

Biomaterial compuesto de titanio-hidroxiapatita

C. Oldani, L. Grinschpun, R. Cormin, M. Schneiter y N. Salvatierra

Departamento de Materiales - FCEFYN - Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sársfield 1611, Córdoba, Argentina

Resumen— Los implantes no cementados requieren el menor tiempo de osteointegración ya que el mismo hueso será su anclaje. Por lo tanto, esta aplicación requiere un material con bioactividad superficial y una estructura porosa importante. Este artículo presenta un compuesto a base de titanio, reforzado con partículas de hidroxiapatita producido mediante técnicas de metalurgia de polvos. Las materias primas fueron mezclas de polvos de hidruro de titanio e hidroxiapatita natural (20% en peso), obtenida a partir de hueso bovino, prensados a 490 MPa en un molde rígido y sinterizados a 1200 ° C en vacío y a temperaturas en el rango de 600 a 1000 ° C en argón. Las muestras sinterizadas a 1200 ° C muestran una variación en volumen (dilatación) debido a una reacción entre los componentes del compuesto. Estas reacciones no aparecen a temperaturas bajas (600 y 800 ° C), pero estas muestras exhiben cierta porosidad debido a la escasa sinterización. Los compactos se caracterizaron por metalografía y mediante pruebas biológicas de citotoxicidad. Los mejores resultados metalográficos se obtienen en las muestras sinterizadas a 800 °C, la que no es citotóxica.

Palabras clave— Titanio, Hidroxiapatita, Composite, Sinterizado, Citotoxicidad

I. INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido vivo que se renueva constantemente a lo largo de la vida de un individuo y permite que se regeneren tras ser dañado. En general, esta remodelación dinámica es suficiente para reparar fracturas y reconstruir algunos defectos. Sin embargo, el reemplazo de parte del hueso por un implante metálico requiere tomar en cuenta la interacción del tejido vivo con la superficie del mismo. Esta interacción pretende, idealmente, que el tejido óseo se desarrolle sobre la superficie del implante y penetre en su volumen, generando su anclaje mecánico.

El titanio se usa actualmente en implantes debido a sus buenas características frente a la corrosión de los fluidos corporales y su oseoconductividad (OC) [1].

Por otro lado, los cerámicos bioactivos pueden establecer una unión fuerte con los tejidos ya que interactúan químicamente con los mismos. Uno de estos es la hidroxiapatita (HA), principal constituyente mineral de los huesos y dientes [2]. La HA ha sido usada ampliamente como recubrimiento de implantes de titanio, pues mejora su OC. Este recubrimiento genera una excelente interfase entre la fase cerámica y el hueso, pero no es tan buena la interfase entre

el metal y el cerámico bioactivo, debido a las diferencias en sus propiedades mecánicas [3,4].

La posibilidad de fabricar un biomaterial compuesto de Ti-HA donde la fase cerámica esté distribuida en todo el volumen, como “islas” de HA en una matriz de Ti en vez de presentarse como una capa superficial, podría solucionar el problema de la degradación mecánica del recubrimiento. Otra ventaja del compuesto Ti-HA con respecto al Ti recubierto de HA, sería la posibilidad de maquinarse con la forma de cualquier componente sin la necesidad de adicionar ninguna capa sobre formas complejas.

La mezcla de polvos de Ti y de HA y su sinterizado, puede conducir a una serie de reacciones que provocan la descomposición de la HA [3]. El sinterizado de este tipo de compuestos es dificultoso pues el titanio es estable en atmósferas de vacío o reductoras y la hidroxiapatita es estable sólo en condiciones oxidantes [5]. Las reacciones entre los componentes están catalizadas por la presencia del titanio y una temperatura superior a los 800 °C [9]. Los cambios de volumen involucrados en estas transformaciones, provocan una dilatación del material, que termina disgregándolo. La búsqueda de una solución ha llevado a diversos investigadores a ir modificando las variables del proceso, cambiando la temperatura de procesamiento y la atmósfera de trabajo [6]. En esa línea, en este trabajo se propone obtener materiales compuestos de titanio-hidroxiapatita (composites Ti-HA) mediante sinterizado a baja temperatura. El material obtenido será caracterizado macro y microscópicamente. La dilatación será analizada variando la temperatura y la atmósfera del proceso (vacío y argón y temperaturas de 600, 800, 1000 y 1200°C). También serán caracterizadas la porosidad remanente del sinterizado y la interfase entre el metal y la fase cerámica.

