

CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (MFA) Y MICROSCOPIA DE BARRIDO (MEB) DE RECUBRIMIENTOS DE HIDROXIAPATITA OBTENIDOS POR EL MÉTODO BIOMIMÉTICO SOBRE ACERO INOXIDABLE 316L.

A.Monsalve^{1*}, G. González¹, D. J. Figueira-Tosta².

¹Lab. de Materiales, Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela

²Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

*Autor de Correspondencia: antmonsa@ivic.gob.ve, tlf: +582125041433, fax: +582125041418.

Recibido: Diciembre 2010. Aprobado: Mayo 2011.

Publicado: Mayo 2011.

RESUMEN

Los recubrimientos de hidroxiapatita (HA) sobre acero 316L fueron preparados con el propósito de mejorar los procesos de integración ósea entre el implante y el tejido mediante el método biomimético. Este método consiste en la inmersión de sustratos de acero inoxidable 316L en una solución de Fluido Corporal Simulado (SBF) que imita la concentración iónica inorgánica del plasma sanguíneo por diferentes tiempos, para formar hidroxiapatita. Se evaluó el efecto de la rugosidad superficial, tratamiento alcalino, oxidación, y la concentración de calcio en el SBF sobre la formación del recubrimiento de HA en la superficie de 316L, mediante la caracterización del recubrimiento por MFA y MEB. Se emplearon dos grupos de muestra: unas con acabado especular y otras desbastadas a 600 Grit. Ambos grupo de muestras se trató con NaOH, 5M por 24h a 75⁰C, el otro grupo se oxidó a 400 ⁰C por 1h. Las muestras fueron sumergidas en soluciones de SBF y el otro en SBF- saturada en calcio (SBF-SC) por 8 semanas. Por MFA y MEB se observó un recubrimiento denso en forma de clusters ovalados en las muestras inmersas en SBF-SC, este patrón morfológico también se observó en la otra condición en etapas previas de su formación.

Palabras claves: Hidroxiapatita, Acero Inoxidable 316L, Método Biomimético, Tratamientos Superficiales, SBF, MFA y MEB.

CHARACTERIZATION OF BIOMIMETIC HYDROXYAPATITE COATINGS ON SS316L.

ABSTRACT

Hydroxyapatite coatings on 316L SS were prepared with the objective of improving the osseointegration processes between implants and tissue by a biomimetic method. This method consists in the immersion of SS316L samples in a simulated body fluid solution (SBF) that imitates the inorganic ionic concentration of blood plasma during different periods to form hydroxyapatite. The effect of superficial roughness, alkaline treatment, oxidation and calcium concentration in the SBF solution was evaluated by the analysis of the coating by AFM and SEM. Two groups of samples were employed: one with specular finishing and the other with a surface roughness of 600 grit. Both groups of samples were treated with NaOH, 5M during 24h at 75⁰C. One of the groups was oxidized at 400 ⁰C, 1h. The samples were immersed in two SBF solutions, one conventional and the other calcium saturated (SBF-SC) for 8 weeks. AFM showed a dense coating forming oval clusters in the samples treated in SBF-SC. This morphology pattern was also observed in the other condition in the early stage of formation.

Keywords: Hydroxyapatite, 316LSS, biomimetic method, superficial treatments, SBF, AFM. SEM

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el material metálico más usado para implantes fijos es el titanio debido a su comportamiento biocompatible y biotolerante en el cuerpo humano [1-5]. Como alternativa al titanio, primordialmente por su bajo costo en comparación con este, el uso del acero inoxidable 316L en aplicaciones como material de implante fijo ha sido investigado [1-5]. El principal problema del uso de este material en

aplicaciones en ortopedia es su naturaleza bioinerte y su tendencia a la liberación de iones de cromo en el organismo producto de la interacción con los fluidos corporales humanos. En este sentido los recubrimientos de hidroxiapatita le otorgan al material biocompatibilidad, es decir le proporciona la capacidad de oseeintegración con los tejidos circundantes mejorando la respuesta del organismo ante el implante y evita la liberación de iones de cromo al organismo

[1-5]. La complejidad de los recubrimientos de hidroxiapatita sobre el acero radica en la poca afinidad química entre los enlaces covalentes de los materiales cerámicos y los metálicos del acero, esto se traduce en la adherencia del recubrimiento en el sustrato limitando su uso en implantes fijos [1-5]. En esta investigación se estudia el efecto de los tratamientos superficiales del acero inoxidable 316L y su influencia en la formación del recubrimiento de hidroxiapatita mediante el método biomimético [1-5], este consiste en la inmersión de sustratos en una solución de Fluido Corporal Simulado (SBF) que imita la concentración iónica del plasma que asegura la formación de apatitas. El efecto de los tratamientos superficiales tiene como fin mejorar los recubrimientos de hidroxiapatita en términos de estabilidad, adhesión y homogeneidad [1-5]. Para ello se evaluará los efectos de los tratamientos superficiales químicos, térmicos y mecánicos con la inmersión en soluciones de SBF con diferentes concentraciones de calcio sobre la repercusión final en las características del recubrimiento de apatita formada en un tiempo de 8 semanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

