

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST  
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

**Number 106-108**

Numer 106-108

**Volume XIV**

Rok XIV

**DECEMBER 2011**

GRUDZIEŃ 2011

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**

WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Krakow**

Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

**EDITORIAL  
COMMITTEE:**

KOMITET  
REDAKCYJNY:

**Editor-in-Chief**

Redaktor naczelny  
**Jan Chłopek**

**Editor**

Redaktor  
**Elżbieta Pamuła**

**Secretary of editorial**

Sekretarz redakcji  
**Design**

Projekt  
**Katarzyna Trała  
Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF**

**EDITORIAL OFFICE:**  
ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST**

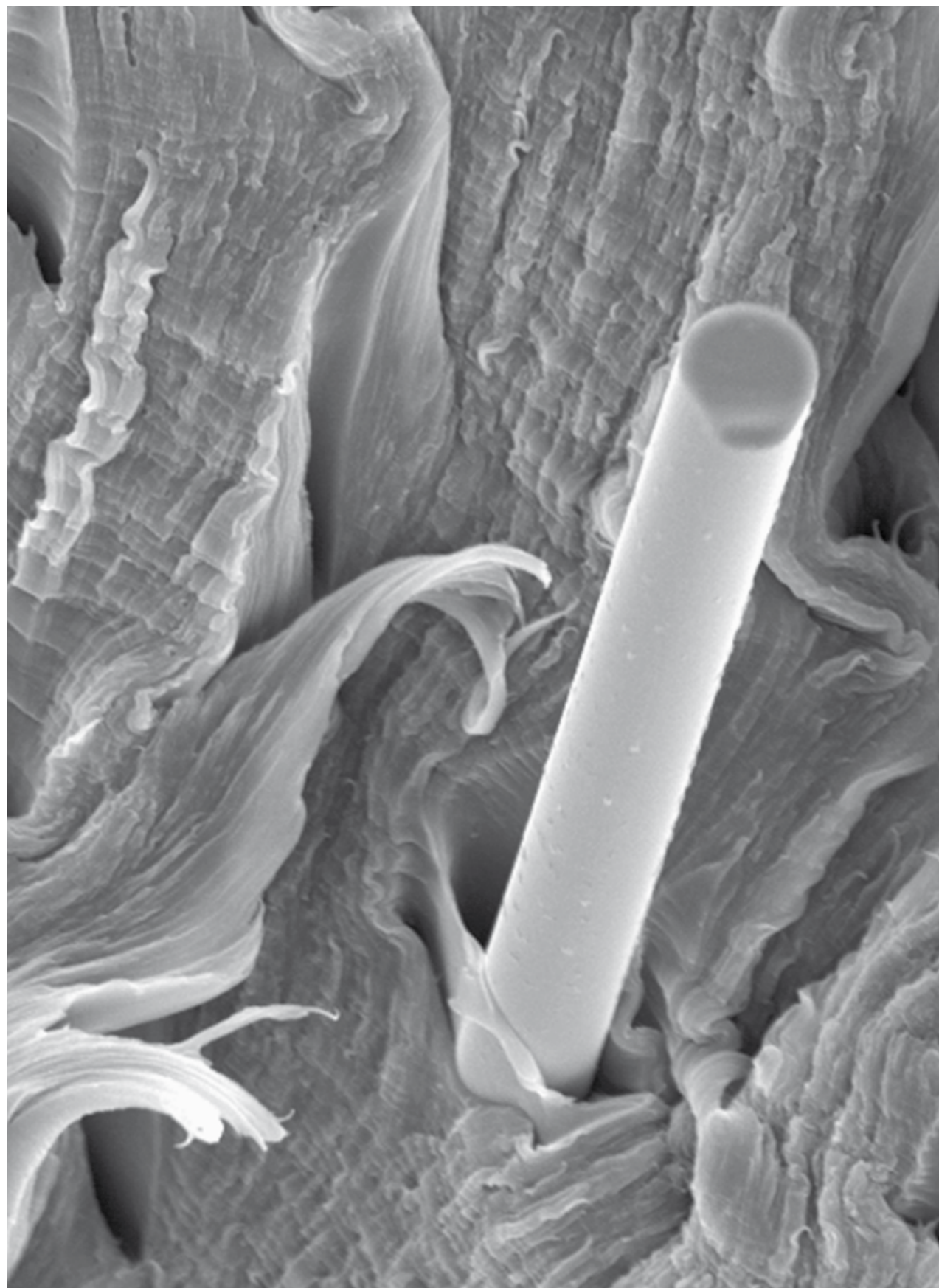
**30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland**  
Akademia  
Górnictwo-Hutnicza  
al. Mickiewicza 30/A-3  
30-059 Kraków

**Issue: 200 copies**

Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing  
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe  
AKAPIT  
e-mail: wn@akapit.krakow.pl



**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD**  
**MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

**Iulian Antoniac**

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

**Lucie Bacakova**

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

**Romuald Będziński**

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Marta Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Stanisław Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Maria Borczuch-Łączka**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Wojciech Chrzanowski**

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

**Tadeusz Cieślik**

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

**Jan Ryszard Dąbrowski**

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

**Andrzej Górecki**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Robert Hurt**

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

**James Kirkpatrick**

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

**Wojciech Maria Kuś**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Małgorzata Lewandowska-Szumieł**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Jan Marciniak**

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Sergey Mikhalovsky**

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

**Stanisław Mitura**

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

**Roman Pampuch**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Stanisław Pielka**

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

**Vehid Salih**

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

**Jacek Składzień**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, CRACOW

**Andrei V. Stanishevsky**

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

**Anna Ślósarczyk**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Tadeusz Trzaska**

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

**Dimitris Tsipas**

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzycy obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
  - TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 25 61  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

[www.biomat.krakow.pl](http://www.biomat.krakow.pl)

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:  
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41  
Konto:  
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów  
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3  
Bank Śląski S.A. O/Kraków,  
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001  
Opłaty: cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
  - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words)
  - Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...
6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.
11. Manuscripts should be submitted for publication to:

Journal  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
AGH University of Science and Technology  
Faculty of Materials Science and Ceramics  
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 25 61  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

[www.biomat.krakow.pl](http://www.biomat.krakow.pl)

## Subscription terms

Subscription rates:  
Cost of one number: 20 PLN  
Payment should be made to:  
Polish Society for Biomaterials  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland  
Bank Slaski S.A. O/Krakow  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

*XXI Conference on  
BIOMATERIALS  
IN MEDICINE  
AND  
VETERINARY  
MEDICINE*

*13-16 October 2011  
Hotel "Perła Południa"  
Rytro, Poland*

**[www.biomat.agh.edu.pl](http://www.biomat.agh.edu.pl)**



## SPIS TREŚCI

MINERALIZATION AND DEGRADATION OF POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE) / HYDROXYAPATITE ELECTROSPUN MEMBRANES I. RAJZER, R. KWIATKOWSKI, E. SARNA, J. JANICKI	5
EXPERIMENT-BASED FE SIMULATION OF ONCOLOGY KNEE ENDOPROSTHESIS L. ZACH, S. KONVICKOVA, P. RUZICKA	10
BIOACTIVE HYDROXYAPATITE CERAMICS AS SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING - A PRELIMINARY STUDY D. SOUKUP, D. HORAKOVA, H. SUMBEROVA, J. ANDERTOVA, M. BACAKOVA, L. BACAKOVA	13
PRELIMINARY INVESTIGATION OF ALGINATE FIBERS MODIFIED WITH MAGNETITE A. FRACZEK-SZCZYPTA, A. PIECEK, M. BOGUN, S. BLAZEWICZ	17
ODPORNOŚĆ KOROZYJNA UTLENIANEGO ANODOWO STOPU Ti6Al4V ELI PO DŁUGOTRWAŁEJ EKSPOZYCJI W PŁYNIE RINGERA J. SZEWCZENKO, J. MARCINIAK, M. KACZMAREK	21
SPEKTROSKOPIA MIKRO-RAMANOWSKA W OCENIE POWŁOK HA NA Ti A. STRZAŁA, M. MARSZAŁEK	26
SYNTEZA BIODEGRADOWALNYCH ANTYBAKTERYJNYCH POLIURETANÓW M. SOB CZAK, E. OLĘDZKA, C. DĘBEK	30
BADANIA MIKROPRZECIEKU WYBRANYCH KOMPOZYTÓW STOMATOLOGICZNYCH PO PROCESIE ZMĘCZENIA CIEPLNEGO K. PAŁKA, A. NIEWCZAS	35
ANALIZA MES ZĘBÓW Z WYPEŁNIENIEM STOMATOLOGICZNYM PRZY OBCIĄŻENIU TERMICZNYM K. PAŁKA, J. BIENIAŚ, H. DĘBSKI	39
ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCJI W BADANIACH KOROZJI KLAMER NiTi UŻYTYCH W OSTEOSYNTYZIE ZŁAMAŃ KOŚCI TWARZY B. ŁOSIEWICZ, Z. LEKSTON, K. PRUSIK, A. WINIARSKI, M. JĘDRUSIK-PAWŁOWSKA	44

## CONTENTS

MINERALIZATION AND DEGRADATION OF POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE) / HYDROXYAPATITE ELECTROSPUN MEMBRANES I. RAJZER, R. KWIATKOWSKI, E. SARNA, J. JANICKI	5
EXPERIMENT-BASED FE SIMULATION OF ONCOLOGY KNEE ENDOPROSTHESIS L. ZACH, S. KONVICKOVA, P. RUZICKA	10
BIOACTIVE HYDROXYAPATITE CERAMICS AS SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING - A PRELIMINARY STUDY D. SOUKUP, D. HORAKOVA, H. SUMBEROVA, J. ANDERTOVA, M. BACAKOVA, L. BACAKOVA	13
PRELIMINARY INVESTIGATION OF ALGINATE FIBERS MODIFIED WITH MAGNETITE A. FRACZEK-SZCZYPTA, A. PIECEK, M. BOGUN, S. BLAZEWICZ	17
CORROSION RESISTANCE OF ANODIZED Ti6Al4V ELI ALLOY AFTER LONG-TERM EXPOSURE TO RINGER' SOLUTION J. SZEWCZENKO, J. MARCINIAK, M. KACZMAREK	21
MICRO-RAMAN SPECTROSCOPY IN ASSESSMENT OF HA COATING ON Ti A. STRZAŁA, M. MARSZAŁEK	26
SYNTHESIS OF BIODEGRADABLE ANTIMICROBIAL POLYURETHANES M. SOB CZAK, E. OLĘDZKA, C. DĘBEK	30
MICROLEAKAGE OF SELECTED THERMOCYCLED DENTAL RESTORATIONS K. PAŁKA, A. NIEWCZAS	35
FINITE ELEMENT ANALYSIS OF DENTAL RESTORATIONS UNDER THERMAL LOADING K. PAŁKA, J. BIENIAŚ, H. DĘBSKI	39
APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY FOR CORROSION INVESTIGATIONS OF THE NiTi STAPLES USED IN OSTEOSYNTHESIS OF THE FACIAL BONE FRACTURES B. ŁOSIEWICZ, Z. LEKSTON, K. PRUSIK, A. WINIARSKI, M. JĘDRUSIK-PAWŁOWSKA	44

**CHARAKTERYZACJA NOWEGO PRZECIWBAKTE-  
RYJNEGO CEWNIKA MOCZOWEGO PODDANEGO  
DZIAŁANIU TOSUFLOKSACYNY**

D. KOWALCZUK, G. GINALSKA **50**

**WPLYW JONÓW  $\text{SiO}_4^{4-}$  NA STRUKTURĘ CHEMICZNĄ  
ORAZ WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE  
SYNTEZY NANOKRYSTALICZNEGO  
HYDROKSYAPATYTU**

J. KOLMAS, A. PRZYBYLSKI, Ł. PAJCHEL,  
W. KOŁODZIEJSKI **54**

**ZASTOSOWANIE PARYLENU C JAKO POWŁOKI  
OCHRONNEJ NA POWIERZCHNI IMPLANTU  
METALOWEGO**

M. CIEŚLIK **62**

**WSTĘPNE BADANIA BIOKOMPATYBILNOŚCI  
POLIURETANÓW OTRZYMANYCH Z UDZIAŁEM  
SYNTEZY POLIHYDROKSUMAŚLANU**

J. BRZESKA, H. JANIK, M. KOWALCZUK, M. RUTKOWSKA **65**

**WPLYW POLIURETANÓW Z SYNTEZY  
POLIHYDROKSUMAŚLANEM NA WZROST  
MIKROORGANIZMÓW**

J. BRZESKA, H. JANIK, M. KOWALCZUK, M. RUTKOWSKA **73**

**BADANIA MECHANIZMU DEGRADACJI IN VIVO  
TERPOLIMERÓW Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU**

A. JAROS, K. GĘBAROWSKA, J. STOJKO,  
J. KASPERCZYK, A. SMOLA **79**

**ZASTOSOWANIE METODY FT-IRM W BADANIACH  
ADSORPCJI MUCYNY NA POWIERZCHNI  
WYBRANYCH BIOMATERIAŁÓW**

J. MYSTKOWSKA, J. KOLMAS, J. R. DĄBROWSKI **85**

**ZASTOSOWANIE TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ  
W OCENIE MORFOMETRYCZNEJ KRĘGOSŁUPA  
SZYJNEGO POD KĄTEM BIO-STABILIZACJI**

L. F. CIUPIK, A. KIERZKOWSKA, P. JACEK **89**

**OCENA TOMOGRAFICZNA KONTAKTU IMPLANTU  
TYTANOWEGO Z TKANKĄ KOSTNĄ  
ŚWIŃSKIEGO KRĘGOSŁUPA**

L. F. CIUPIK, E. FLIS **95**

**NOWE MATERIAŁY KOMPOZYTOWE BAZUJĄCE  
NA OSNOWIE POLILAKTYDOWEJ PRZEZNACZONE  
NA GWOŹDZIE ŚRÓDSZPIKOWE**

A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J. CHŁOPEK,  
P. DOMALIK, M. BOGUŃ **99**

**POWSTAWANIE APATYTU NA ELASTYCZNYM  
KOMPOZYCIE KOŚCIOZASTĘPCZYM**

L. BORKOWSKI, G. GINALSKA, A. ŚLÓSARCZYK,  
Z. PASZKIEWICZ **105**

**CHARACTERIZATION OF THE NOVEL  
ANTIMICROBIAL TOSUFLOXACIN-TREATED  
URINARY CATHETER**

D. KOWALCZUK, G. GINALSKA **50**

**INFLUENCE OF  $\text{SiO}_4^{4-}$  IONS ON THE CHEMICAL  
STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL  
PROPERTIES OF SYNTHETIC NANOCRYSTALLINE  
HYDROXYAPATITE**

J. KOLMAS, A. PRZYBYLSKI, Ł. PAJCHEL,  
W. KOŁODZIEJSKI **54**

**PARYLENE C COATING AS  
A PROTECTIVE LAYER ON  
METAL IMPLANT SURFACE**

M. CIEŚLIK **62**

**PRELIMINARY INVESTIGATIONS OF  
BIOCOMPATIBILITY OF POLYURETHANES BASED  
ON SYNTHETIC POLYHYDROXYBUTYRATE**

J. BRZESKA, H. JANIK, M. KOWALCZUK, M. RUTKOWSKA **65**

**INFLUENCE OF POLYURETHANES BASED ON  
SYNTHETIC POLY([R,S]-3-HYDROXYBUTYRATE)  
ON MICROORGANISMS GROWTH**

J. BRZESKA, H. JANIK, M. KOWALCZUK, M. RUTKOWSKA **73**

**THE MECHANISM OF SHAPE MEMORY  
TERPOLYMERS' IN VIVO DEGRADATION**

A. JAROS, K. GĘBAROWSKA, J. STOJKO,  
J. KASPERCZYK, A. SMOLA **79**

**THE APPLICATION OF FT-IRM TECHNIQUE IN  
RESEARCH OF MUCIN ADSORPTION ON  
SELECTED BIOMATERIALS SURFACE**

J. MYSTKOWSKA, J. KOLMAS, J. R. DĄBROWSKI **85**

**APPLICATION OF COMPUTED TOMOGRAPHY IN  
MORPHOMETRIC EVALUATION OF CERVICAL SPINE  
IN TERMS OF BIO-STABILIZATION**

L. F. CIUPIK, A. KIERZKOWSKA, P. JACEK **89**

**TOMOGRAPHICAL EVALUATION OF THE CONTACT  
OF TITANIUM IMPLANT WITH BONE TISSUE  
OF THE PORCINE SPINE**

L. F. CIUPIK, E. FLIS **95**

**NEW COMPOSITE MATERIALS BASED  
ON POLYLACTIDE MATRIX FOR  
INTRAMEDULLARY NAILS**

A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J. CHŁOPEK,  
P. DOMALIK, M. BOGUŃ **99**

