato fijo precalentado, debido a su cristalinidad. Le sigue el sustrato rotando sin precalentamiento, debido a la humectabilidad de su superficie. Por último el sustrato fijo sin precalentamiento presentó la menor absorbancia, debido a su baja cristalinidad y humectabilidad de su superficie.

Morfología celular

En la microscopía óptica puede observarse las ramificaciones en forma de estrella que experimentan las células en su crecimiento y en la electrónica se observa que las células están bien adheridas a la superficie, indicando, de esta manera, la biocompatibilidad de esta última.

Conclusiones

En este trabajo se pudo mostrar que se obtuvieron recubrimientos de hidroxiapatita sobre titanio de elevada pureza a partir de un polvo obtenido por molienda, cuya fuente es de origen natural. Los recubrimientos obtenidos con precalentamiento del sustrato mostraron mayor cristalinidad. Las superficies obtenidas con el sustrato rotando presentaron mayor humectabilidad. El recubrimiento obtenido con el sustrato precalentado y rotando mostró mayor proliferación celular que los otros tratamientos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la agencia CAPES (coordinación de perfeccionamiento de personal de nivel superior) por el apoyo financiero a la investigación realizada.

Referencias bibliográficas

1. C. C. Berndt, G.N.H., A. J. D. Farmer and K. A. Gross: Thermal Sprayin for Bioceramic Applications. *Materials Forum*, Vol. 14, (1990) 161-173.
2. S.W.K. Kweha, K.A.K., P. Cheang: The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders. *Journal of Materials Processing Technology*, Vol. 89-90, (1999) 373-77.
3. R. J. Furlong, J.F.O.: Fixation of hip Prostheses by Hydroxyapatite Ceramic Coatings. *The Journal Bone and Joint Surgical*, Vol. 73, B(5) (1991) 741-745.
4. Jaffe, W., David. F. Scott: Current concepts review-total hip arthroplasty with hydroxyapatite-coated prostheses. *J Bone Joint Surg*, Vol. 78 (1996) 1918-34.
5. Manley, J.D.a.M.T.: Hydroxyapatite-Coated Prostheses in Total Hip and Knee Arthroplasty. *The Journal of bone and joint surgery*, Vol. 86, (2004) 2526-2540.
6. Rui-Xue Sun, Y.-P.L., Mu-Sen Li, Shi-Tong Li, Rui-Fu Zhu: Characterization of hydroxyapatite particles plasma-sprayed into water. *Surface & Coatings Technology*, Vol. 190, (2005) 281-86.
7. S. Dyshlovenko, L.P., P. Roussel, D. Murano, F. A. Le Maguer: Relationship between plasma spray operational parameters and microstructure of hydroxyapatite coatings and powder particles sprayed into water. *Surface & Coatings Technology*, N° 200, (2006) 3845-55.
8. R. Gonzalez, E.H., J. Fernandez: Cinética de la reacción de transformación Hidrotérmica del coral a hidroxiapatita. *Química nova*, Vol. 16, (1993) 6.
9. Y.C. Tsui, C.D., T.W. Clyne: Plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium substrates Part 1: Mechanical properties and residual stress levels. *Biomaterials*, Vol. 19, (1998) 2015-2029.
10. Limin Sun, C.C.B., Clare P. Grey: Phase, structural and microstructural investigations of plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Materials Science and Engineering A*, N° 360, (2003) 70-84.
11. Levingstone, T.J.: Optimisation of Plasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings, in *School of Mechanical and Manufacturing Engineering*. 2008, Dublin City University: Ireland.
12. Implants for surgery-Hydroxyapatite. Part 2: Coatings of hydroxyapatite, in *ISO 13779-2:2000*. 2000.
13. Karlis A. Gross, V.G.a.C.C.B.: Thermal Analysis of Amorphous Phases in Hydroxyapatite Coatings. *J. Am. Ceram. Soc*, Vol. 81 (1) (1998) 106-12.
14. Altankov G, G.T.: Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med*, 1994. 5: p. 732-7.
15. Ruardy TG, S.J., Van der Mei HC, Busscher HJ; Adhesion and spreading of human skin "broblasts on physicochemically characterized gradient surface. *J Biomed Mater Res*, Vol. 29, (1995) 1415-23.
16. Weichang Xue, S.T., Xuanyong Liu, XueBin Zheng, Chuanxian Ding: In vivo evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings having different crystallinity. *Biomaterials*, Vol. 25, (2004) 415-421.

Recibido el 3 de Septiembre de 2012

En forma revisada el 21 de Octubre de 2013