A una barra de acero inoxidable 316L Bioline se cortó en 60 discos de diámetros de 10mm y 1,6mm de espesor. De los 60 discos 30 se sometieron al desbaste con lija de 600 Grit y los 30 restantes fueron pulidos a acabado especular. Después del pulido las muestras fueron lavadas en ultrasonido con agua destilada, etanol y acetona por 15 minutos respectivamente para retirar restos de polvo de alúmina, partículas de acero, grasa u otros contaminantes. Posteriormente 10 muestras de acabado especular y 10 muestras desbastadas a 600 Grit fueron sometidas a tratamientos térmicos colocándolas en crisoles de cerámica y sometidas a 400°C por una hora. Luego 20 muestras de acabado especular y 20 muestras con desbastado a 600 Grit se sometieron al tratamiento con NaOH. Para ello se preparó 100 ml de solución al 5M pesando 60 gramos de NaOH sólido disolviéndolo lentamente en 100 ml de agua destilada. Las muestras se colocaron en

el crisol de teflón y se añadió la solución de NaOH de manera que estuviesen totalmente cubiertas y a una temperatura de 75 °C por 24 horas. Seguidamente las muestras se lavaron con abundante agua destilada en ultrasonidos para eliminar residuos de sodio provenientes de la inmersión en NaOH por aproximadamente 20 minutos y se secadas en el horno por 24 horas más. El tratamiento con NaOH se realiza con el propósito de activar la superficie del acero mediante la formación de Na_4CrO que servirá de ancla entre el metal mediante el intercambio de iones de sodio con iones de calcio presentes en la solución según el mecanismo planteado por Teixeira *et al* (2003)[6] y el recubrimiento de apatita. Una vez cumplido el tratamiento con NaOH 10 muestras de acabado especular y 10 desbastadas a 600 Grit fueron sometidas a tratamiento térmico según el procedimiento descrito anteriormente. Finalmente la inmersión del grupo de muestras se realizó empleando el método de preparación del Fluido Corporal Simulado (SBF) y Fluido Corporal Saturado en Calcio (SBF_SC) propuesto por Kokubo y Takadama, (2006)[5].

Los reactivos listados en la Tabla 1 se agregaron en un beaker con agua destilada colocado sobre una plancha de agitación magnética constante según el orden indicado.

Tabla.1. Reactivos necesarios para la preparación de un litro de Fluido Corporal Simulado (SBF) y Fluido Corporal Simulado Saturado en Calcio (SBF-SC).

Reactivo	Nombre	Cantidad en gramos		Pureza (%)
		SBF	SBF-SC	
NaCl	Cloruro de sodio	7,99	7,99	99,5
NaHCO ₃	Carbonato de sodio	0,350	0,350	99,5
KCl	Cloruro de potasio	0,224	0,224	99,6
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio	0,174	0,174	99,8
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Cloruro de magnesio hidratado	0,305	0,305	99,0
HCl (1N)	Ácido clorhídrico	40(ml)	40(ml)	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de Calcio hidratado	0,372	0,558	99,5
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio	0,071	0,071	99,5
NHC(CHH) ₃	Tris (hidroximetil) amino metano (TRIS)	6,057	6,057	99,5

Se debe esperar la disolución de un reactivo para la adición del próximo. Una vez agregado el Na_2SO_4 se introdujo el electrodo del pH-metro en la solución, previamente calibrado con una solución buffer estándar pH $7 \pm 0,02$. La adición del TRIS debió hacerse paulatinamente, si se agrega gran cantidad de TRIS se aumenta bruscamente el pH de la solución pudiéndose precipitar la hidroxiapatita en la solución. El TRIS se agregó lentamente, esperando su disolución total en la solución y la estabilización del valor de pH para seguir el proceso de adición de TRIS. Una vez que durante la disolución del TRIS el pH de la solución se incrementó a valores cercanos de pH de 7.42, se añadieron gotas de HCl 1 N para disminuir el pH y continuar la adición. Una vez agregado todo el TRIS el pH de la solución es ajustado con HCl 1 N hasta lograr el valor de 7,25. El SBF es almacenado en recipientes de PET (polietileno-tereftalato) y a una temperatura de 10°C por un tiempo no mayor de 30 días. La inmersión del grupo de muestras se llevó a cabo en soluciones de SBF y SBF-SC, para ello las muestras se colocaron horizontalmente en el interior de un beaker PYREX de 1L de capacidad. En el exterior del beaker se colocó una manta de calentamiento con el fin de mantener la

temperatura interna de la solución en 37°C . El SBF fue cambiado en los sistemas cada tres días para imitar la concentración iónica constante del plasma sanguíneo. Luego de haberse cumplido las 8 semanas para cada sistema, las muestras fueron retiradas del sistema, lavadas con abundante agua y secadas con aire para su posterior caracterización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización del recubrimiento mediante FTIR determinó la identificación del grupo funcional fosfato e hidroxilo característicos de la hidroxiapatita, que se encuentra en una etapa incipiente de formación con tamaño de grano nanocrystalino.