**APATITE FORMATION ON A FLEXIBLE  
BONE SUBSTITUTE**

L. BORKOWSKI, G. GINALSKA, A. ŚLÓSARCZYK,  
Z. PASZKIEWICZ **105**

STRUKTURA I WŁASNOŚCI MECHANICZNE MODYFIKOWANYCH STOPÓW CoCrMo DO ZASTOSOWAŃ W PROTETYCE STOMATOLOGICZNEJ K. BEER, M. WALCZAK	110
KOMPOZYTY Z KRÓTKIMI WŁÓKNAMI NA OSNOWIE POLIAMIDU Z SUROWCÓW ODNAWIALNYCH NA ELEMENTY STABILIZATORÓW MEDYCZNYCH M. SROKA, G. PYKO, S. KUCIEL	116
BIOKOMPOZYTY POLIMEROWE NA ELEMENTY SPRZĘTU RAHABILITACYJNEGO N. PILIP, S. KUCIEL, P. KUŹNIAR	120
ELEKTROFORETYCZNE OSADZANIE HYDROKSYAPATYTU NA POWIERZCHNI STOPÓW NiTi WYKAZUJĄCYCH PAMIĘĆ KSZTAŁTU T. GORYCZKA, B. SZARANIEC, K. DUDEK, Ł. ZYCH, M. FREITAG, J. LELAŃKO	124
KOMPOZYT NA BAZIE TYTANU – POTENCJALNY BIOMATERIAŁ IMPLANTACYJNY P. DEPTUŁA, J. R. DĄBROWSKI, A. SOBOLEWSKI	129
WPLYW WARSTW TiO <sub>2</sub> OTRZYMYWANYCH METODĄ ZOL-ŻEL NA WŁAŚCIWOŚCI KOROZYJNE BIOMEDYCZNEGO STOPU M30NW W ROZTWORZE 0,9% NaCl B. BURNAT, T. BŁASZCZYK, A. LENIART, H. SCHOLL	133
WPLYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI NA ODPORNOŚĆ KOROZYJNĄ STOPU Ti-6Al-7Nb M. BASIAGA, J. SZEWCZENKO, Z. PASZENDA, J. MARCINIAK	140
ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ DO OCENY PASYWOWANYCH POWIERZCHNI DRUTÓW STALOWYCH WYKORZYSTYWANYCH NA PROWADNIKI KARDIOLOGICZNE W. WALKE, J. PRZONDZIONO	145
ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ DO OCENY STOPU Ti-6Al-4V ELI STOSOWANEGO W ORTOPEDII M. POCHRZAŚT, J. MARCINIAK, W. WALKE, M. KACZMAREK, J. SZEWCZENKO, S. LOSKA	149
BIOKOMPATYBILNOŚĆ MODYFIKOWANEGO POWIERZCHNIOWO STOPU Ti6Al4V ELI BADANEGO W SBF S. LOSKA, J. SZEWCZENKO, J. TYRLIK-HELD, Z. PASZENDA, M. POCHRZAŚT, K. NOWIŃSKA	154
ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ DO OCENY WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH STOPU Ti-6Al-4V ELI O MODYFIKOWANEJ POWIERZCHNI M. KIEL, J. MARCINIAK, W. WALKE, J. SZEWCZENKO	159

STRUCTURE AND MECHANICAL PROPERTIES OF MODIFIED CoCrMo ALLOYS FOR USE IN DENTAL PROSTHETICS K. BEER, M. WALCZAK	110
THE COMPOSITES WITH SHORT FIBERS BASED ON POLYAMIDE FROM RENEWABLE SOURCES FOR ELEMENTS OF EXTERNAL FIXATION SYSTEM M. SROKA, G. PYKO, S. KUCIEL	116
BIOPOLYMER COMPOSITES FOR PARTS OF REHABILITATION EQUIPMENT N. PILIP, S. KUCIEL, P. KUŹNIAR	120
ELECTROPHORETIC DEPOSITION OF HYDROXYAPATITE COATINGS ON NiTi SHAPE MEMORY ALLOY T. GORYCZKA, B. SZARANIEC, K. DUDEK, Ł. ZYCH, M. FREITAG, J. LELAŃKO	124
TITANIUM COMPOSITE – POTENTIAL IMPLANT BIOMATERIAL P. DEPTUŁA, J. R. DĄBROWSKI, A. SOBOLEWSKI	129
THE EFFECT OF TiO <sub>2</sub> SOL-GEL LAYERS ON CORROSION PROPERTIES OF M30NW BIOMEDICAL ALLOY IN 0.9% NaCl SOLUTION B. BURNAT, T. BŁASZCZYK, A. LENIART, H. SCHOLL	133
INFLUENCE OF SURFACE MODIFICATION ON CORROSION RESISTANCE OF Ti-6Al-7Nb ALLOY M. BASIAGA, J. SZEWCZENKO, Z. PASZENDA, J. MARCINIAK	140
APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY IN ANALYSIS OF SURFACE PASSIVATION OF STEEL WIRES USED FOR CARDIOLOGICAL LEADERS W. WALKE, J. PRZONDZIONO	145
ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY STUDY OF Ti-6Al-4V ELI ALLOY USED IN ORTHOPEADIC M. POCHRZAŚT, J. MARCINIAK, W. WALKE, M. KACZMAREK, J. SZEWCZENKO, S. LOSKA	149
BIOCOMPATIBILITY OF SURFACE MODIFIED Ti6Al4V ELI ALLOY TESTED IN SBF S. LOSKA, J. SZEWCZENKO, J. TYRLIK-HELD, Z. PASZENDA, M. POCHRZAŚT, K. NOWIŃSKA	154
EIS STUDY USE OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF MODIFIED Ti-6Al-4V ELI M. KIEL, J. MARCINIAK, W. WALKE, J. SZEWCZENKO	159

••••• **WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE  
I PRZEBIEG DEGRADACJI KOMPOZYTÓW  
PLA/WŁÓKNA ALGINIANOWE**

**M. BARTKOWIAK-JOWSA, A. KWIATKOWSKA,  
B. SZARANIEC, J. CHŁOPEK, R. BĘDZIŃSKI,  
W. WITKIEWICZ**

**164**

**MECHANICAL PROPERTIES AND  
DEGRADATION BEHAVIOUR OF  
PLA/ALGINATE FIBER COMPOSITES**

**M. BARTKOWIAK-JOWSA, A. KWIATKOWSKA,  
B. SZARANIEC, J. CHŁOPEK, R. BĘDZIŃSKI,  
W. WITKIEWICZ**

**164**

*STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS  
ABSTRACTED IN APPLIED MECHANICS REVIEWS*

*WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI  
I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO  
EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE  
AND HIGHER EDUCATION*



# MINERALIZATION AND DEGRADATION OF POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE) / HYDROXYAPATITE ELECTROSPUN MEMBRANES

IZABELLA RAJZER\*, RYSZARD KWIATKOWSKI,  
EWA SARNA, JAROSŁAW JANICKI

ATH, UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,  
FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,  
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS  
WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

\* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

## Abstract

*The aim of this work was to study mineralization and degradation behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes modified with hydroxyapatite. The membranes have been obtained by electrospinning method. In vitro mineralization and degradation processes were carried out in simulated body fluid (SBF) as the release medium. The weight loss of the samples, water uptakes, pH and calcium, potassium, sodium ions concentrations of the solutions were determined. The chemistry and microstructure of the membranes after different times of incubation in SBF were characterized using SEM, FTIR, and XRD methods. The results of in vitro study in SBF indicate that incorporation of n-HAp strongly activates precipitation of the apatite like materials on the surface of nanofibers.*

**Keywords:** degradation, mineralization, electrospinning, simulated body fluid (SBF)

[*Engineering of Biomaterials*, 106-108, (2011), 5-9]

## Introduction

The present challenge for the progress of bone tissue engineering is to design and fabricate reproducible, bioresorbable scaffold that mimic certain features of native extracellular matrix (ECM). Our efforts have been focused on the incorporation of bioactive inorganic nanoparticles within the polymeric phase reaping up the combinatory roles of bone-bioactivity of inorganic phase and degradability and shape-formability of polymers [1]. Recently the electrospinning technique is getting one of the most popular and versatile tool for fabrication of polymer scaffolds for tissue engineering [2]. A wide variety of materials can be electrospun and fibre- and scaffold morphology can be controlled by different electrospinning parameters. Nonwoven fibrous mats comprised of nanofibers have a very high fraction of surface available to interact with cells, which make them ideal for cell attachment. The incorporation of nanofillers such as hydroxyapatite (HAp) into the nano scale polymer matrix may considerably improve their mechanical, biological and other related properties for tissue engineering applications [3]. Hydroxyapatite belongs to the class of bioactive biomaterials which when implanted into bone defects, forms spontaneously a layer of biologically active bonelike apatite on their surfaces to induce chemical integration with bone tissue [4-5]. Various studies shown that incorporation of bioactive particles into polymer matrix improve its biocompatibility and thereby ability of

bone tissue to bond to the surface of a synthetic material. Moreover more favorable cell responses are typically associated with the chemistry, topography and properties of the scaffolds, which are tailored by ceramic nanofillers [6-10]. In this work we investigated the mineralization process of electrospun composite membranes made of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite.

Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) is a biocompatible, biodegradable and non-toxic polyester [11]. PCL exhibits more prolonged mechanical strength than other bioresorbable polymeric materials and degrades at a rate compatible with the bone regeneration [12]. There are numerous variables that affect process of PCL degradation, i.e.: chemical structure of the material, its crystallinity, molecular weight, processing conditions as well as shape and size of degradable objects. The addition of an inorganic phase such as hydroxyapatite into polymeric matrix increases the complexity of the degradation pattern of the materials [13]. Therefore the stability of electrospun PCL/HAp membrane used as scaffold for bone tissue engineering is an important field of research. A lot of studies have been focused on the degradation of PCL films after few weeks of immersion and, in many of them, accelerated degradation through different agents (enzymes, free radicals, temperature, alkalis) was observed [14-15]. In this study, the *in vitro* degradation properties of PCL/HAp composite membranes immersed in SBF during eleven weeks were investigated.

The aim of this work was to study mineralization and degradation behavior of electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) membranes modified with hydroxyapatite (HAp) in simulated physiological conditions. The complex structure of the membranes and their chemistry after different incubation periods in SBF were characterized using SEM, FTIR, and XRD methods.

## Materials and methods

### Materials

Nanofibers were prepared by electrospinning from composite poly( $\epsilon$ -caprolactone)/ hydroxyapatite solution. Polycaprolactone (PCL) was purchased from Sigma-Aldrich (Mn=70 000-90 000 g/mol). Methanol and chloroform (POCH, Poland) were used as solvents. Hydroxyapatite was produced at the University of Science and Technology (AGH, Cracow, Poland). An average size of the HAp particles was 23 nm. The specific surface area of the n-HAp was 79.9 m<sup>2</sup>/g.

The mass of 2.5 g of PCL was dissolved in 40 ml of 1:1 chloroform/methanol solvent mixture at 50°C. In order to obtain PCL/HAp composite membranes, PCL solution was mixed with 20wt% of n-HAp using sonicator. The solutions (PCL solution - as reference and PCL/HAp solution) were placed in a 10 ml plastic syringe with a stainless-steel blunt needle of 0.7 mm in diameter. The injection rate was 1.5 mL/h. A high voltage of 30 kV was applied. Baking paper sheet wrapped on a rotating metal drum, which was kept at a distance of 15 cm from the needle tip, was used as the collecting device.

### Mineralization and degradation studies

The *in vitro* bioactivity studies and degradation studies were done using simulated body fluid (SBF) solution. SBF solution, also so called as artificial plasma (TABLE 1), was prepared according to the procedure described by Kokubo [16]. PCL membranes modified with HAp (PCL/n-HAp) and reference standard not modified PCL membranes were incubated for 11 weeks in 14 ml of 1.5 x SBF (pH 7.4; 37°C), in closed polyethylene containers.

**TABLE 1. Ion concentration of SBF and human blood plasma.**

ION CONCENTRATIONS (mM)	SBF	BLOOD PLASMA
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5
Cl <sup>-</sup>	148.8	103.0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.2	27.0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0

SBF solution was replaced every 2.5 days during two weeks of immersion (for bioactivity study) and then weekly until the end of experiment (for degradation assay). The extent of biomimetic growth of the apatite layer on the biomaterials surface after 1, 3, 7 and 14 days of the sample incubation in SBF was investigated using SEM and FTIR. After each soaking period the samples were washed with distilled water and then dried at 37°C. The SBF solutions were collected for determination of pH and calcium (Ca), sodium (Na) and potassium (K) ion concentration changes by EasyLyte Analyzer. The *in vitro* degradation properties were characterized with respect to weight loss. Every week four samples were removed from the solution and gently rinsed with distilled water and then dried to constant weight ( $W_i$ ) in order to determine the weight loss. Weight loss was calculated at each time point using following equation [9]: Weight loss [%] =  $100 \times (W_0 - W_i) / W_0$ , where  $W_0$  is the initial weight of the specimen and  $W_i$  is the weight of the dried specimen at time  $t$ . All weights were measured to an accuracy of 1 mg.

### Methods

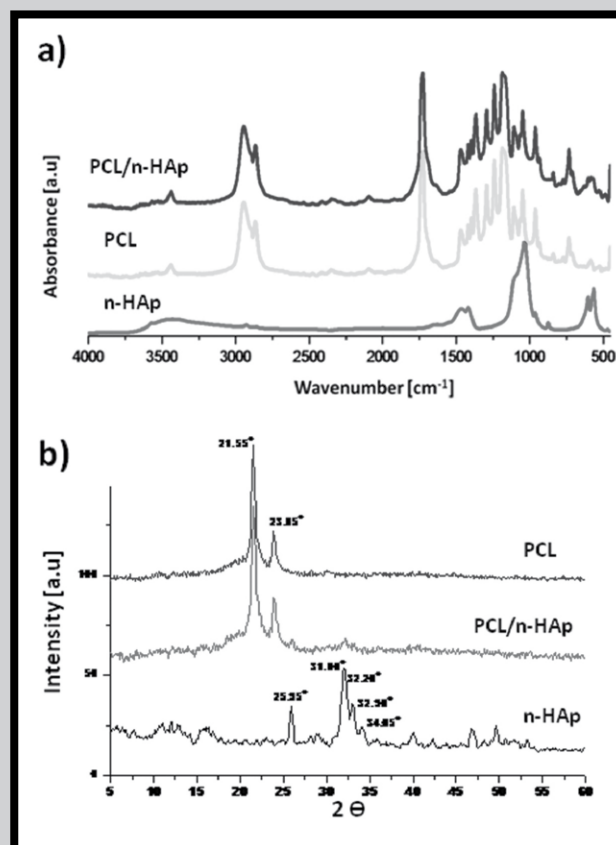
The microstructure of the electrospun membranes before and after immersion in SBF solution was evaluated by scanning electron microscopy Jeol, JSM 5500. SEM observation of PCL/n-HAp samples after immersion in SBF, were made after several washing and drying steps. All of the samples were sputtered coated with gold (Jeol JFC 1200 sputter).

Mineralization of the electrospun nanofibrous scaffolds after different immersion times in SBF were evaluated by FTIR method using spectrophotometer BioRad FTS 60V in ATR mode. The spectra were recorded at the range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  using at least 64 scans and 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution.