Para determinar la posible citotoxicidad del material sinterizado, se realizaron ensayos de biocompatibilidad siguiendo los protocolos indicados por la norma ISO 10993 [7].

II. MÉTODO EXPERIMENTAL

En este trabajo se utilizó hidruro de titanio, TiH₂, con una pureza del 98% (proveedor Sigma Aldrich) de malla -325 (menor a 43 μm), como fuente de titanio. El material fue deshidratado durante una etapa a temperatura constante de media hora a 500 °C, en el calentamiento hacia la tempera-

tura de sinterizado. La hidroxiapatita fue de origen natural (hueso bobino) (Inbiomed S.A.). La misma fue molida y tamizada a una granulometría entre 120 y 230 μm .

La mezcla de los polvos (Ti+20%HA) fue realizada mediante un mezclador en Y durante media hora. El polvo fue compactado en una matriz cilíndrica con aplicación de fuerzas coaxiales en dos sentidos (doble efecto), de 8 mm de diámetro a 490 MPa. Las muestras en verde fueron colocadas en un horno cilíndrico con control de atmósfera para la sinterización. Las temperaturas utilizadas fueron de 600, 800, 1000 y 1200 $^{\circ}\text{C}$, manteniendo en todos los casos la etapa de deshidratación durante el calentamiento. La atmósfera de tratamiento fue en todos los casos de argón de ultra alta pureza (Argón 5.0 de Linde) salvo para los sinterizados a 1200 $^{\circ}\text{C}$ que se realizaron en vacío (10^{-5} bar). Los tiempos de sinterizado variaron en función de la temperatura de tratamiento térmico: a 600 $^{\circ}\text{C}$ fue de 3 h, 2 h a 800 $^{\circ}\text{C}$ y 1 h a las restantes temperaturas.

Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante técnicas de metalografía óptica y electrónica de barrido (FE-SEM Sigma) y ensayos biológicos de citotoxicidad.

Una muestra de cada temperatura fue mantenida en condiciones atmosféricas de laboratorio, constatando su dilatación y observando la microestructura de las muestras que no presentaron cambios de volumen.

El potencial efecto citotóxico de las muestras fue evaluado mediante ensayo de citotoxicidad indirecto según Norma ISO 10993-5. Un extracto de cada muestra fue preparado, incubando las piezas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) por 72 hs a 37 $^{\circ}\text{C}$ con una relación de 0,1 g de material/mL de medio (Norma ISO 10993-12). El sobrenadante de las muestras fue tomado para obtener los extractos y fueron preparadas 4 diluciones: 25, 50, 75 y 100% para cada uno. Un extracto de PEHD (Poliétileno alta densidad) de 30 micrones fue empleado como control negativo (CN), en una relación 3 cm^2 del material/mL de medio de cultivo y como control positivo (CP) una solución de fenol al 0,2 %. Las células Vero (línea celular cedidas por CIQUIBIC-CONICET- Dpto. de Química Biológica – Fac. de Ciencias Químicas - UNC) fueron sembradas con una densidad de 10.000 células/pocillo en placas multiwell. Estas fueron mantenidas con el medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Pasching, Austria), 4 mM de L-Glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), 4 mM de Piruvato de Sodio (Sigma, St Louis, USA) y 10.000 unidades/mL de penicilina-10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin a 37 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 durante 24 hs para llegar a confluencia. El medio de cultivo fue extraído, adicionando en los distintos pocillos las diluciones del extracto de cada composite y los controles negativo y positivo por triplicado. La viabilidad celular fue cuantificada mediante ensayo de MTT (Methylt-

hiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) transcurridas 24 hs. Este es un método colorimétrico que permite valorar la viabilidad y cuantificar la proliferación celular. A todas las muestras ensayadas le fue agregado MTT a una concentración final de 1 mg/mL en buffer fosfato salino y fueron incubados durante 2 h. Las muestras fueron leídas en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific) a 595 nm. Los valores de densidad óptica (DO) medidos en los pocillos estuvieron en correlación con la viabilidad y proliferación celular.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los primeros tratamientos de sinterizado fueron realizados a temperaturas de 1200 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de vacío. Las muestras obtenidas aparecían totalmente fracturadas y desgranadas (Figura 1). Este comportamiento puede ser atribuido a las reacciones de descomposición de la hidroxiapatita en vacío, catalizadas por la presencia del titanio [3,8-10].



Figura 1: Muestra de Ti-20HA sinterizada a 1200 $^{\circ}\text{C}$ en vacío.

Estas reacciones y cambios de fase durante los calentamientos en vacío de los composites de Ti-HA, implican cambios volumétricos que provocan aumento de volumen del material, alcanzando valores de hasta un 8,5% para la mezcla Ti-5% HA. Las tensiones generadas durante este fenómeno terminan por disgregar el material. Se han informado también reacciones similares en sinterizados a 1000 y 1200 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de argón [11-12]. La presencia de CaTiO_3 , CaO , $\alpha\text{-Ti}$, $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ en las muestras del composite es claro indicio que las reacciones de descomposición de la HA también se producen en los tratamientos térmicos en atmósfera de argón a temperaturas superiores a los 1000 $^{\circ}\text{C}$ [13].

En este trabajo se buscó sinterizar los compuestos a temperaturas inferiores a los 1000 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de argón, mediante compactación en matrices de doble efecto. Con esto se esperaba que las reacciones entre la hidroxiapatita y

el titanio disminuyeran al bajar la velocidad de difusión del sistema.

Los resultados de la sinterización a 1000 °C mostraron que, a pesar de que el material compuesto no se disgregaba durante el sinterizado, la microestructura mostraba una amplia reacción entre los componentes. En la micrografía de la Figura 2 se observan las partículas de hidroxiapatita, en general rodeadas de una fase oscura, la que aparece también en la matriz. Esta fase proveniente de una reacción interfacial entre las partículas de HA y la matriz de Ti es muy frágil y el composite se fracturaban simplemente ejerciendo fuerza con la mano.

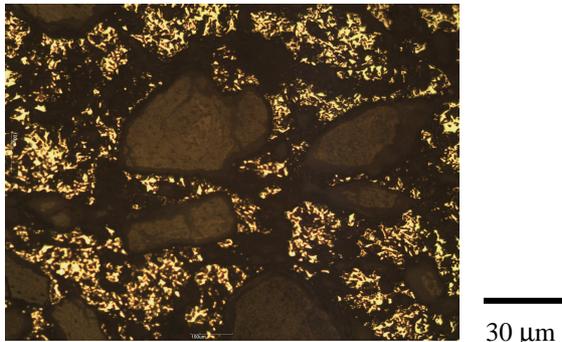


Figura 2: Microestructura de una muestra Ti-HA sinterizada a 1000°C en argón.

De las experiencias anteriores se concluyó que aún se debía bajar más la temperatura de tratamiento de sinterizado para minimizar las reacciones interfaciales y que la atmósfera de argón era totalmente adecuada para realizar los tratamientos térmicos.

Así, se realizaron tratamientos de sinterizado a 600 y 800°C, en muestras de Ti con el 20 % de HA (Ti-20HA).

Las muestras así sinterizadas fueron mantenidas en condiciones atmosféricas por al menos 90 días para controlar la posible dilatación y desgranado del material, producto de las reacciones de descomposición de la hidroxiapatita. Ninguna de las muestras tratadas a estas bajas temperaturas presentó modificación alguna de su volumen en el tiempo de análisis.

Las micrografías mostraron que, aparentemente, no aparece reacción interfacial entre el Ti y la HA. Las partículas de HA se ven “limpias” y se observa la matriz sinterizada de titanio. Sin embargo, la muestra sinterizada a 600°C muestra una gran cantidad de poros por falta de sinterización (Figura 3). Esto es perjudicial para las propiedades mecánicas del compuesto.