En la Fig.1 se muestran dos espectros de FTIR de HA. El espectro de color azul es de una HA obtenida mediante síntesis en el laboratorio, la cual se usa como patrón de referencia, y el espectro de color negro es el recubrimiento de HA obtenido después de 8 semanas de inmersión en SBF-SC. En ambos espectros se aprecian las vibraciones características del grupo funcional fosfato [ν_3 1034 y 1091cm^{-1}] y [ν_4 562 a 564cm^{-1}] y del grupo hidroxilo (OH) a 3572cm^{-1} [7].

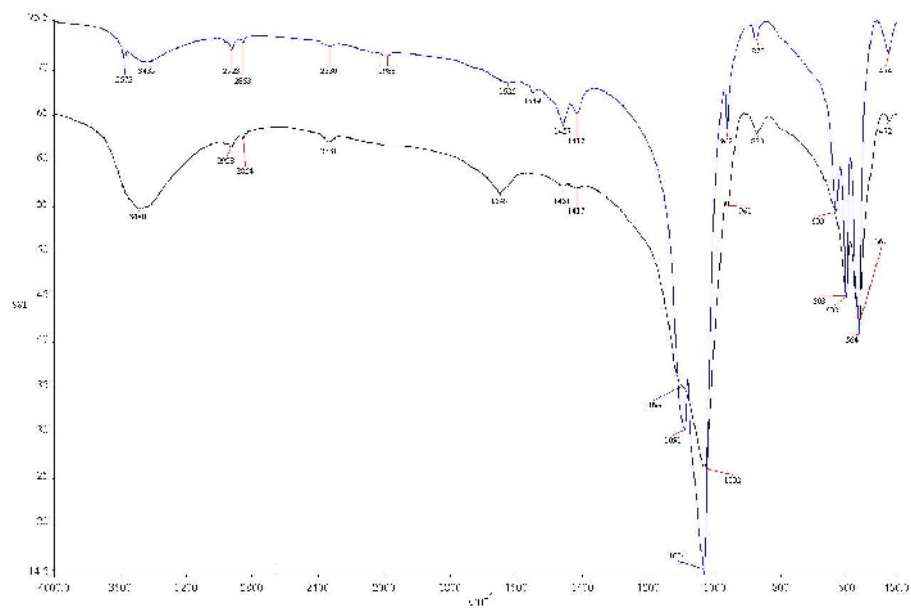


Fig.1. Espectros de IR de HA. El espectro de color azul es de una HA nanocrystalina obtenida mediante síntesis en el laboratorio y el espectro de color negro es del recubrimiento de HA obtenido después de 8 semanas de inmersión en SBF-SC

En la Fig.2 se muestra la caracterización morfológica para una muestra con acabado especular tratada con NaOH a 5M y posteriormente oxidadas a 400°C por una hora e inmersas en SBF-SC por 8 semanas. La Fig.2a es una imagen de Microscopia Óptica (MO), obsérvese que el color rojizo de la superficie del acero tratado es indicativo de la presencia de una película delgada. La Fig.2b es la imagen de MEB, la cual presenta una morfología en forma de glóbulos típica de los compuestos de HA obtenidos por el método biomimético. Las Fig.2c y Fig.2d son imágenes topográficas y de deflexión de MFA respectivamente para un área de barrido de 10µm x 10µm. En c) se observa la topografía de la muestra, esta presenta una morfología similar a la observada por MEB, al observar en detalle en la imagen d) generada por la deflexión del brazo del MFA dónde se observa cierta

diferencia de la morfología de los glóbulos observados por MEB. Esto se debe a que el brazo del MFA al recorrer la superficie es capaz de barrer los espacios presentes entre los glóbulos definiendo de manera más precisa la morfología del recubrimiento de apatita.

El MFA permite realizar mediciones a escala nanométrica con barridos de áreas desde 100µm hasta nanómetros si el material en estudio lo amerita. En la Fig.3 se aprecia el detalle la morfología del recubrimiento de HA con un área de barrido de 1µm x 1µm. En la parte superior de la figura se observa la morfología del grano del recubrimiento de apatita y en la parte inferior el perfil topográfico del área de barrido. Del perfil podemos observar el tamaño de los glóbulos de HA en el recubrimiento siendo este valor aproximadamente de 280 nm.