The wide angle X-ray diffraction measurements (WAXD) were carried out on a Seifert URD6 diffractometer, equipped with ISO-DEBYEFLEX 3003 high voltage generator and a graphite monochromator. A cooper target sealed X-ray tube operated at  $U = 40 \text{ kV}$  and  $I = 30 \text{ mA}$  was used as the radiation source ( $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$ ). The step scanning measurement mode was employed over a  $2\theta$  scattering angle ranging from  $5^\circ$  to  $60^\circ$  and from  $17.5^\circ$  to  $37.5^\circ$ , with a step-size of  $0.05^\circ$ .

### Results and discussion

The FTIR as well as WAXD analyses (FIG. 1) have confirmed successful incorporation of n-HAp particles into PCL membranes. In the case of FTIR analysis (FIG. 1a) it is evidenced by clearly visible bands corresponding to the stretching vibrations of  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $900\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ ) and deformation vibrations of  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $566; 605 \text{ cm}^{-1}$ ), which do not appear in the FTIR spectrum of pure PCL. In the case of the WAXD analysis (FIG. 1b) the occurrence of n-HAp crystallites into



**FIG. 1. (a) FTIR spectra of PCL/n-HAp, PCL and n-HAp samples; (b) WAXD diffraction patterns of electrospun PCL, PCL/n-HAp and pure HAp powder.**

electrospun composite membranes have evidenced by characteristic diffraction peaks of n-HAp crystallites which appear in the WAXD pattern of the PCL/n-HAp membrane at  $2\theta \approx 26.0^\circ$  and  $32.0^\circ$ . Besides the WAXD investigations have shown that PCL matrix of composite membranes has semicrystalline structure like to superstructure of the pure PCL (the characteristic diffraction peaks of PCL crystalline phase appear in both PCL and PCL/n-HAp diffraction patterns at  $2\theta \approx 21.5^\circ$  and  $23.8^\circ$ ).

FIG. 2 shows the surfaces of unmodified PCL and composite PCL/n-HAp membranes before and after immersion in SBF. Pure PCL sample consisted of randomly oriented, smooth, uniform and bead-free nanofibers (FIG. 2a). The incorporation of HAp nanoparticles' agglomerates were observed on the surface of PCL/n-HAp fibers (FIG. 2b). After 7 days of incubation in SBF no changes in the case of unmodified PCL were observed (FIG. 2d) whereas the character of composite PCL/n-HAp membrane changed markedly (FIG. 2c). Spherical calcium phosphate was precipitated between the composites nanofibers proving its bioactivity. Pure PCL membrane did not support the growth of an apatite layers as can be see for PCL/n-HAp sample. Degradation process started after couple weeks of incubation. After 5 weeks of immersion, PCL membranes presented small surface fissures and a lot of breakdown fibers were observed (FIG. 2e), whereas PCL/n-HAp samples did not exhibited evident changes in morphology. After 7 weeks of degradation, the fissures in PCL sample increased and on the SEM micrographs we could observe a rough surface of fibers, and some deposits on the membrane surface. In the case of PCL/n-HAp samples the degradation process started to be visible after 7 weeks of incubation (FIG. 2f).

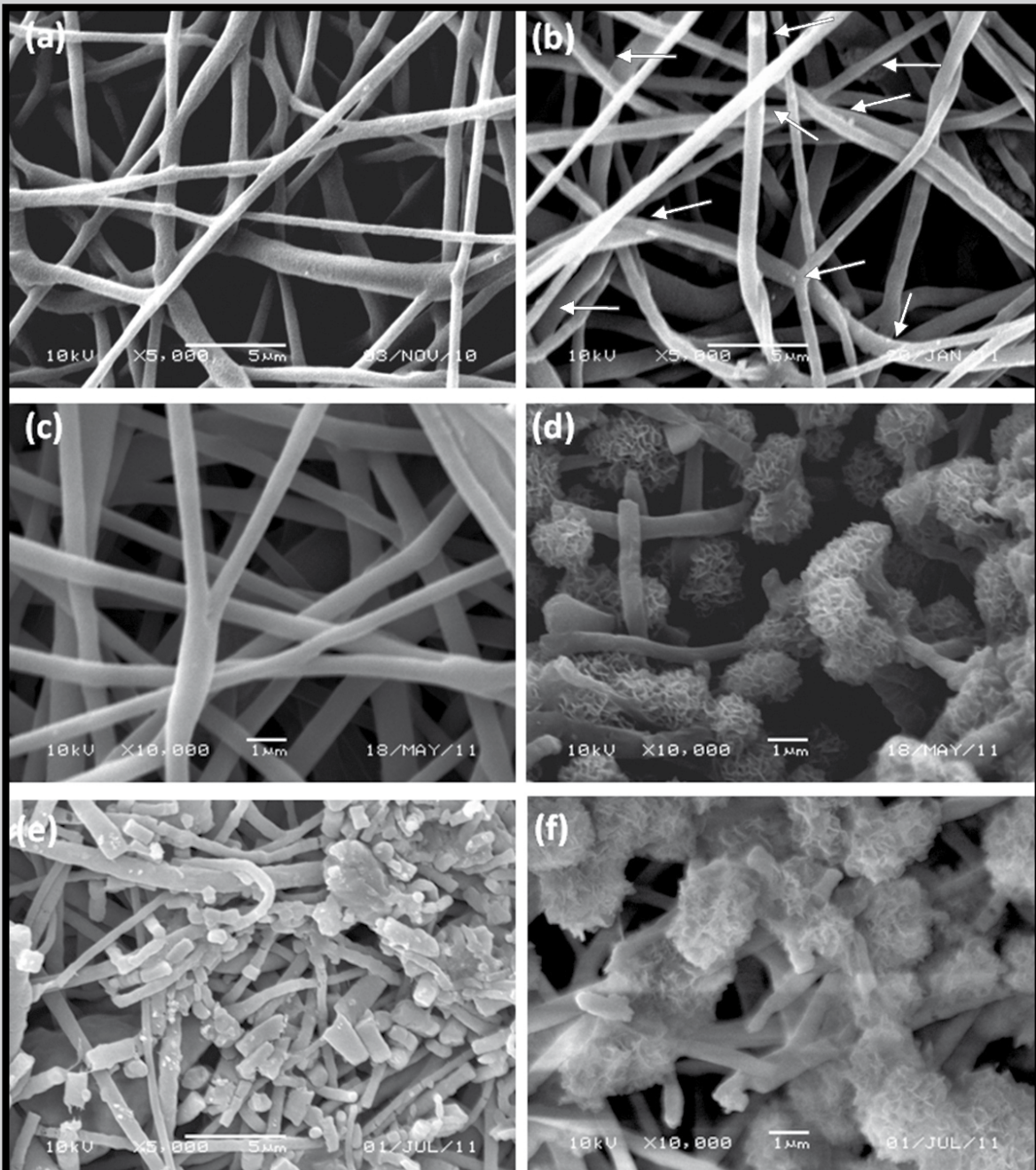


FIG. 2. SEM micrographs of electrospun PCL and PCL/n-HAp membranes before (a-b) and after (c-f) immersion in SBF: (a) PCL membrane; (b) PCL/n-HAp; (c) PCL after 7 days; (d) PCL/n-HAp after 7 days; (e) PCL after 5 weeks; (f) PCL/n-HAp after 7 weeks.

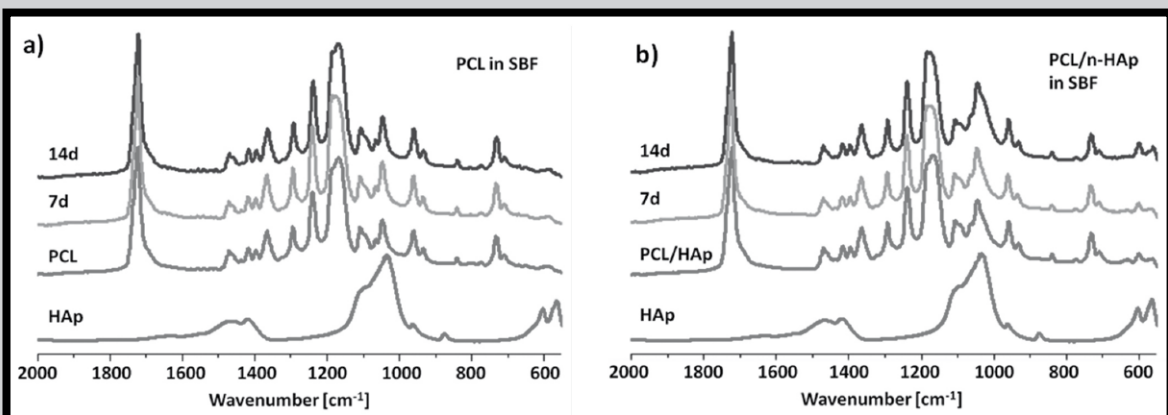


FIG. 3. FTIR spectra of (a) PCL and (b) PCL/n-HAp samples after 7 and 14 days of immersion in SBF.

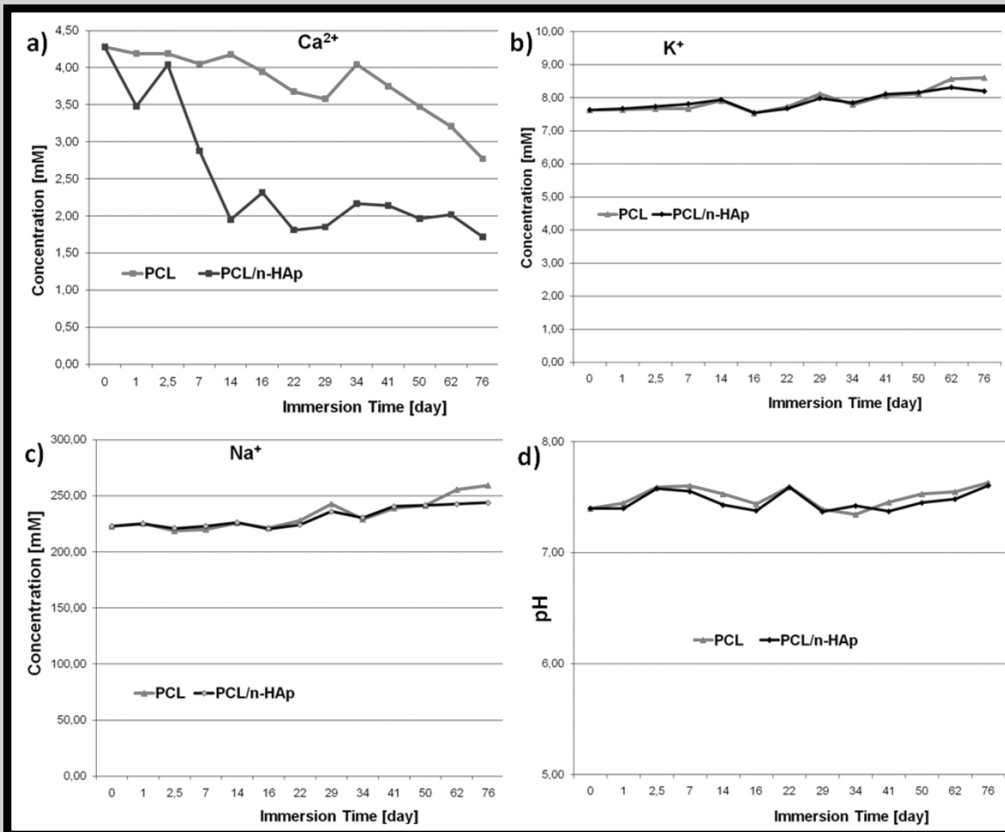


FIG. 4. Changes of Ca, K and Na concentrations in the SBF solution after soaking the PCL and PCL/n-HAP samples for 11 weeks.

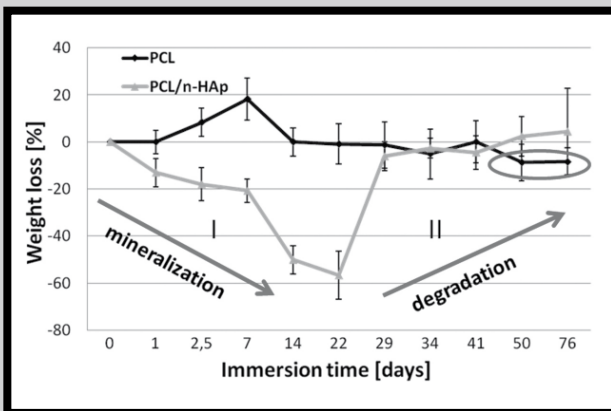


FIG. 5. Weight loss measurements of membranes immersed in simulated body fluid.

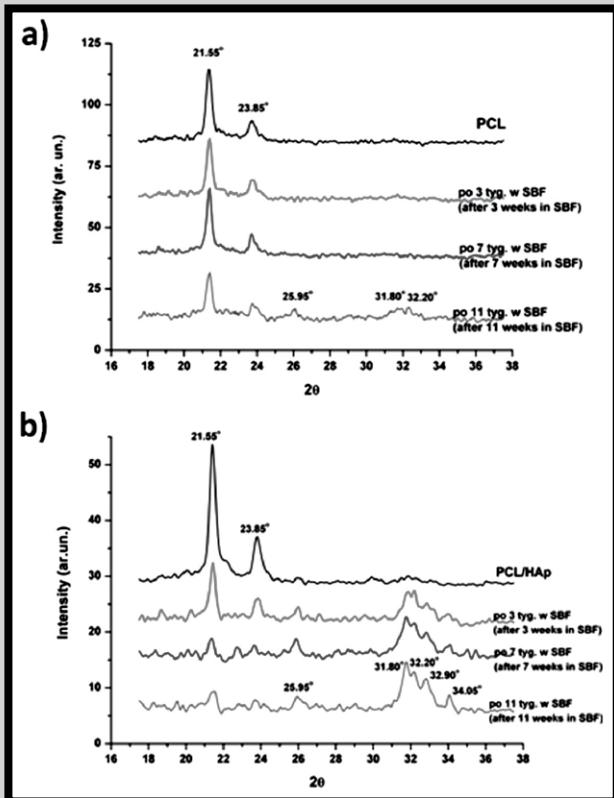
The FTIR spectra of PCL and PCL/n-HAP samples before and after mineralization in SBF are shown in FIG. 3. The occurrence of apatite layer was detected in FTIR spectra after 7 and 14 days of incubation in SBF for PCL/n-HAP samples, while for pure PCL samples no FTIR bands associated with HAP during 14 days of incubation were observed.

Hydroxyapatite degrades via dissolution-reprecipitation mechanism when immersed in biological fluids. Ionic transfers occur from the solid phase to the aqueous liquid via surface hydration of calcium, inorganic phosphate and possible impurities. Bulk degradation of PCL leads to build-up of acidic degradation products inside the matrix lowers the pH within the polymeric matrix [17]. This may result in local inflammation therefore it is necessary to control the degradation kinetics: ion release from the biomaterials and pH changes of biological fluid during incubation time.

FIG. 4 shows changes in the pH and ion concentration of Ca, K, and Na of 1.5 x SBF solution during soaking PCL and PCL/n-HAP samples for 11 weeks. Decrease of Ca content in SBF within 14 days of PCL/n-HAP sample soaking is related to the formation of Ca-P layer on the surface of HAP modified membrane, which consumed calcium ions. pH of the SBF fluids after different times of samples soaking remained unchanged during whole experiments. The result of measurement of the membranes' weight before and after immersion in SBF solution is shown in FIG. 5. The percentage of weight loss for PCL samples increased slowly at the first week of experiment and then no significant changes were observed. This weight loss was probably due to ionic release from samples. For PCL/n-HAP membranes a more complex behaviour

was noticed. At the beginning of experiment there was a decrease in the weight loss, which means that the material gain a weight. This phenomenon is attributed to the formation of a new calcium phosphate phase that precipitated on the material surface. Pure PCL membranes did not support the growth of an apatite layer, however after 11 weeks of sample' incubation in SBF some minerals (various salts) were deposited on the surface of PCL membrane resulted in the decrease of weight loss.