En la Figura 4 se observa la microestructura de la muestra sinterizada durante 2 hs a 800°C. Se observa una microestructura con menor cantidad de poros que la muestra de 600°C. En la Figura 5 se observa por microscopía elec-

trónica de barrido (SEM) una partícula de HA en el interior rugoso de un poro superficial.

La presencia de los poros por falta de sinterizado tiene ventajas para el uso biomédico del material estudiado, ya que permitiría el crecimiento del tejido óseo. Al ser poros de sinterizado es muy posible que estén interconectados y eso mejoraría la vascularización y llegada de nutrientes al nuevo tejido. Por otra parte, los poros disminuyen el módulo elástico del material y ello conlleva a una mayor similitud entre la rigidez del hueso natural y la del material compuesto, disminuyendo el peligro de la resorción del hueso por falta de cargas (stress shielding) [14].



Figura 3: Micrografía de la muestra Ti-20HA sinterizada durante 3 h a 600°C en argón

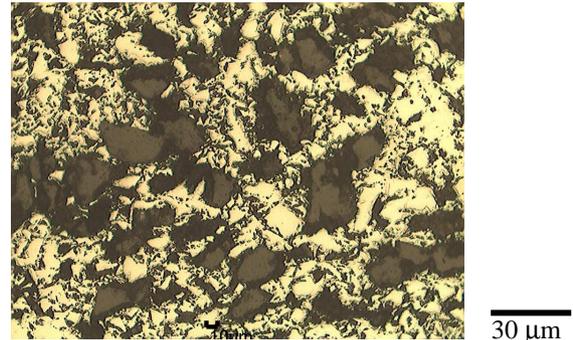


Figura 4: Micrografía de la muestra Ti-20HA sinterizada durante 2 h a 800°C en argón

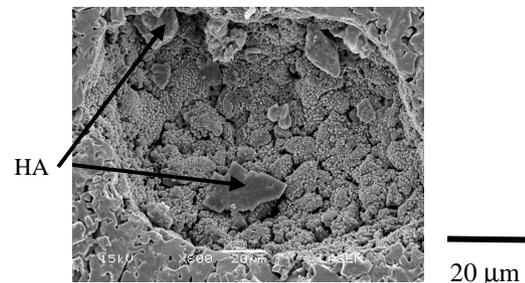
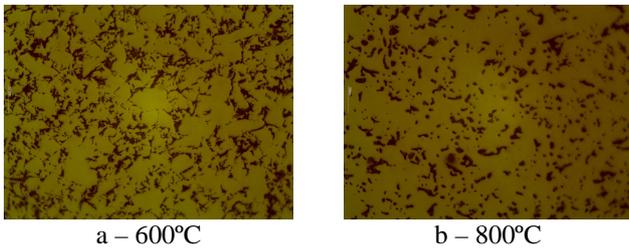


Figura 5: Cristales de HA en poro de una muestra de Ti-HA sinterizada a 800°C.

En la Figura 6 se observa como se va modificando la forma y la cantidad de poros observados en la matriz de titanio, en función a la variación de la temperatura de tratamiento. Los poros en la muestra tratada a 800 °C son más redondeados y aparecen en menor cantidad.



a – 600°C

b – 800°C

Figura 6: Comparación de porosidad en las muestras sinterizadas a 600 y 800°C

En la Figura 7 se muestra el porcentaje de viabilidad de las células expuestas a los diferentes extractos. Como puede observarse en todos los casos las células mostraron una viabilidad semejante a la obtenida para el control negativo. El control positivo presentó un porcentaje de células vivas menor al 20% como era de esperar. La Norma ISO 10993 estipula que un material será citotóxico cuando la viabilidad de células expuestas a dicho material sea menor al 70%.