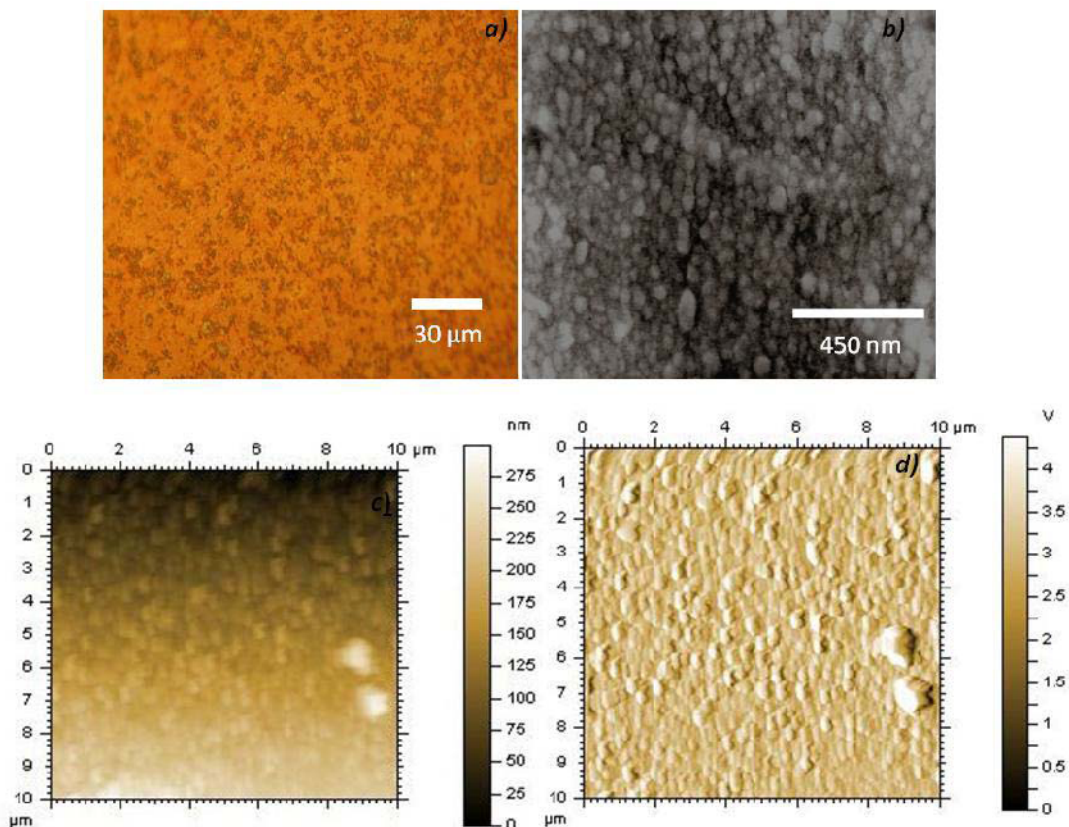


Fig.2. Muestra de acabado especular tratadas con NaOH a 5M y posteriormente oxidadas a 400°C, por 1h. Inmersas en SBF-SC 8 semanas a) Micrografía de microscopio óptico a 500X, b) Micrografía de MEB a 40.000X y voltaje de aceleración 5kV, c) Imagen topográfica obtenida por MFA, área de barrido 10µm x 10µm, d) Imagen de deflexión de MFA, área de barrido 10 µm x 10 µm.