FIG. 6 (a) and (b) show WAXD patterns respectively of PCL and PCL/n-HAP composite nanofibers, before and after: 3, 7 and 11 weeks of soaking in 1.5 x SBF solution. The two diffraction peaks occurred at  $2\theta \approx 21.5^\circ$  and  $23.8^\circ$  in the each diffraction pattern of the samples investigated correspond well to the characteristic diffraction peaks of PCL crystalline phase. In turn the wide diffraction peaks centered roughly at  $26^\circ$  and  $32^\circ$  in diffraction patterns of PCL/n-HAP membranes treated with the SBF solution can be attributed to apatitic calcium phosphate crystallites. It should be notice that in the case of pure PCL membrane very low intense diffraction peaks of apatitic calcium phosphate crystals were observed only 11 weeks of incubation in SBF. Moreover, worth to note as well that after 7 weeks of immersion in SBF the diffraction peaks attributed to PCL crystalline phase are suppressed much more for PCL/n-HAP membranes than for PCL membranes. But this result of the WAXD measurements can be assign to two different reasons. First it is probably acceleration of PCL matrix degradation by the HAP agent. The second one it is absorption of X-ray flux by HAP layers deposited on the PCL matrix. To resolve this problem additional investigations are necessary.



**FIG. 6. WAXD diffraction patterns of electrospun PCL and PCL/n-HAp membranes before and after incubation in the SBF solution (3, 7 and 11 weeks).**

## Conclusions

Characterization of the mineralization and biodegradation processes of a tissue engineering scaffold is critical in determining its clinical utility. It is expected that the degradation rate of bone tissue engineering scaffold should be slower than the bone formation rate since the mechanical properties of the scaffold must be sufficient to support the bone regeneration process [9]. In our study the mineralization and degradation processes of PCL/n-HAp membranes produced by electrospinning technique during 11 weeks of incubation in SBF were studied. The presence of n-HAp nanoparticles within polymer matrix provides the nucleation sites for apatite growth in SBF. On the other hand, HAp addition probably could have influence on the faster degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (as resulted from WAXD and weight loss study). In order to confirm these hypothesis long term degradation experiments in biological fluids will be carried out in the near future.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. A. Ślósarczyk and Dr A. Zima (AGH-UST Cracow) for providing n-HAp powder. This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education (2010-2013; project number: N N507550938).

## References

- [1] Jang JH, Castano O, Kim HW, Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1065-1083.
- [2] Sill TJ, Von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29 (2008) 1989-2006.
- [3] Rajzer I, Biniś W, Fabia J, Biniś D, Janicki J. Electrospinning: carbon nanofibers from polyacrylonitrile modified by nanohydroxyapatite. Study of stabilization process. *Engineering of Biomaterials* 86 (2009) 22-27.
- [4] Kim HM, Himeno T, Kokubo T, Nakamura T. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in simulated body fluid. *Biomaterials* 26 (2005) 4366-4373.
- [5] Davies J.E. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28 (2007) 5058-5067.
- [6] Kanjwal MA, Sheikh FA, Nirmala R, Macossay J, Kim HY. Fabrication of poly(caprolactone) nanofibers containing hydroxyapatite nanoparticles and their mineralization in a simulated body fluid. *Fibers and Polymers* 12(1) (2011) 50-56.
- [7] Lebourg M, Suay Anton J, Gomez Ribelles JL. Hybrid structure in PCL-HAp scaffold resulting from biomimetic apatite growth. *Journal of Materials Science* 21 (2010) 33-44.
- [8] Mavis B, Demirtas TT, Gumusderelioglu M, Gunduz G, Colak U. Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. *Acta Biomaterialia* 5(8) (2009) 3098-3111.
- [9] Lei Y, Rai B, Ho KH, Teoh SH. *In vitro* degradation of novel bioactive polycaprolactone - 20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Materials Science and Engineering C* 27 (2007) 293-298.
- [10] Nirmala R, Nam KT, Park DK, Woo-il B, Navamathavan R, Kim HY. Structural, thermal, mechanical and bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers via electrospinning. *Surface & Coatings Technology* 205 (2010) 174-181.
- [11] Rajzer I. Evaluation of PCL and PCL/HAp scaffolds processed by electrospinning and porogen leaching techniques. *Engineering of Biomaterials* 103 (2011) 4-7.
- [12] Fabbri P, Bondioli F, Messori M, Bartoli C, Dinucci D, Chiellini F. Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 343-351.
- [13] Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Barrias CC, Barbosa MA. *In vitro* degradation behaviour of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. *Acta Biomaterialia* 1 (2005) 411-419.
- [14] Pena J, Corrales T, Izquierdo-Barba I, Doadrio AL, Regi MV. Long term degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films in biologically related fluids. *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006) 1424-1432.
- [15] Guarino V, Lewandowska M, Bil M, Polak B, Ambrosio L. Morphology and degradation properties of PCL/HYAFF11 composite scaffolds with multi-scale degradation rate. *Composite Science and Technology* 70 (2010) 1826-1837.
- [16] Kokubo T et al. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* 27(15) (2006) 2907-2915.
- [17] Barrere F, Mahmood TA, de Groot K, van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering R* 59 (2008) 38-71.

# EXPERIMENT-BASED FE SIMULATION OF ONCOLOGY KNEE ENDOPROSTHESIS

LUKAS ZACH\*, SVATAVA KONVICKOVA, PAVEL RUZICKA

CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
LABORATORY OF BIOMECHANICS, PRAGUE, CZECH REPUBLIC  
\* E-MAIL: LUKAS.ZACH@FS.CVUT.CZ

## Abstract

*This paper presents two FE simulations of an oncology knee-joint endoprosthesis. Firstly dynamic experiment-based analysis traditionally made on special knee simulator has been calculated. Another FE simulation of an oncology knee-joint endoprosthesis was made on a complex model based on previously developed geometric model of a lower limb. The presented paper aims to prove the potential of finite element method in biomechanics, especially in development of joint endoprosthesis.*

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 10-12]

## Introduction

Finite element method (FEM) has become a useful tool in classical mechanics while study of several mechanisms like fractures and defect origins and propagation. It can also become a valuable and effective tool for biomechanical devices development. Quite fast and easily modifiable models allow studying wide range of problems (static, dynamic) while using different boundary conditions (type of loading).

There are two groups of FEA of lower extremity models. The first ones are used to simulate a behavior of a healthy knee joint in-vivo [1-4] and the second group which deals with a knee joint after a total knee endoprosthesis (TKE) implantation [5,6].

Fractures and malfunctions of joint and bone implants has different causes. Generally, they can be sorted by two causes – biological and mechanical. Among the biological sources of implant damages, especially implant loosening and infection are well described in literature. In contrary, a stem fracture or a UHMWPE parts defect are typical causes of mechanical defects (FIG. 1).

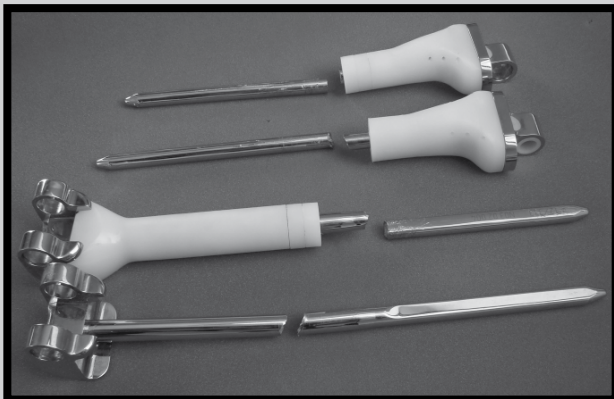


FIG. 1. Mechanical defects of oncology knee endoprosthesis.

To understand better the mechanical reasons for oncology knee implants destruction, the presented work has been made. For simulation of a loading by knee simulator, all boundary conditions are in accordance with ISO 14243-3: 2004 [6-8], where a manner of mechanical testing is defined. For real simulation of a behavior of a knee implant in human body, our own data and findings cited in literature were applied.

## Materials and methods

For presented nonlinear contact static analyses, solved in Abaqus CAE, an oncology knee endoprosthesis made by Prospan [9] has been chosen. The implant is made from titanium alloy Ti6Al4V. Tibial component is partly manufactured from UHMWPE - ultrahigh molecular weight polyethylene. The following simulations were made for two cases: UHMWPE bushings in case of knee simulator model and PEEK-OPTIMA® in case of whole limb model.

Following TABLE 1 summarize isotropic and homogenous material properties of all parts. Ideally plastic material model of UHMWPE is described in detail in FIG. 2.

TABLE 1. Material properties.

	Young modulus [MPa]	Max. tensile stress [MPa]	Poisson's ratio [-]
TiAl6V4	113800	900	0,34
PEEK	3650	90	0,44
UHMWPE	820	100	0,44

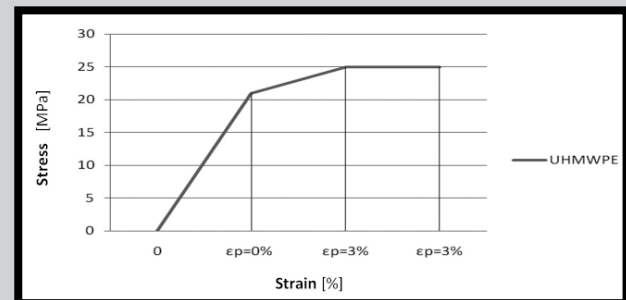


FIG. 2. Ideally plastic material model of UHMWPE.

As already mentioned, all boundary conditions in case of knee simulator (simplified knee model) are in accordance with ISO 14243-3: 2004 [8].

For real simulation of loading in stand (complex model featuring bone, muscle and ligament structures), boundary conditions defined by Vilimek [10] were applied. Totally 32 muscles, all three long bones together with patella defined the geometric model of the lower limb [11].

## Results

Type of loading given by ISO 14243-1 [6-8] caused corresponding response in all parts of the knee oncology endoprosthesis. The most critical areas on the implant follow.

UHMWPE bushings which make parts of the hinge between the femoral component and tibial plateau are maybe the most critical plastic part of the endoprosthesis. Though the peak values between 16-28 MPa (FIG. 3) are reached for the bushings, it is only a case of limited number of elements so these results can be supposed to be "mesh errors". Nevertheless, these parts demand special attention and further study to eliminate an occurrence of PE wear.

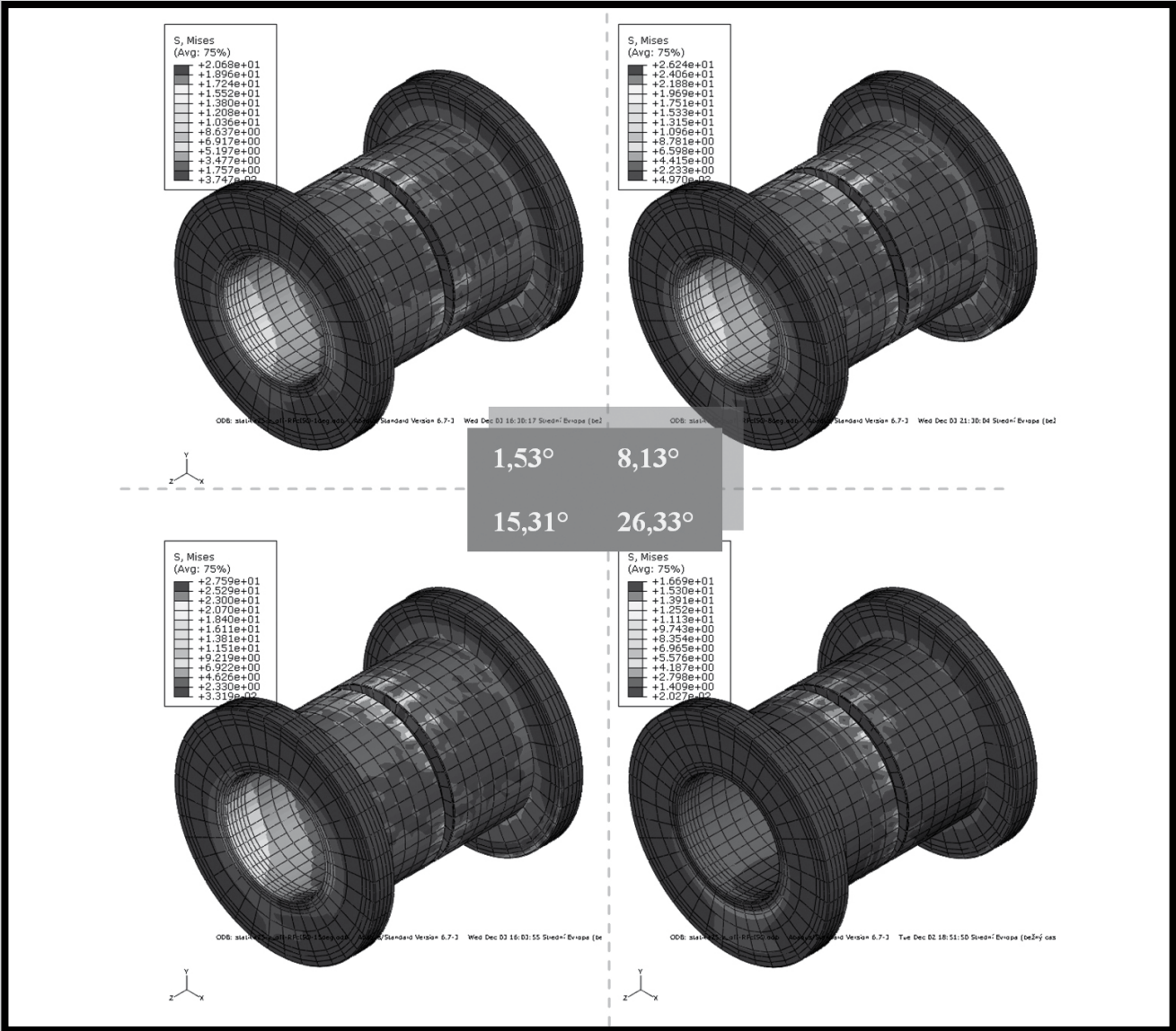


FIG. 3. Stress distribution (von Mises theory) on surface of UHMWPE bushings [MPa].

As a part of the development the UHMWPE bushings were replaced by PEEK bushings which were used also in real simulation of the whole lower limb with implanted hinge-knee. The reached peak value of stresses according to von Mises theory were approx. 28 MPa (FIG. 4).

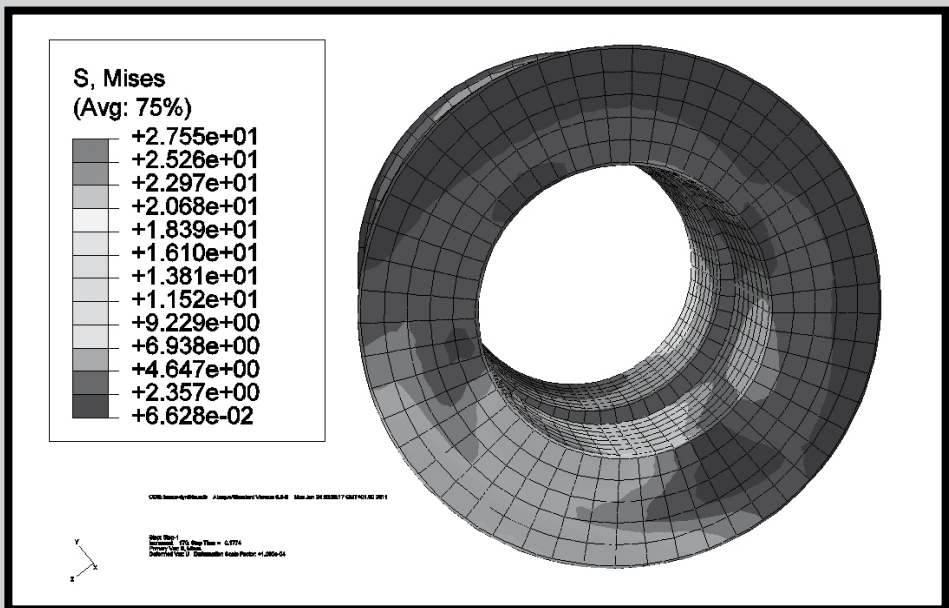


FIG. 4. Stress distribution (von Mises theory) on surface of UHMWPE bushings in full extension [MPa].