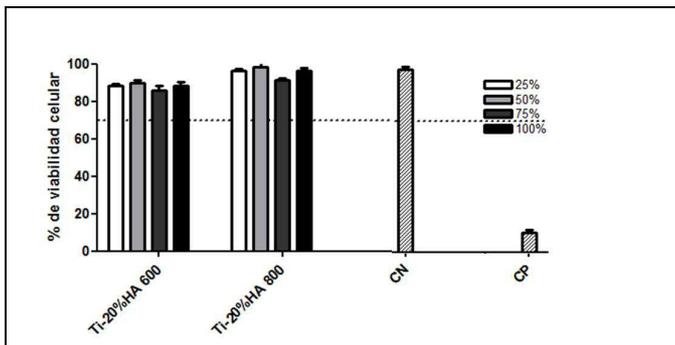


Figura 7: Resultados del ensayo de citotoxicidad

IV. CONCLUSIONES

En este trabajo se pudo obtener el compuesto de Ti-HA a partir de polvos de TiH_2 y de HA bobina, mediante técnicas pulvimetalúrgicas. Los resultados muestran que es posible sinterizar el material a temperaturas tan bajas como de 600°C aunque los mejores resultados microestructurales en cuanto a características de los poros del sinterizado, son los de las muestras obtenidas a 800 °C. Los test de citotoxicidad muestran que ninguna de los materiales ensayados tiene un efecto tóxico sobre la línea celular Vero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento al MIN-CyT de la Provincia de Córdoba por subsidiar este trabajo (MINCyT – PID2010 N° 1413/2011).

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Long M., Rack H. (1998) Review: Titanium alloys in total joint replacement- A materials science perspective. *Biomaterials* v19, n18 1621-1639
2. Yang C., Wang B., Chang E., Wu J. (1995) The influence of plasma spraying parameters on the characteristics of hydroxyapatite coatings: a quantitative study. *J. of Materials Science: Materials in Medicine*, v6, n5 249-257
3. Marcelo T., Livramento V, Varella de Oliveira M., Carvalho M. (2006) Microstructural Characterization and interactions in Ti and TiH_2 -Hydroxyapatite vacuum sintered composites. *Materials Research*, v9, n1, 65-71
4. Suchanek W., Yoshimura M. (1998) Processing and properties of hydroxyapatite based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. of Materials Research* v134, n1 94-117
5. Weng J., Liu X., Zhang X., Ji X. (1994) Thermal decomposition of hydroxyapatite structure induced by titanium and its dioxide. *J. of Materials Science Letters* v13, n3 159-161
6. Egorov A., Smirnov V., Shvorneva L., Kutsev S., Barinov S. (2010) High-temperature hydroxyapatite-titanium interaction. *Inorganic Materials* v46, n2 168-171
7. Norma ISO 10993, Biological evaluation of medical devices
8. Popa C., Simon V., Vida-Simiti I., Batin G., Candea V., Simon S. (2005) Titanium-Hydroxyapatite porous structures for endosseous applications. *J. Materials Science: Materials in medicine* v16 1165-1171
9. Yang Y., Kim K., Mauli Agrawal C., Ong L. (2004) Interaction of hydroxyapatite-titanium at elevated temperature in vacuum environment. *Biomaterials* 25 2927-2932
10. Niespodziana K, Jurczyk K., Jurczyk M. (2006) The manufacturing of titanium-hydroxyapatite nanocomposites for bone implant applications. *Nanopages* v1 n2 219-229
11. Batin G., Popa C., Brândusan L., Vida-Simiti I. (2011) Mechanical properties of Ti/HA functionally graded materials for hard tissue replacement. *Powder Metallurgy Progress*, v.11 n3-4, 206-209
12. Ning C.Q., Zhou Y. (2002) In vitro bioactivity of a biocomposite fabricated from Ha and Ti powders by powder metallurgy method. *Biomaterials* 23,14 2909-2915
13. Eriksson M., Andersson M., Adolfsson E., Carlström E. (2006) Titanium-hydroxyapatite composite biomaterial for dental implants. *Powder Metallurgy* v49, n1 70-77
14. López Padilla R. (2013) Desarrollo de estructuras porosas de titanio biocompatible, obtenidas por pulvimetalurgia. Tesis Doctoral FCEfYN – UNC