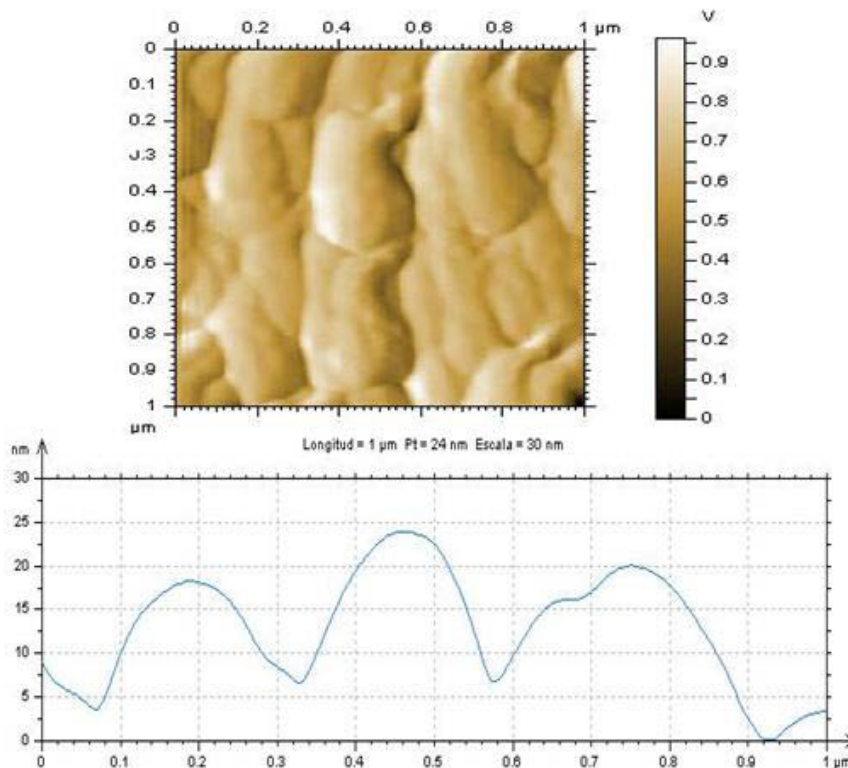


Fig.3. Imagen de Deflexión y perfil de rugosidad del recubrimiento de HA obtenido en superficie de acabado especular tratada con NaOH a 5M y oxidación a 400°C por 1h. Inmersas en SBF-SC durante 8 semanas.

En la Fig.4 se muestran los resultados para la misma condición anterior de inmersión en SBF, pero para una muestra con superficie desbastada a 600 Grit. En la Fig.4a se presenta la imagen MO en ella se observa el color rojizo del sustrato por lo que indica igual al caso de la Fig.2a la naturaleza de un recubrimiento delgado. La Fig.4b es la imagen de MEB del recubrimiento obtenido, se observa una morfología en forma de glóbulos de tamaño de grano 1,32μm pero de mayor tamaño (ver Fig.5) comparada con la obtenida en el acabado especular Fig.3. Nótese que esta morfología no se observa con claridad en las imágenes de la Fig.4c y 4d obtenidas por MFA debido a la naturaleza de la abrupta de la topografía en estudio. Para el estudio de los recubrimientos por MFA fue operado en modo Tapping o Contacto Intermitente. En este modo el brazo recorre la superficie tocando intermitente la muestra, evitando así arrastrar material depositado en la superficie que genere imágenes de baja calidad producto de valles altos en la superficie dónde la punta del microscopio presenta dificultad para superarlos.

En la Fig.5 se detalla el tamaño de granulos del recubrimiento de HA formado en la superficie de la muestra desbastada 600 Grit. La morfología es semejante a la presentada para la superficie de acabado especular. El tamaño de los “granulos” o “clusters” es de aproximadamente 1,32μm y para la superficie de acabado especular bajo la mismas condiciones de tratamiento superficial y condiciones de inmersión en SBF es de aproximadamente 280nm.

Este hecho es indicativo de la influencia de la rugosidad superficial en el fenómeno de formación de los núcleos de HA en la superficie.

Esta diferencia de tamaño se debe primordialmente a dos factores: el primero se relaciona con la diferencia de área superficial entre la superficie desbastada y la especular. Por otro lado la superficie desbastada posee mayor número de sitios activos para la formación de los núcleos de HA en el proceso de intercambio iónico con iones de calcio presentes en el SBF. Esto ocasiona un mayor crecimiento de los núcleos de HA de manera más rápida. Además la

topografía de la muestra favorece la aglomeración de “clusters” de HA promoviendo el crecimiento en

estructuras de mayor tamaño.