## Conclusions

One of the most common reasons of joint endoprosthesis malfunction leading to a reoperation is a mechanical defect or an implant loosening (or their combination). Appropriate design of the implant can dramatically eliminate this risk. As a useful tool for endoprosthesis development, a finite element method can be used, providing that the anatomical relation or mechanical test standards are kept. Based on our experiences with experimental and numerical simulations two presented FE models were analyzed.

A goal of this paper was, using an oncology knee implant, to make up a computer simulation of loading of TKE during the dynamic mechanical test defined by ISO 14243 [8] and loading of TKE in stand while profiting of formerly presented complex model of lower limb [11]. The results focused on the most critical areas of the endoprosthesis, i.e. UHMWPE bushings. The dynamic analyses and the static analysis of the complex model with the PEEK bushings pointed out the peak values of HMM stress of 28 MPa (FIG. 3-4). The analysis of PEEK-based model showed suitability of this type of the oncology knee. The results will be useful for our upcoming dynamic models and for further development of the oncology knee endoprosthesis. Since the oncology implants are produced as an individual replacement, finite element method represents a time and money saving method of the implant production.

## Acknowledgements

*This research was supported by Ministry of Education project Transdisciplinary Research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012 and by grant of Technology Agency of the Czech Republic TACR01010185.*

## References

- [1] J.M.T. Penrose (2002) Development of an accurate three dimensional finite element knee model. *Comp. Meth. in Biomech. and Biomed. Eng.* 5, pp. 291-300.
- [2] J.A. Heegaard (2001) A computer model to simulate patellar bio-mechanics following total knee replacement: the effects of femoral component alignment. *Clinical Biomech.* 16, pp. 415-423.
- [3] P. Beillas, et al (2004) A new method to investigate in vivo knee behavior using a finite element model of the lower limb. *J Biomech.* 37, pp. 1019-1030.
- [4] A.C. Godest (2002) Simulation of a knee joint replacement during a gait cycle using explicit finite element analysis. *J. Biomech.* 35, pp. 267-275.
- [5] J.P. Halloran (2004) Explicit finite element modeling of total knee replacement mechanics. *J. Biomech.* 38, pp. 323-331.
- [6] ISO 14243-1. Implants for surgery - Wear of total knee-joint prostheses - Part 1: Loading and displacement parameters for wear-testing machines with load control and corresponding environmental conditions for test. 2002.
- [7] ISO 14243-2. Implants for surgery - Wear of total knee-joint prostheses - Part 2: Methods of measurement. 2000.
- [8] ISO 14243-3. Implants for surgery - Wear of total knee-joint prostheses - Part 3: Loading and displacement parameters for wear-testing machines with displacement control and corresponding environmental conditions for test. 2004.
- [9] Prospon, s.r.o., Jiriho Voskovce 3206, Kladno, 272 01, Czech Republic. On-line at: <http://www.prospon.cz/>.
- [10] M. Vilimek (2005), The challenges of musculotendon forces estimation in multiple muscle systems, [PhD Thesis]. Prague: Czech Technical University - Fac. of Mechanical Engineering, 108 p.
- [11] L. Zach, S. Konvickova, P. Ruzicka (2008), Finite Element Analysis of Lower Limb. *Engineering of Biomaterials*, vol. 11, no. 77-80, p. 15-18, ISSN 1429-7248.



# BIOACTIVE HYDROXYAPATITE CERAMICS AS SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING - A PRELIMINARY STUDY

DALIBOR SOUKUP<sup>1,2</sup>, DANIELA HORAKOVA<sup>2</sup>, HANA SUMBEROVA<sup>2</sup>, JANA ANDERTOVA<sup>2</sup>, MARKETA BACAKOVA<sup>1</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CELL POPULATIONS, INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF GLASS AND CERAMICS, INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY IN PRAGUE, TECHNICKA 5, 166 28 PRAGUE 6-DEJVICE, CZECH REPUBLIC

[*Engineering of Biomaterials*, 106-108, (2011), 13-16]

## Introduction

Unlike currently used allografts and autografts in clinical practice, which are associated with problems such as limited supply, potential immune rejection and pathogen transfer, synthetic materials show promising results in tissue engineering. Tissue engineering has been defined as an interdisciplinary field which utilizes methods of material engineering and life sciences to develop and create a substitute with similar function and morphology to achieve tissue or organ repair [1]. To create tissue replacements, tissue engineering utilizes cells on artificial material carriers, i.e. scaffolds. In advanced tissue engineering, the scaffold materials should mimic the natural extracellular matrix, i.e. they should provide a place for growth and proliferation, differentiation and metabolism, and should control these processes, e.g. by carrying signal molecules.

The architecture of a good scaffold should be similar to the natural bone, resulting in good biocompatibility and osteoconductivity. Bone porosity is about 50-90%, with the average pore size up to 1 mm. This kind of porosity and pore size are essential for scaffolds. If the pores are too large, the fibrous tissue will cover the inside of the pores. If they are too small (i.e., less than 70 µm), the cells cannot permeate the inside of the scaffold, leading to limited bone formation to the surface layer (for a review, see [2,3]). On the other hand, micropores are required as the superbonding space for cells, and they are also a better substrate or microenvironment for osteoclast formation or maintenance of osteoclast activity, causing the resorption of artificial materials [4]. In addition, micropores promote the formation of capillaries and thus the creation of the blood supply in the scaffolds (for a review, see [5]). Macropores of an appropriate size (usually several hundreds µm in diameter) influence the tissue function, providing a comfortable space for cells to penetrate inside the scaffolds. Moreover, the interconnectivity of the pores plays an important role in bioactivity, allowing deeper tissue ingrowth. Interconnected pores are of a suitable size for supporting cell migration and proliferation, as well as exchange of nutrients and excretion of waste through the whole material pore volume. In addition, the scaffold materials should have appropriate mechanical strength, offering temporary support for the formation of a new tissue.

In this study, we investigated five types of hydroxyapatite (HAp) scaffolds differing from one another in their physical properties, such as the open porosity percentage, closed porosity, bulk density, and also the size, distribution and shape of the pores. The biological properties were examined in vitro using osteoblast-like cells of the line MG 63.

## Material and methods

### Preparation and characterization of material samples

Pure HAp, i.e.,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , was synthesized by a simple wet chemical method using analytical grade reagents at the Institute of Chemical Technology in Prague, Department of Glass and Ceramics. Samples cylindrical in shape, 1.5 cm in diameter and 0.7 cm in length were prepared using various pore foaming methods and various sintering temperatures, leading to changes in various crystalline parameters (TABLE 1).

Porosity of the samples was measured by a method based on Archimedes Law. The pore size was obtained from SEM (Scanning Electron Microscope) micrographs.

TABLE 1. Characteristics of the hydroxyapatite samples.

Name of samples	Sintering temperature [°C]	Porosity [%]	Pore forming agents	Pore size and distribution	Compression strength [kPa]
HAp1	900	78	Hydrogen peroxide	20-200 µm (66%) 50-100 µm (62%)	40
HAp2	900	65	Wax spheres	50-100 µm (84%)	100
HAp3	1100	58	Psyllium	100-500 µm (81%) 200-500 µm (48%) 100-200 µm (34%) 50-100 µm (1%)	In progress
HAp4	900	67	Psyllium	50-100 µm (84%)	In progress
HAp5	1100	30	Wax spheres	50-200 µm (78%) 50-100 µm (71%)	64

### Culture of bone cells on material samples

For the cell culture experiments, the samples were sterilized in a hot air sterilizer at 120°C for 2 hours.

In the first experiment, the samples were inserted in polystyrene 12-well plates (well diameter 2.1 mm, TPP Company, Switzerland) and were seeded with osteoblast-like MG 63 cell line (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK; passage 162). Each well contained 60 000 cells (i.e., approx. 17 300 cells/cm<sup>2</sup>) and 3 ml of Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, U.S.A., Cat. No. 10270-106) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco, Cat. No. 10270-106) and gentamicin (40 µg/ml, LEK, Slovenia). Polystyrene wells (PS) served as a control material. The cells were incubated at 37°C in an air atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub>.

On days 1, 3 and 6 after seeding, the cells were fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide. The cell number was evaluated by cell counting on microphotographs taken under an Olympus IX 51 microscope equipped with a DP 70 digital camera. For each experimental group and time interval, 6 microphotographs were evaluated.

For an evaluation of the cell morphology, the cells were stained with propidium iodide and Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen). Images were taken under an Olympus IX 51 microscope and under a Leica SP2 laser confocal microscope (Germany).

The cell viability was determined by the epifluorescence staining method using the LIVE/DEAD kit (Invitrogen, Molecular Probes, USA). The principle of this test involves staining the living cells in green with calcein AM, an indicator of esterase activity. At the same time, the dead cells are stained in red with ethidium homodimer-1, due to the permeability of the cytoplasmic membrane of these cells. The cell metabolic activity (namely the activity of the mitochondrial enzymes) was evaluated by the XTT assay kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and by the WST-8 assay kit (Fluka).

At all observed cell culture intervals, the pH of the medium in wells with the tested samples was also measured (inoLab level 1 pH meter).

In the second experiment, samples of the same types and dimensions as in experiment 1 were used, and the same experimental procedures as those described above were performed. Only the volume of the culture medium was increased to 10 ml/well. For this purpose, the samples were inserted into polystyrene 6-well plates (well diameter 3.4 cm, TPP Company, Switzerland). In addition, the number of seeded cells was increased to 500 000 cells/well (approx. 55 100 cells/cm<sup>2</sup>).

### Statistical analysis

The quantitative data was presented as mean  $\pm$  S.E.M. (Standard Error of the Mean). The statistical analyses were performed using SigmaStat (Jandel Corporation, U.S.A.). The multiple comparison procedures were carried out by the ANOVA, Student-Newman-Keuls Method. The value  $p \leq 0.05$  was considered significant.

## Results and discussion

In the first experiment, i.e. an experiment performed in relatively small volumes of cell culture medium and with low numbers of seeded cells, the cells adhered to all tested samples in densities that were usually close to the seeding density of the cells. Only on HAp5 was the number of cells very high, remarkably (more than twice) exceeding the cell seeding density. The cell numbers on samples HAp1 and HAp2 were similar to those found on the control PS wells, while the cell numbers on HAp3 and on particularly HAp4 were significantly lower (TABLE 2).

From day 1 to day 3 the numbers of cells decreased significantly, and on day 3 the numbers were significantly lower than on day 1 (TABLE 3). The average cell density on all samples was at least six times lower than on PS, which could be explained by rapid release of Ca<sup>2+</sup> ions from HAp. High levels of Ca<sup>2+</sup> ions cause cytotoxicity [6,7]. The decrease in cell number was relatively less apparent on HAp 5. On day 3, this sample still contained the highest number of cells among the HAp samples, and this density still exceeded the number of seeded cells. A possible explanation is the lowest porosity of HAp5, which led to the smallest specific surface of the sample, and thus to the slowest release of Ca<sup>2+</sup> ions. Another negative factor was an increase in the pH of the medium in the presence of HAp samples (TABLE 4), which was also manifested by the violet colour of phenol red in the medium. The physiological pH of the culture medium is 7.35.

On day 6, the cell number on all HAp samples was very low (FIG. 1), and the cells were mostly rounded, non-spread. As revealed by staining with the LIVE/DEAD kit, all cells were practically dead, supposedly due to cytotoxic levels of Ca<sup>2+</sup> ions. These results were confirmed by the XTT and WST-8 assays, which revealed very low metabolic activity of the cells, or no metabolic activity at all.

**TABLE 2. Population density of MG 63 cells on day 1 after seeding on hydroxyapatite samples (HAp) and polystyrene dishes (PS) in the first experiment. Mean  $\pm$  S.E.M.**

Material / Parameter	Number of cells/cm <sup>2</sup>	Statistical significance
HAp1	15 740 $\pm$ 817	vs. HAp5
HAp2	14 103 $\pm$ 881	vs. HAp5
HAp3	12 211 $\pm$ 494	vs. PS, HAp5
HAp4	8 990 $\pm$ 609	vs. PS, HAp1, HAp5
HAp5	37 731 $\pm$ 2993	
PS	19 117 $\pm$ 1485	vs. HAp5

**TABLE 3. Population density of MG 63 cells on day 3 after seeding on hydroxyapatite samples (HAp) and polystyrene dishes (PS) in the first experiment. Mean  $\pm$  S.E.M.**

Material / Parameter	Number of cells/cm <sup>2</sup>	Statistical significance
HAp1	3 642 $\pm$ 318	vs. PS, HAp5
HAp2	2 809 $\pm$ 414	vs. PS, HAp5
HAp3	4 568 $\pm$ 888	vs. PS, HAp5
HAp4	3 122 $\pm$ 250	vs. PS, HAp5
HAp5	23 372 $\pm$ 1 609	vs. PS
PS	129 534 $\pm$ 14 673	

**TABLE 4. pH of the cell culture medium in wells with the HAp samples and in the control polystyrene wells (PS) in the first experiment.**

Material / pH	Day 1	Day 3	Day 6
HAp1	7.68	7.65	7.90
HAp2	8.22	8.20	8.24
HAp3	8.24	7.90	8.17
HAp4	7.88	8.12	8.10
HAp5	7.91	7.85	8.20
PS	7.67	7.61	7.50

The second experiment was carried out in larger volumes of cell culture medium and with a higher number of seeded cells. Similarly as in experiment 1, the cells adhered well to all tested HAp samples on day 1 after seeding. However, in contrast to the first experiment, the cell population increased in numbers from day 1 to day 4. On day 4, the cell population was confluent, with almost 100% viability and with similar density as on PS. From day 4 to day 8, the cell number did not change significantly, which could be explained by entry into the stationary phase of cell growth, which is defined as the phase in which the number of cells does not change, or even decreases. The cell populations still remained confluent on samples HAp4 and HAp5, but samples HAp2, HAp3 and especially HAp1 showed lower numbers of cells (FIG. 2). Nevertheless, the cells on HAp1 showed a well-spread polygonal or spindle-shaped morphology. In addition, the cell viability on all HAp samples was very high, approaching 100%, as determined using the LIVE/DEAD kit. The pH of the culture medium in the wells with HAp samples mostly decreased below the physiological value (7.35), which suggests intensive metabolic activity of the cells. Only in the wells with samples HAp2 and HAp4 did the pH still remain elevated above the physiological value (TABLE 5).

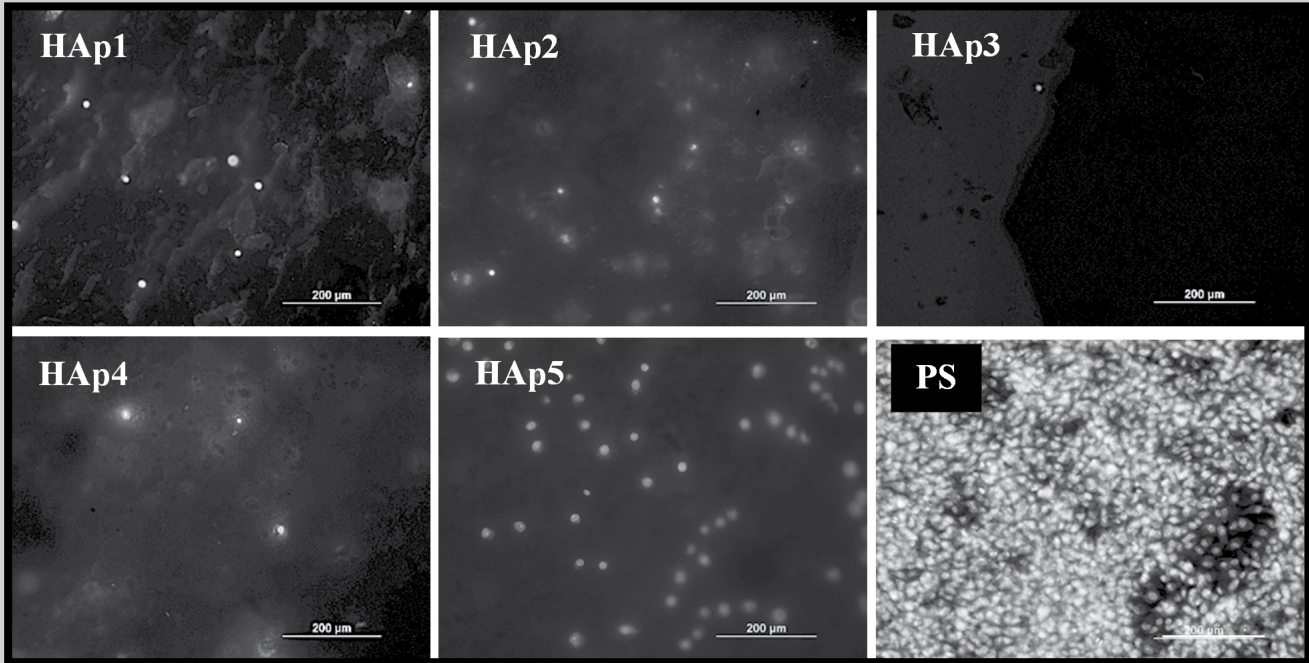


FIG. 1. Morphology of human osteoblast-like MG 63 on day 6 after seeding on hydroxyapatite samples (HAp1-HAp5) and the control polystyrene culture dish (PS) in the first experiment. Cells stained with propidium iodide. Olympus IX 51 microscope, obj. 10, DP 70 digital camera, bar = 200 µm.

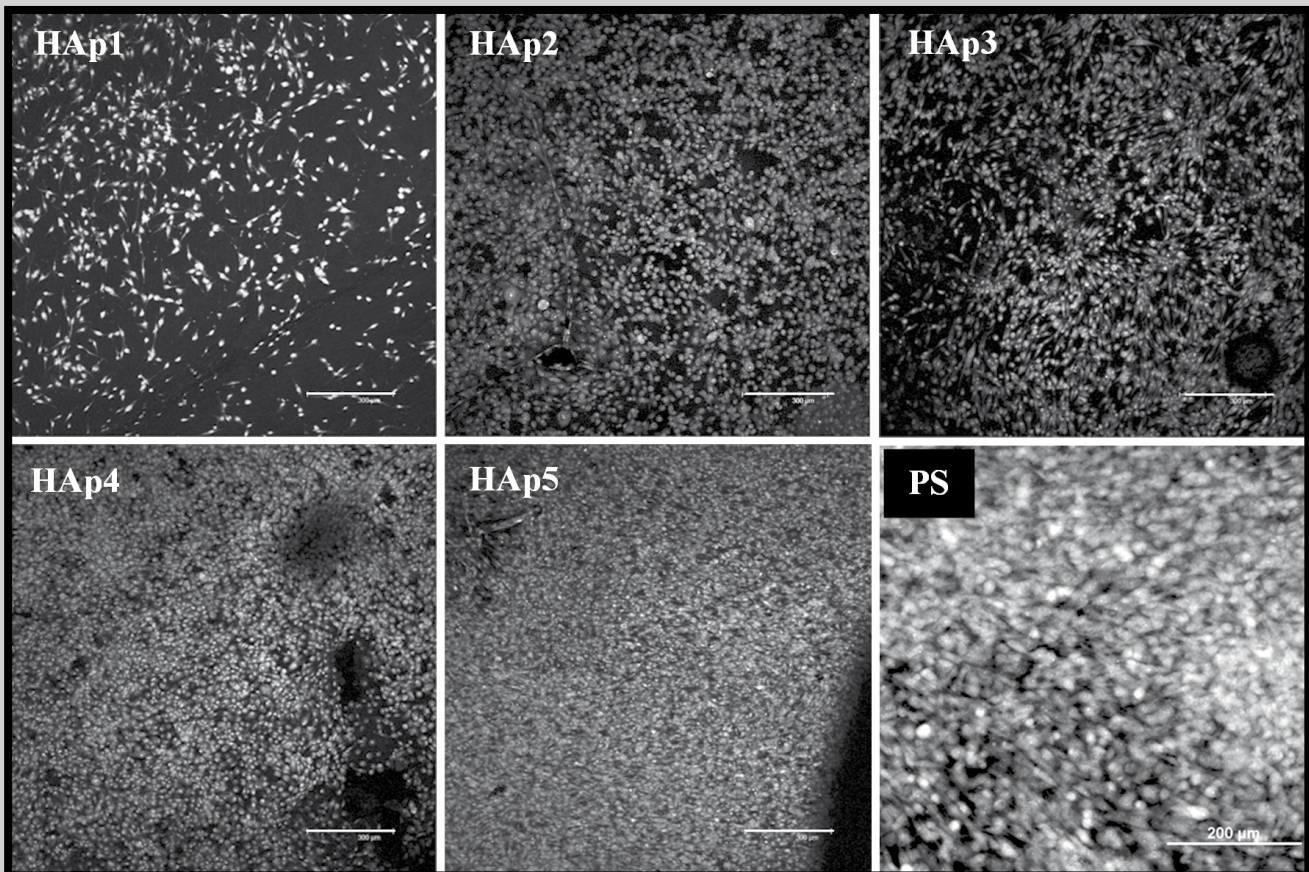


FIG. 2. Morphology of human osteoblast-like MG 63 on day 8 after seeding on hydroxyapatite samples (HAp1-HAp5) and on the control polystyrene culture dish (PS) in the second experiment. Cells stained with Alexa Fluor 488 and propidium iodide. Leica SP2 Confocal Inverse Laser Scanning Microscope, obj. 10x, bar = 300 µm (HAp1-HAp5); Olympus IX 51 microscope, obj. 10, DP 70 digital camera, bar = 200 µm (PS).

**TABLE 5. pH of the cell culture medium in wells with HAp samples and in the control polystyrene wells (PS) in the second experiment.**

Material / pH	Day 8
HAp1	7.25
HAp2	7.50
HAp3	7.26
HAp4	7.65
HAp5	7.18
PS	7.12

It can be concluded that in experiment 1 and in experiment 2, the preliminary biocompatibility tests proved favourably that hydroxyapatite enables and promotes cell adhesion, which could be explained by high availability of  $\text{Ca}^{2+}$  ions that are indispensable for integrin-mediated cell adhesion. Another explanation might be improved adsorption of cell adhesion-mediating proteins to HAp compared to other materials. For example, HAp adsorbed more vitronectin and fibronectin from the serum of the culture medium than other materials used for bone implantation, namely commercially pure titanium, and 316L stainless steel [8]. When the adsorption of fibronectin was compared on HAp and on gold, this protein was adsorbed on HAp in a more active geometrical conformation, allowing better accessibility of oligopeptidic ligands (e.g. RGD) in fibronectin molecules for cell adhesion receptors [9]. However, in experiment 1, the tested HAp samples showed cytotoxic activity on days 3 and 6 after seeding, which could be due to excessive and rapid release of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. We came to this conclusion with experiment 2, where cytotoxicity of the HAp samples was not observed in large volumes of cell culture medium and after higher numbers of cells had been seeded, i.e. in conditions in which  $\text{Ca}^{2+}$  could be more diluted and more rapidly metabolized by the cells. It should also be pointed out that all the tests in our study were conducted with a static method. This does not entirely simulate the real bone tissue surrounding, which is more dynamic from the point of view of blood circulation and mechanical stimulation. Nevertheless, it is suggested that the tested HAp materials be used in orthopaedics and in dentistry only for filling small cavities.

## Acknowledgements

*This study was a part of the Research Programme MSM 6046137302 "Preparation and research of functional materials and materials technologies using micro and nanoscopic methods" and a part of the project No. 2A-1TP1/063, "New glass and ceramic materials and advanced concepts of their preparation and manufacturing", realized under financial support of the Ministry of Industry and Trade. The biological part of this study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 106/09/1000). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.*

## References

- [1] Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920-926, 1993.
- [2] Pamula E, Bačáková L, Filová E, Buczynska J, Dobrzynski P, Nosková L, Grausová L: The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 19: 425-435, 2008.
- [3] Pamula E, Filová E, Bačáková L, Lisá V, Adamczyk D: Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J Biomed Mater Res A*, 89A: 432-443, 2009.
- [4] Yamasaki N, Hirao M, Nanno K, Sugiyasu K, Tamai N, Hashimoto N, Yoshikawa H, Myoui A: A comparative assessment of synthetic ceramic bone substitutes with different composition and microstructure in rabbit femoral condyle model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91: 788-798, 2009.
- [5] Karageorgiou V, Kaplan D: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26: 5474-5491, 2005.
- [6] Liu CP, Jan CR: Effect of carvedilol on  $\text{Ca}^{2+}$  movement and cytotoxicity in human MG63 osteosarcoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95(2): 59-65, 2004.
- [7] Motskin M, Wright DM, Muller K, Kyle N, Gard TG, Porter AE, Skepper JN: Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* 30: 3307-3317, 2009.
- [8] Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL: Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res*. 57: 258-267, 2001
- [9] Dolatshahi-Pirouz A, Jensen TH, Kolind K, Bünger C, Kassem M, Foss M, Besenbacher F: Cell shape and spreading of stromal (mesenchymal) stem cells cultured on fibronectin coated gold and hydroxyapatite surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 84: 18-25, 2011.

# PRELIMINARY INVESTIGATION OF ALGINATE FIBERS MODIFIED WITH MAGNETITE

A. FRACZEK-SZCZYPTA<sup>1\*</sup>, A. PIECEK<sup>1</sup>, M. BOGUN<sup>2</sup>, S. BLAZEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup>TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
FACULTY OF MATERIAL TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN,  
DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBERS,  
UL. ZEROMSKIEGO 116, 90-926 LODZ, POLAND

\* E-MAIL: AFRACZEK@AGH.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 106-108, (2011), 17-20]

## Abstract

*In this work alginate nanocomposite fibers modified with magnetite were investigated as prospective material for bone tissue regeneration after tumor resection. In the first stage of the research the morphology of composite fibers and their chemical composition were evaluated. Determination of the mechanical properties of the nanocomposite materials indicated that magnetite does not improve the strength of the nanocomposites. A slight increase of Young's modulus was observed only for composite fibers with a lower concentration of nanoadditive. Weekly and monthly incubation of fibers in distilled water indicates the release of magnetite from the material. This result is optimistic in terms of the applicability of these materials, not only for tissue regeneration, but also to destroy cancer cells using the external magnetic field.*

## Introduction

A growing demand for new composite materials for medical applications has been observed in recent years. The progress of civilization and the related lengthening of life mean that implant materials have to be characterized by specific properties that will not only effectively treat, but also create the ability to monitor changes within the treated tissue [1-3]. For several years investigations have been conducted on new types of composites modified with nanoparticles, called nanocomposites, which could be used in the regeneration and reconstruction of natural tissue, for instance bone tissue [4-8]. The most commonly used materials as a matrix in nanocomposites for the treatment of tissue defects are polymers, including natural polymers (biopolymers), such as alginate, chitosan, etc [8,9]. Alginate is often used in medicine due to its high biocompatibility and ability to degrade under the influence of biological factors. This can occur in various forms but most often in the form of fiber [8]. Polymers recently used as scaffold for bone regeneration are modified nanoparticles, such as nanohydroxyapatite, nanosilica, nanobioglass and carbon nanotubes (CNTs) [4-8]. In this work nanomagnetite was used as nanoadditives in polymer nanocomposites. Magnetite is used in medicine mainly as a contrast in the diagnosis and treatment of cancer, as well as a drug carrier [10-13]. Hyperthermia uses the sensitivity of tumor cells to elevated temperature. It involves the introduction of magnetic nanoparticles into the revised tumor tissue, followed by an alternating magnetic field, resulting in an increase in temperature and thus heating the particles, which decreases the metabolic activity of cancer cells [13,14].

The combination of alginate and magnetite nanoparticles in the form of fibrous nanocomposites offers a great opportunity for the application of these materials in implantology as a filling for bone defects after cancer. This type of composite on the one hand would result in the regeneration of bone tissue, and on the other hand, by the release of magnetite to the implantation site under the influence of the magnetic field, would result in the destruction of tumor cells.

The main aim of this work is a preliminary investigation of nanocomposite fibers modified with different concentrations of magnetite. During this study the release of magnetite with polymer fibers using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) were investigated. Moreover, the microstructure and mechanical properties of nanocomposite fibers were evaluated.

## Materials and methods

Alginate fibers were spun in tow from a sodium alginate solution containing magnetite. The magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) used in this study was provided by Sigma-Aldrich Co. It has a diameter of <50 nm and a specific surface area of more than 60  $\text{m}^2/\text{g}$ .

A sodium alginate (NaAlg) biopolymer matrix consisted of 55-65% manurane acid (M) mers (produced by FMC BioPolymer, Norway) and was used to manufacture the nanocomposite fibers. The fibers were dry-jet wet spun on a laboratory spinning machine using a 500-hole spinneret of 0.08 mm diameter. The nanoconstituent (magnetite) was immersed in NaAlg solution and sonicated at room temperature using POLSONIC, 310 W power, 50 kHz. The solidification of fibers was performed in a bath containing a 3% aqueous solution of  $\text{CaCl}_2$  and 0.03% NaCl at a temperature of less than 40°C. The fibers were stretched in two stages: in a plasticization bath at 40°C, and under superheated steam at 135°C, respectively. After the solvent had been rinsed out, the fibers were dried between 40-60°C under isometric conditions at 140°C. After the solidification the bath residues were washed off, and the fibers were dried at 40-60°C under isometric conditions. During the solidification of sodium alginate (NaAlg) fibers in  $\text{CaCl}_2$  solution,  $\text{Na}^+$  cation is exchanged with  $\text{Ca}^{2+}$ . This process was applied to the formation of calcium alginate ( $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ ) fibers.

Three types of samples based on NaAlg solution containing magnetite were manufactured. Their description and denotation applied further in this work is defined below:

A - control calcium alginate fibers ( $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ );

AF1 - magnetite/ $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  composite fibers (calcium alginate fibers containing 7% by wt. of magnetite);

AF2 - magnetite/ $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  composite fibers (calcium alginate fibers containing 20% by wt. of magnetite).

Fibers were incubated in water for 1 month in order to evaluate the release of magnetite from nanocomposites to water. Morphology and microstructure with elemental analysis for pristine fibers were characterized by SEM (Nova NanoSEM 200, FEI) under magnification of 5000x, which was combined with energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) (EDAX). The diameter changes of polymer fibers were determined using an optical microscope (Alpha, Vision Engineering Ltd) coupled with the computer programme Pixel Fox. The release of magnetite from fibers after their incubation in water through analysis of iron was determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Elan 6100 Parkin Elmer). Static mechanical properties of nanocomposites (tensile strength, Young's modulus) were determined in tensile mode with the use of a universal testing machine, the Zwick testing machine model 1435, using the crosshead speed of 2 [mm/min].

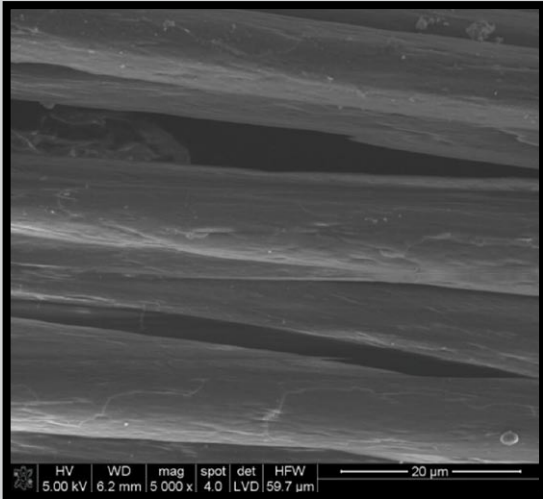


FIG. 1. SEM microphotograph of pure alginate fibers  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  (A).