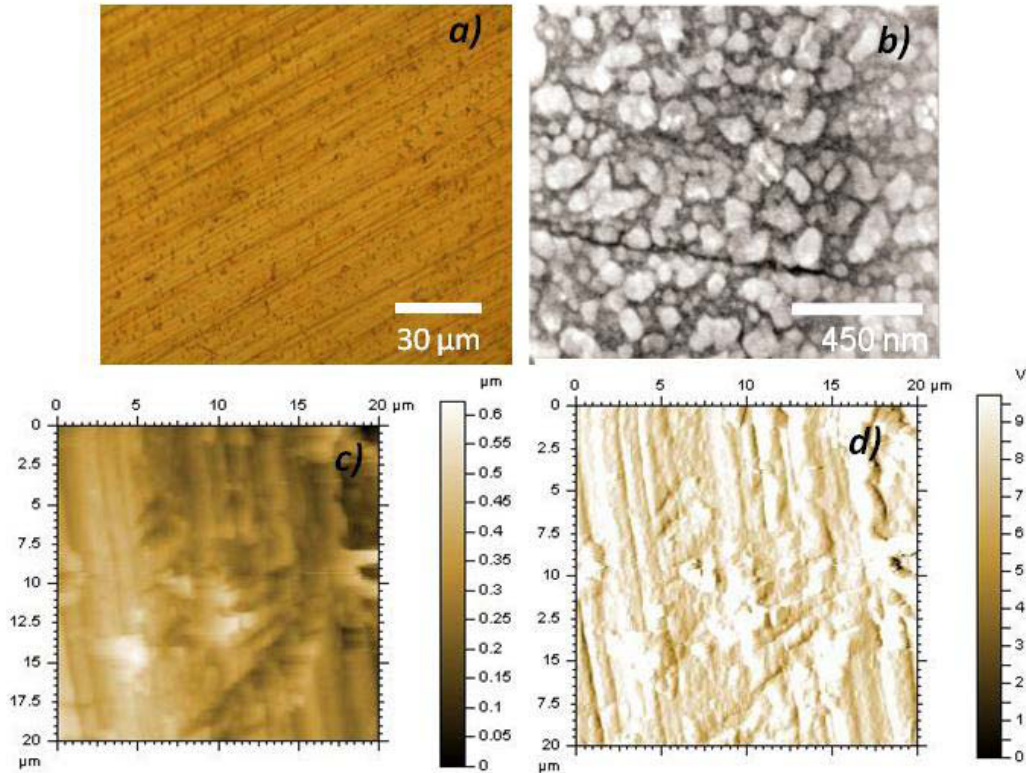


Fig.4. Muestra desbastada a 600 Grit tratada con NaOH a 5M y posteriormente oxidada a 400°C, por 1h. Inmersas en SBF-SC por 8 semanas, a) Micrografía de microscopio óptico a 500X, b) Micrografía de MEB (5kV) c) Imagen Topográfica de MFA y d) Imagen de Amplitud.

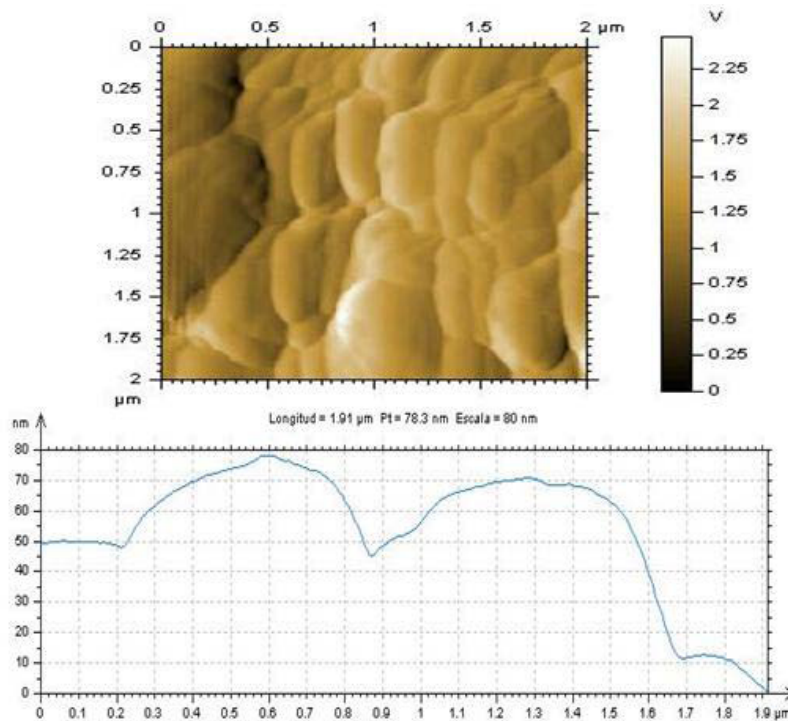


Fig.5. Imagen Topográfica de Deflexión y perfil de rugosidad de MFA del recubrimiento de HA obtenido en superficie desbastada a 600 Grit y tratada con NaOH a 5M y oxidación a 400°C por 1h. Inmersas en SBF-SC durante 8 semanas.

En las Fig.6 y Fig.7 se presenta las muestras con los tratamientos superficiales con NaOH y posteriormente oxidadas a 400°C por 1h y sometidas a inmersión en SBF para ser comparadas con las muestras con el mismo tratamiento superficial inmersas en SBF-SC. Al compararse las topografías de la muestra inmersa en SBF-SC con la inmersa en SBF, ver (Fig.2, Fig.4, Fig.6 y Fig.7) es evidente que en las muestras inmersas en SBF-SC la película es mucho más homogénea que las inmersa en SBF la cual tiene un recubrimiento de apatita dispersos y no homogéneos en la superficie

debido a la concentración de calcio y fósforo del SBF el proceso de formación de los núcleos de apatita es mucho más lento en comparación con las muestras inmersas en SBF-SC. En otras palabras el aumento de la concentración de calcio en la solución de SBF beneficia de manera significativa la formación del recubrimiento aun cuando se obtuvo películas delgadas. Este aumento de la concentración ya sea de calcio, fósforo individualmente o el aumento de ambos conlleva a una formación del recubrimiento en un tiempo menor.