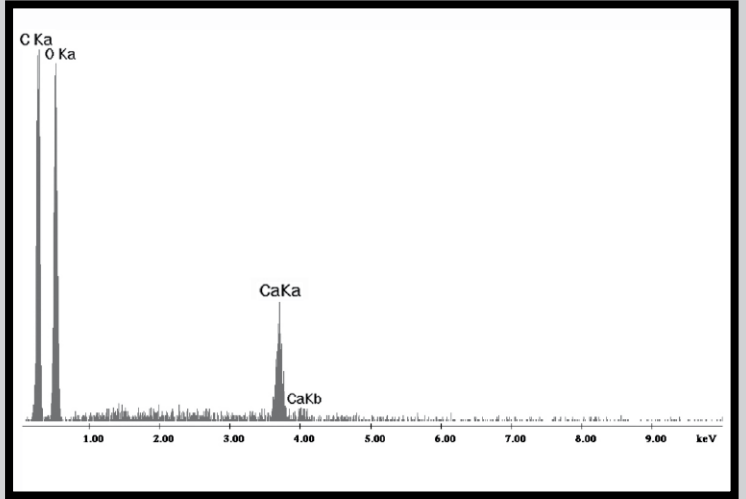


FIG. 2. EDS analysis of surface of  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  fibers (A).

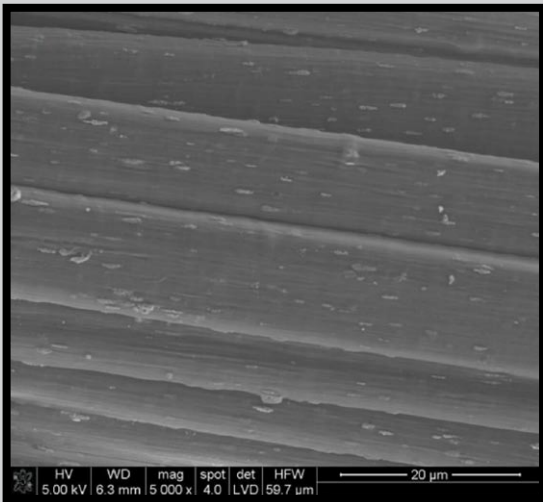


FIG. 3. SEM microphotograph of  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  fibers containing 7wt% of magnetite (AF1).

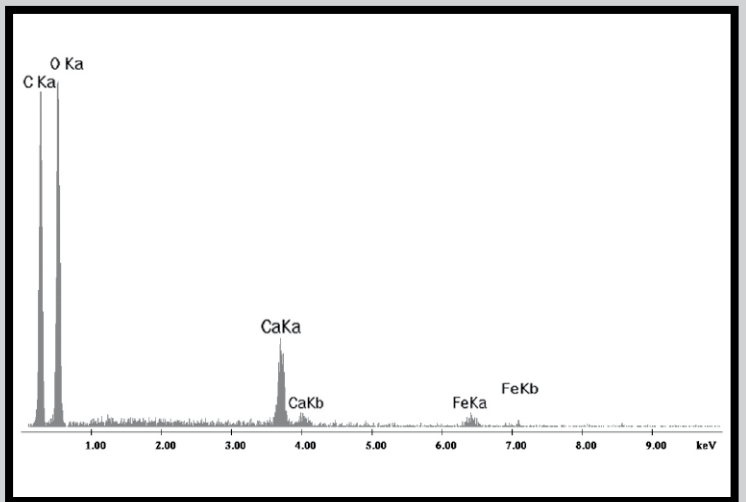


FIG. 4. EDS analysis of surface of  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  fibers containing 7wt% of magnetite (AF1).

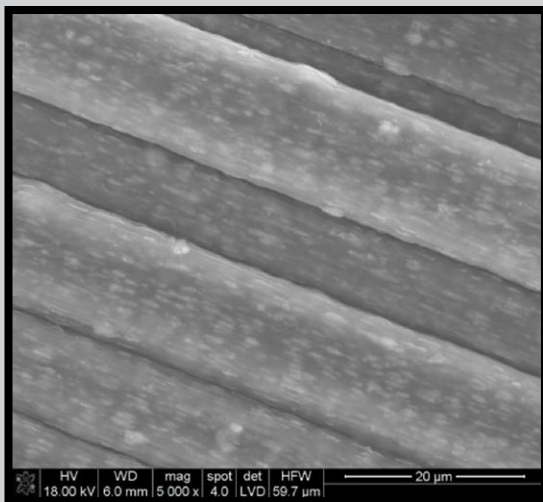


FIG. 5. SEM microphotograph of  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  fibers containing 20wt% of magnetite (AF2).

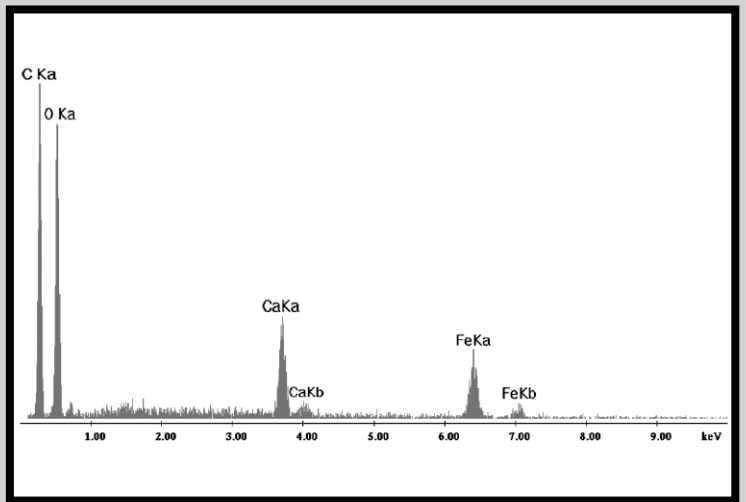


FIG. 6. EDS analysis of surface of  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  fibers containing 20wt% of magnetite (AF2).

## Results

Dispersion of magnetite in the alginate may influence the fiber morphology. Microscopic analysis of the fibers before and after dispersion process of magnetite in polymer solution provides information on their morphology. SEM microphotographs illustrate typical surfaces of pure alginate fibers (FIG. 1) and alginate fibers containing two concentration of magnetite (FIGs. 3,5). Moreover, using EDS the elemental analysis from surface of fibers was done (FIGs. 2,4,6).

The grooves along the axis of pure alginate  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  fibers are typical for fibers obtained using the dry-jet wet spun method. EDS analysis indicates the presence of oxygen, nitrogen and calcium on the surface of pure alginate fibers (FIG. 2). The existence of calcium in sample A confirms the exchange of  $\text{Na}^+$  cation from sodium alginate on  $\text{Ca}^{2+}$  during solidification. The morphology of alginate fibers containing magnetite (AF1, AF2) was different in comparison with pure  $\text{Ca}(\text{Alg})_2$  (FIGs. 3,5). The magnetite was found in the form of clusters on the surface and within the inner part of fibers, especially in the case of fibers with a higher concentration of nanoadditives (FIG. 5). Appropriate distribution of magnetite inclusion on alginate fibers confirmed the EDS analysis of iron (FIGs. 7,8). The same analysis confirms the higher concentration of magnetite in the case of fibers AF2 (FIGs. 4,6).

The mechanical tests of the pure polymer fibers and fibers containing nanoadditives were done using a Zwick universal testing machine. The results of the mechanical properties of fibers are displayed in TABLE 1.

The mechanical properties of alginate fibers after modification with magnetite were different in comparison with pure alginate fibers. The tensile strength of nanocomposite fibers was lower in comparison with alginate fibers without modification.

Probably, the presence of magnetite clusters on the surface, and the bulk of alginate fibers (AF1 and AF2) have a significant influence on the decrease of the tensile strength of fibers. Another possible reason for the decrease of the tensile strength of alginate fibers modified with magnetite is too high a concentration of nanoadditives in the bulk of fibers. This effect was especially noticeable in the case of fibers containing 20%wt. of magnetite (AF2). The literature data indicated that the optimal concentrations of nanoadditives in nanocomposites which have an advantageous influence on their mechanical properties are in the range of 0.5% to 5%wt. [15-17]. The presence of 20%wt. of magnetite in alginate fibers has an influence on increasing of fibers diameter by about 20% in comparison with pure alginate fibers (A).

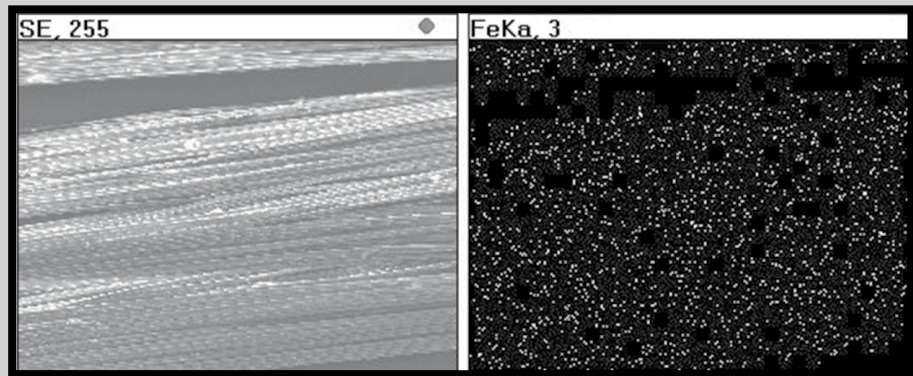


FIG. 7. Microscope image (SEM) and distribution of Fe on the surface of AF1 fibers.

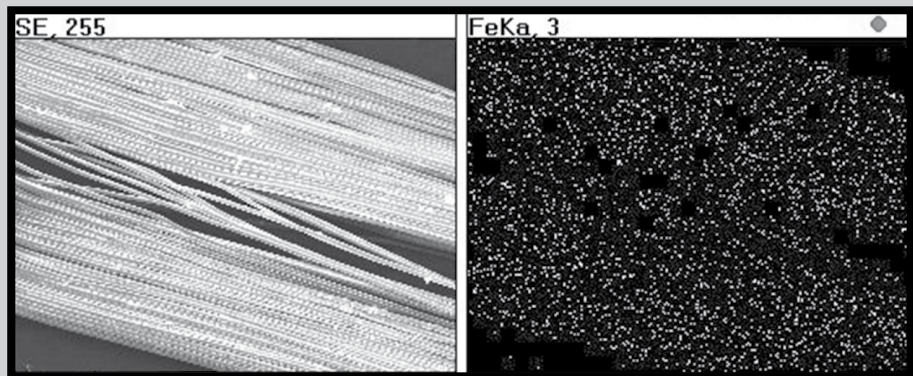


FIG. 8. Microscope image (SEM) and distribution of Fe on the surface of AF2 fibers.

TABLE 1. Mechanical properties of pure alginate fibers and fibers modified with magnetite.

Samples	Tensile strength Rm [MPa]	Young's modulus E [GPa]	Diameter d [ $\mu\text{m}$ ]
A	304.5 $\pm$ 79.0	13.8 $\pm$ 1.8	13.5 $\pm$ 0.6
AF1	257.4 $\pm$ 51.9	14.7 $\pm$ 1.2	13.8 $\pm$ 0.8
AF2	205.7 $\pm$ 67.8	12.3 $\pm$ 5.0	16.4 $\pm$ 0.9

TABLE 2. Elemental content in incubation fluid.

	A		AF1		AF2	
	1 week	1 month	1 week	1 month	1 week	1 month
Ca [mg/l]	No detected	2.345	0.119	0.745	0.491	1.642
Fe [mg/l]	-	-	0.055	0.070	0.070	0.080

The slight increase of Young's modulus for fibers containing 7%wt. of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (AF1) could be connected with the structure of alginate fibers. Probably, the iron from magnetite, like calcium from the solidification solution, could be incorporated in place of sodium, which influences bringing the polymer chains closer and the formation of the secondary bonding. The large quantity of the secondary bonding has an impact on the increase of Young's modulus.

The alginate fibers (A, AF1, AF2) were incubated in distilled water for one month in order to evaluate calcium (Ca) and iron (Fe) release from fibers. The release of elements from fibers was determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The results are presented in TABLE 2.

The incubation of alginate fibers in water induces elemental release to solution. The highest concentration of calcium in the incubation fluid was analyzed for alginate fibers ( $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ ) whereas the lowest concentration was observed for fibers containing 7%wt. of magnetite (AF1). The relatively high concentration of calcium in the incubation fluid in the case of sample AF3 could result from the easier penetration of water inside the fibers caused by the presence of magnetite agglomerates on the fibers' surface. The agglomerates may cause some surface defects, which contributes to easier water diffusion inside the fibers. Iron as a main ingredient of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), appeared in the case of both incubation fluids (after incubation AF1 and AF2 fibers), and their concentration were higher for samples containing 20%wt. of magnetite (AF2). The quantity of iron in the water solution increased with the time of incubation.

## Conclusion

In this work three types of alginate fibers modified with nanomagnetite were investigated. In biomaterials engineering new prospective materials could combine appropriate physicochemical and biological properties to regenerate and reconstruct tissue defects, with the possibility of releasing some particles which, in proper condition, destroy the affected tissue. The nanocomposite alginate fibers containing nanomagnetite as a modifier are a good candidate to be intelligent biomaterials in the regeneration and treatment of damaged tissues. It is interesting that is possible to modify the fibers using magnetite in a wide range, which allows controlling of the particles quantity released during incubation. Additionally, the high concentration of nanomagnetite in alginate fibers does not cause the complete destruction of nanocomposite fibers (which is sometimes observed in polymer nanocomposites which contain a high amount of nanoadditives). The fibers keep their shape and mechanical properties at an appropriate level for scaffolds for tissue regeneration.

Further investigations are, however, required for a better understanding of the mechanism of nanoparticles release from polymer fibers. It is necessary to carry out a long-term incubation of nanocomposite fibers in water and in other solutions, such as phosphate buffered saline (PBS) in order to assess the release of magnetite with degradation time. The next steps will also include a biological evaluation of these nanocomposites fibers in contact with cells in *in vitro* tests.

## Acknowledgements

The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education, Statute Investigation No. 11.11.160.937.

## References

- [1] Pan C-J, Tang J-J, Weng Y-J, Wang J, Huang N. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73 (2009) 199–206.
- [2] Hoffman AS. *Clinical Chemistry* 46(9) (2000) 1478–86.
- [3] Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. *Biomaterials* 28 (2007) 5068–5073.
- [4] Jayabalan M, Shalumon KT, Miitha MK, Ganesan K, Epple M. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 763–775.
- [5] Sitharaman B, Shi X, Walboomers XF, Liao H, Cuijpers V, Wilson LJ, Mikos AG, Jansen JA. *Bone* 43 (2008) 362–370.
- [6] Noh K-T, Lee H-Y, Shin U-S, Kim H-W. *Materials Letters* 64 (2010) 802–805.
- [7] Mozafari M, Rabiee M, Azami M, Maleknia S. *Applied Surface Science* 257 (2010) 1740–1749.
- [8] Stodolak E, Paluszkiwicz C, Bogun M, Blazewicz M. *Journal of Molecular Structure* 924–926 (2009) 208–213.
- [9] Yang B, Li Y, Shi S, Kong XY, Guo G, Huang MJ, Luo F, Wei YQ, Zhao X, Qian ZY. *Carbohydrate Polymers* 80 (2010) 860–865.
- [10] Liu X, Kaminski MD, Chen H, Torno M, Taylor LT, Rosengart AJ. *Journal of Controlled Release* 119 (2007) 52–58.
- [11] Yuan Q, Venkatasubramanian R, Hein S, Misra RDK. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1024–1037.
- [12] Osaka T, Nakanishi T, Shanmugam S, Takahama S, Zhang H. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71 (2009) 325–330.
- [13] Murbe J, Rechtenbach A, Topfer J. *Materials Chemistry and Physics* 110 (2008) 426–433.
- [14] Sławska–Waniewska A. *Postępy fizyki* 2004, T. 55, 157, 159–161.
- [15] Olejnik M. *Techniczne wyroby włókiennicze 1-2* (2008) 25–27.
- [16] Fraczek–Szczypta A. *Badania nad oddziaływaniem nanorurek węglowych w kompozytach z osnową poliakrylonitrylową i węglową*, Praca doktorska, Krakow 2009.
- [17] Kotela I, Podporska J, Soltysiak E, Konsztowicz KJ, Blazewicz M. *Ceramics International* 35 (2009) 2475–2480.