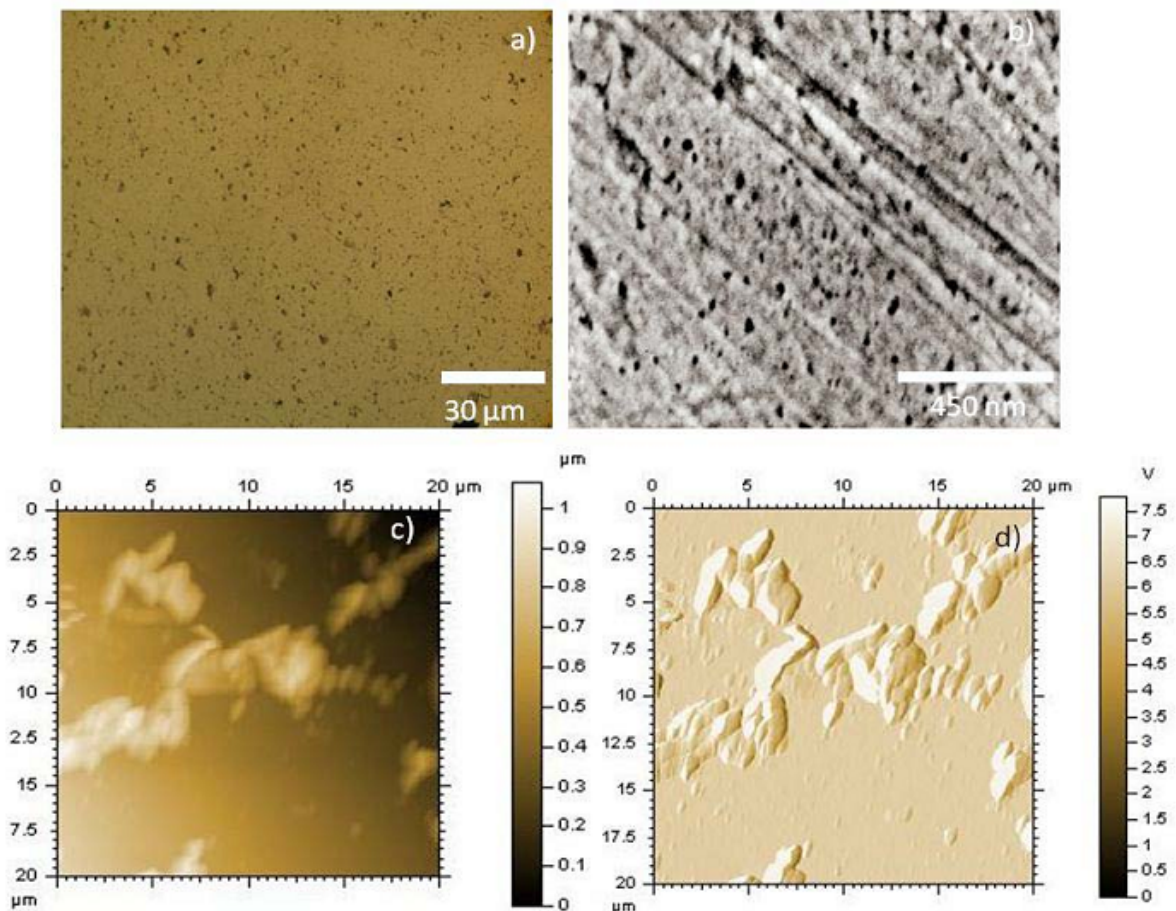


Fig.6. Muestra de acabado especular tratadas con NaOH a 5M y oxidada a 400°C por 1h. Inmersas en SBF por 8 semanas a) Micrografía de MO, b) Micrografía de MEB, c) Imagen Topográfica de MFA, d) Imagen de Amplitud (MFA).

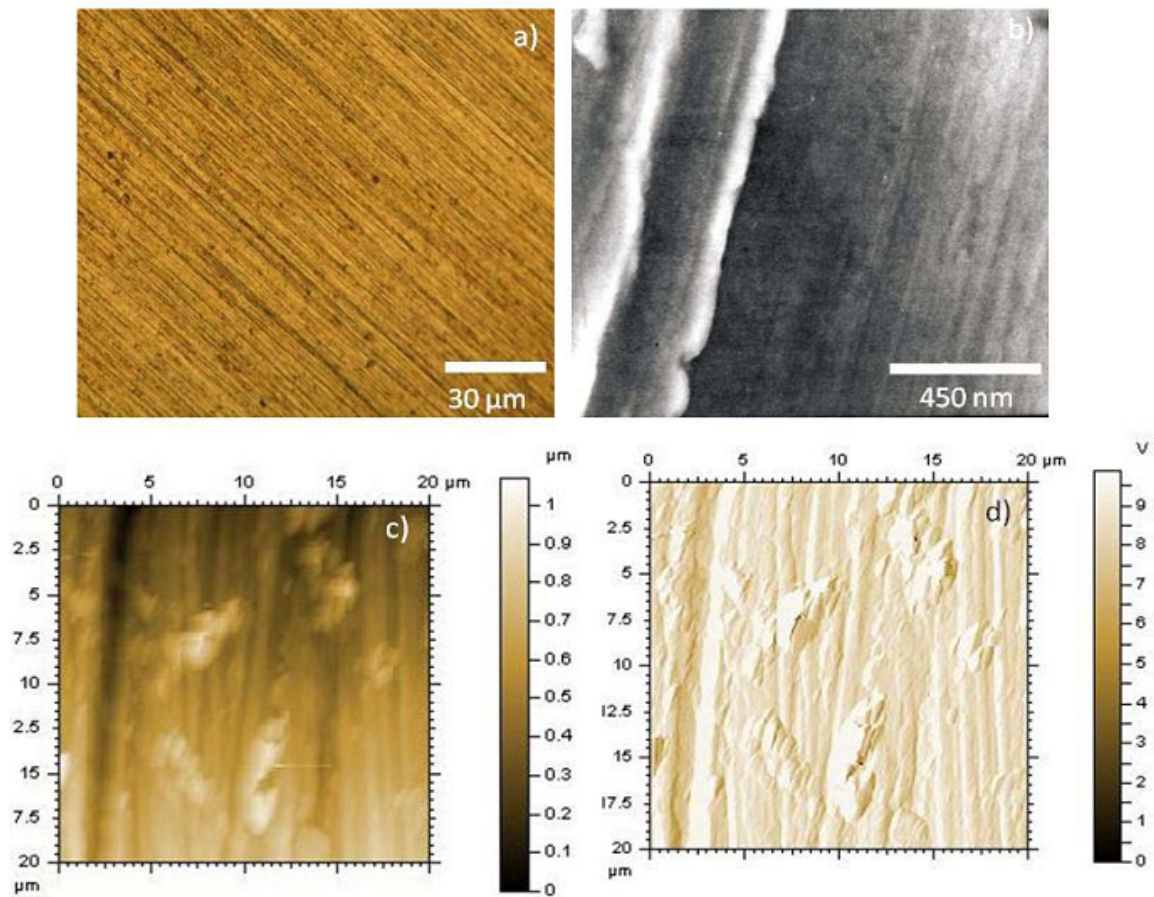


Fig.7. Muestra desbastada a 600 Grit tratada con NaOH a 5M y oxidada a 400°C por 1h. Inmersas en SBF por 8 semanas, a) Micrografía de MO, b) Micrografía de MEB, c) Imagen Topográfica de MFA y d) Imagen de Amplitud de MFA.

CONCLUSION

Los cambios morfológicos producidos por la oxidación y consecuentemente la formación de la película del óxido de cromo promueve la formación de apatita sobre la superficie. En cambio el tratamiento superficial con NaOH modifica la topografía de la superficie pero por sí solo no induce la formación de apatita sobre la superficie del acero inoxidable 316L. Pero la concentración de calcio y fósforo del Fluido Corporal Simulado (SBF) son determinantes en la formación de la película, el aumento de la concentración de calcio favorece la formación de películas de apatita y disminuye los tiempos de inmersión.

REFERENCIAS

- [1] Márquez, A. (2005). Los materiales de implante y su biocompatibilidad: Hidroxiapatita. *Materiales avanzados*, 4: 43-48.
- [2] Kim, H.K., Miyaji, F., Kokubo, T. (1997). Effect of the heat treatment on apatite forming ability of Ti induced by alkali treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6:341-347.
- [3] Kokubo, T. (2008). *Bioceramics and their clinical applications*. CRC Press. Boca Raton, Florida.

- [4] Ratner, B. (2004). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier Press. China p. 10-12.
- [5] Kokubo, T y Takadama, H. (2006). How usefull is SBF predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials*. 27: 2907-2915.
- [6] Texeira R., de Godoy, G., Pereira, M. (2003). Calcium phosphate on alkali treated titanium alloy and stainless steel. *Materials Research*, 2:299-303.
- [7] Lin, F.H., Hsu, Y.S., Lin, S.H., Sin, J.S. (2002). The effect of the Ca/P concentration and temperature on the growth of hydroxyapatite coating on alkali treated 316L stainless steel. *Biomaterials*, 4: 4029-4038.