# ODPORNOŚĆ KOROZYJNA UTLENIANEGO ANODOWO STOPU Ti6Al4V ELI PO DŁUGOTRWAŁEJ EKSPOZYCJI W PŁYNIE RINGERA

J. SZEWCZENKO\*, J. MARCINIAK, M. KACZMAREK

INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH,  
POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

\* E-MAIL: JANUSZ.SZEWCZENKO@POLSL.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 21-25*]

## Wprowadzenie

Obserwowany w ostatnim okresie wzrost liczby reakcji alergicznych oraz okołowszczepowych, w międzywarstwie implant wykonany ze stopu tytanu – tkanka kostna, wskazał na potrzebę modyfikacji powierzchni implantów wykonanych ze stopu Ti6Al4V ELI [1,2]. Modyfikacja powierzchni ma na celu poprawę biokompatybilności stopu, której jednym z powszechnie przyjętych wyznaczników jest odporności korozyjna [3].

Struktura i skład warstwy powierzchniowej implantów z tytanu i jego stopów mogą być modyfikowane przy użyciu różnych metod, wśród których dominują metody mechaniczne, chemiczne, elektrochemiczne i termiczne [4]. W ich wyniku na powierzchni stopów tytanu oprócz tlenków tytanu występują inne tlenki skorelowane ze składem chemicznym podłoża. Wytworzone na powierzchni tlenki powinny charakteryzować się dużą stabilnością termodynamiczną oraz małą rozpuszczalnością w tkankach [5].

Jednym z najczęściej stosowanych finalnych zabiegów modyfikacji powierzchni implantów ze stopów tytanu jest utlenianie anodowe oraz proces sterylizacji parowej [6]. Zdaniem autorów odporność korozyjna anodyzowanego w identycznych warunkach stopu Ti6Al4V ELI uzależniona jest od sposobu wstępnego przygotowania powierzchni materiału [7,8]. Ponadto dobra odporność korozyjna implantów powinna utrzymywać się przez cały czas ich przebywania w organizmie.

W pracy przedstawiono kontynuację badań, opisanych w artykule [9], wpływu wstępnego przygotowania powierzchni implantów na odporność korozyjną stopu Ti6Al4V ELI anodyzowanego przy takich samych parametrach, a następnie poddanego długotrwałej ekspozycji w roztworze Ringera. Ponadto przedstawiono wyniki badań stężenia jonów metalicznych przenikających do roztworu po 28 dniach.

## Materiał i metodyka badań

W badaniach wykorzystano próbki ze stopu Ti6Al4V ELI pobrane z prętów o średnicy 6 i 14 mm. Skład chemiczny badanego stopu spełniał wymagania zawarte w normach ISO 5832-3 i ASTM F-136. W badaniach wykorzystano próbki, których modyfikacja powierzchni została przeprowadzona z wykorzystaniem zabiegów obróbki powierzchniowej, którym przyporządkowano następujące oznaczenia (zgodnie z zasadą przyjętą w badaniach i [9]): 1 szlifowanie, 3 polerowanie mechaniczne, 4 piaskowanie, 5 polerowanie elektrolityczne, XV anodyzacja (X oznacza wartość potencjału, przy którym przeprowadzano proces). Ostatnim zabiegiem był proces sterylizacji parowej (S).

# CORROSION RESISTANCE OF ANODIZED Ti6Al4V ELI ALLOY AFTER LONG-TERM EXPOSURE TO RINGER' SOLUTION

J. SZEWCZENKO\*, J. MARCINIAK, M. KACZMAREK

INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLAND  
\* E-MAIL: JANUSZ.SZEWCZENKO@POLSL.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 21-25*]

## Introduction

Increase of allergic and peri-implant reactions observed in Ti-based implant – bone tissue interlayer showed the need to modify surface of Ti6Al4V ELI alloy implants [1,2]. The aim of surface modification is development of the alloy' biocompatibility, determined by its corrosion resistance [3].

Structure and composition of surface layers can be modified by means of diverse methods, among which the following are predominant: mechanical, chemical, electrochemical and thermal [4]. The applied surface treatment generates, beside titanium oxides, other oxides connected with the chemical composition of substrate. The oxides should be characterized by high thermodynamic stability and low solubility in tissues [5].

One of the most commonly applied surface treatment of Ti-based alloys is anodic oxidation and steam sterilization process [6]. In the authors opinion, corrosion resistance of the anodized Ti6Al4V ELI alloy is conditioned by surface pretreatment [7,8]. Furthermore, good corrosion resistance of implant should be kept for whole implantation time.

The work presents continuation of research described in [9] paper on influence of pretreatment on corrosion resistance of the anodized Ti6Al4V ELI alloy after long time exposure to Ringer's solution. Moreover, results of metallic ions release were also presented in the mentioned paper.

## Material and methods

The Ti6Al4V ELI alloy, in the form of bars of 6 and 14 diameter, was used in the research. Chemical composition of the alloy met the requirements of ISO 5832-3 and ASTM F-136 standard. The following surface treatment was applied (according to principle assumed in researches and [9]): 1 – grinding, 3 – mechanical polishing, 4 – sandblasting, 5 – electropolishing, XV – anodization (X represents the applied potential). The last process of surface treatment was steam sterilization (S).

Sand papers 120 ÷ 600 were applied for the grinding. The mechanical polishing was carried out with the use of sisal brushes and polishing paste. The sandblasting was carried out in a blast cabinet with the use of glass balls. The electropolishing was carried out in the bath based on chromic acid (E-395 POLIGRAT GmbH). The anodization was carried out in the electrolyte based on phosphoric and sulphuric acids (Titan Color POLIGRAT GmbH) by applying the following 57, 77, 87 and 97 V. The steam sterilization was carried out for the following parameters: temperature – 134°C, pressure – 2.1 bar, time – 12 minutes, in the Basic Plus autoclave (Mocom).

Szlifowanie mechaniczne prowadzono kolejno na papierach ściernych o gradacji 120÷600. Polerowanie mechaniczne przeprowadzono na polerze ręcznej z wykorzystaniem szczotek szalowych i pasty polerskiej. Piaskowanie przeprowadzono w iniekcyjnej kabinie śrutowniczej, wykorzystując jako medium robocze kulki szklane. Polerowanie elektrolityczne prowadzono w kąpeli na bazie kwasu chromowego (E-395 Firmy POLIGRAT GmbH). Proces anodyzacji prowadzony był z użyciem elektrolitu na bazie kwasów fosforowego i siarkowego (Titan Color Firmy POLIGRAT GmbH) przy potencjałach 57, 77, 87 i 97 V. W wyniku zróżnicowania wartości potencjału w procesie anodyzacji uzyskano próbki o różnym zabarwieniu. Sterylizację parową przeprowadzono w autoklawie Basic Plus firmy Mocom, w temperaturze 134°C, przy ciśnieniu 2,1 bar przez 12 minut.

Badania odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną przeprowadzono, dla próbek o średnicy 14 mm, zgodnie z PN-EN ISO 10993-13. Do badań wykorzystano potencjostat PGP201 firmy Radiometer. Jako elektrodę odniesienia zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową (NEK), elektrodę pomocniczą stanowiąc drut platynowy. Po wyznaczeniu potencjału obwodu otwartego  $E_{OCP}$  badania odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną rozpoczynano od wartości  $E_{pocz} = E_{OCP} - 100$  mV. Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością 3 mV/s. Po osiągnięciu maksymalnej wartości zakresu pomiarowego +4000 mV lub uzyskaniu gęstości prądu anodowego 1 mA/cm<sup>2</sup>, zmieniano kierunek polaryzacji. Badania przeprowadzono w roztworze Ringera (NaCl – 8,6 g/l, KCl – 0,3 g/l, CaCl<sub>2</sub> – 0,33 g/l) firmy B. Braun Melsungen AG w temperaturze 37 ± 1°C i pH = 6,8 ± 0,2.

Próbki wykonane z pręta o średnicy 6 mm i długości 48 mm wykorzystano do badań mających na celu oznaczenie stężenia jonów Ti, Al, V oraz Cr, które przeniknęły do roztworu. Każda z próbek przez okres 28 dni przebywała w 100 ml płynu fizjologicznego Ringera o temperaturze 37 ± 1°C. Stężenia jonów metalicznych w roztworze zmierzono za pomocą spektrometru JY 2000, firmy Yobin – Yvon, wykorzystując metodę emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-AES). Przy sporządzaniu krzywej wzorcowej wykorzystano rozcieńczone materiały wzorcowe firmy Merck.

Próbki po 28 dniach przebywania w roztworze poddano także badaniom odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną.

## Wyniki badań

Na podstawie zarejestrowanych krzywych polaryzacji anodowej wyznaczono charakterystyczne wielkości opisujące odporność na korozję wżerową, tj.: potencjał korozyjny  $E_{kor}$ , potencjał transpassywacji  $E_{tr}$ , potencjał przebicia  $E_b$ , potencjał repasywacji  $E_{cp}$ , opór polaryzacyjny  $R_p$  (Ω·cm<sup>2</sup>).

Wartość potencjału przebicia  $E_b$  i potencjału transpassywacji  $E_{tr}$  odczytywano bezpośrednio z wykresu w postaci klasycznej rysując styczną do przebiegu zmian prądu pasywacji oraz styczną w punkcie przegięcia krzywej. Współrzędna punktu przecięcia stycznych odpowiadała wartości  $E_b$ . Wartość potencjału repasywacji  $E_{cp}$  odczytywano natomiast ze współrzędnej punktu przecięcia krzywej anodowej z krzywą powrotną.

Opór polaryzacyjny wyznaczono metodą Sterna, dla zakresu ±10 mV w stosunku do potencjału korozyjnego.

Wyniki badań odporności na korozję wżerową dla próbek sterylizowanych (S) oraz sterylizowanych i następnie przetrzymywanych przez okres 28 dni w roztworze Ringera (28D) przedstawiono w TABELI 1.

Pitting corrosion tests were carried out by means of potentiodynamic method in accordance with the PN-EN ISO 10993-13 standard for the samples of 14 mm diameter. The PGP201 potentiostat (Radiometer) was applied in the research. As the reference electrode, saturated calomel electrode (SCE) was applied and the auxiliary electrode was a platinum wire. The corrosion tests started with determination of open circuit potential  $E_{OCP}$ . The pitting corrosion tests started at the potential  $E_{pocz} = E_{OCP} - 100$  mV. The applied scan rate was equal to 3 mV/s. After reaching the maximum measuring range (+4000 mV) or anodic current density 1 mA/cm<sup>2</sup> the scanning direction was reversed. The tests were carried out in Ringer's solution (NaCl – 8.6 g/l, KCl – 0.3 g/l, CaCl<sub>2</sub> – 0.33 g/l; B. Braun Melsungen AG) at the temperature of 37 ± 1°C and pH = 6.8 ± 0.2.

The samples made of the rod of 6 mm diameter and length equal to 48 mm were applied in the tests carried out in order to evaluate concentration of Ti, Al, V and Cr ions released to the solution. Each sample was submerged in 100 ml of the Ringer's physiological solution at the temperature of 37 ± 1°C for 28 days. The ion concentration was measured by means of JY 2000 spectrometer (Yobin – Yvon), with the use of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Pattern curve was worked out on the basis of diluted model materials by Merck.

For the samples after 28 days exposure, pitting corrosion tests by means of potentiodynamic method were also carried out.

## Results

On the basis of the recorded anodic polarization curves, the following characteristic values determining pitting corrosion resistance were set: corrosion potential  $E_{kor}$ , transpassivation potential  $E_{tr}$ , breakdown potential  $E_b$ , repassivation potential  $E_{cp}$ , polarization resistance  $R_p$  (Ω·cm<sup>2</sup>).

Values of breakdown and transpassivation potentials were determined directly from the curve by drawing tangents to the change of passivation current and to the inflexion point of the curve. Coordinate of the inflexion point of the tangents corresponded to the value  $E_b$ . Value of the repassivation potential  $E_{cp}$  was determined from the coordinate of the inflexion point of the anodic current curve and the return curve.

Polarization resistance was determined by means of the Stern method, the range ±10 mV with relation to corrosion potential was analyzed.

Results of pitting corrosion resistance for the sterilized samples (S) and sterilized and then submerged for 28 days in the Ringer's solution (28D) were presented in TABLE 1.

Results of ion release into the Ringer's solution after 28 days exposure were presented in TABLE 2. Furthermore, values of standard deviation (SD) for individual measurements were also presented in the table.

## Discussion

No significant changes in anodic polarization curves for the anodic oxidized samples after diverse surface modification of the Ti6Al4V ELI alloy were observed, both for the sterilized samples and the samples after 28 day exposure in the Ringer's solution. The exception is the 1/4/5/XV group, for which for the samples after 28 day exposure to the Ringer's solution (28D), no repassivation potential (characteristic for the sterilized samples (S)) was observed – FIG. 1.

**TABELA 1. Wyniki badań odporności korozyjnej stopów Ti6Al4V ELI po sterylizacji (S) oraz przetrzymywaniu przez 28 dni w roztworze Ringera (28D).**

**TABLE 1. Corrosion resistance of Ti-6Al-4V ELI alloys after sterilization (S) and 28 days exposure to the Ringer' solution (28 D).**

Oznaczenie próbek / Sample	$E_{kor}$ , mV		$E_b$ , Mv		$E_{rep}$ , mV		$R_p$ , $k\Omega \cdot cm^2$	
	S	28D	S	28D	S	28D	S	28D
1/3	+65	+176	-	+2 140	-	+1 800	621	310
1/4	-117	+83	-	+3 140	-	+2 270	349	1 250
1/3/5	-50	-260	+3 843	+3 150	+1 823	+1 540	213	2 215
1/4/5	+9	+164	+3 914	+4 090	+1 817	+1 763	221	1 380
1/3/57V	+228	+300	-	-	-	-	9 533	788
1/3/77V	-17	+180	-	-	-	-	2 984	793
1/3/87V	+138	+180	-	-	-	-	3 350	1 065
1/3/97V	+198	+275	-	-	-	-	3 783	1 132
1/4/57V	+9	+84	-	-	-	-	1 380	1 380
1/4/77V	-53	-68	-	-	-	-	1 542	3 135
1/4/87V	-140	+54	-	-	-	-	1 007	2 850
1/4/97V	-130	+103	-	-	-	-	1 038	2 610
1/3/5/57V	0	-44	+2 970	+3 350	+1 880	+1 470	65 925	2 740
1/3/5/77V	-12	+124	+2 283	+3 050	+1 866	+1 800	38 400	1 280
1/3/5/87V	-68	+265	+2 250	+3 150	+1 860	+1 700	39 930	630
1/3/5/97V	-5	+250	+2 323	+2 750	+1 853	+1 750	41 623	590
1/4/5/57V	-57	+207	+3 153	+3 140	+1 866	-	7 820	2 280
1/4/5/77V	-87	+182	+3 043	+2 540	+1 917	-	9 870	2 110
1/4/5/87V	-55	+260	+3 133	+3 210	+1 880	-	4 636	2 000
1/4/5/97V	-9	+275	+2 866	+3 280	+1 876	-	6 483	1 665

Wyniki analizy stężenia jonów pierwiastków metalicznych w roztworze Ringera po 28 dniowym okresie przetrzymywania w nim próbek ze stopu Ti6Al4V ELI podanych różnym zabiegom modyfikacji powierzchni przedstawiono w TABELI 2. W tabeli przedstawiono ponadto wartości odchylenia standardowego (SD) dla poszczególnych pomiarów.

## Omówienie wyników badań

W przebiegu krzywych polaryzacji anodowej próbek utlenianych anodowo po różnych zabiegach modyfikacji powierzchni stopu Ti6Al4V ELI, badanych bezpośrednio po procesie sterylizacji jak i przetrzymywanych 28 dni w roztworze Ringera, nie zaobserwowano istotnych zmian. Wyjątek stanowi grupa 1/4/5/XV, dla której w przypadku próbek przetrzymywanych 28 dni w roztworze Ringera (28D) nie stwierdzono, występującego dla próbek sterylizowanych (S), procesu repasywacji – RYS. 1. Natomiast dla próbek po obróbce mechanicznej (1/3, 1/4) przetrzymywanych w roztworze Ringera (28D) zaobserwowano inicjację procesów korozyjnych oraz przebieg procesu repasywacji, podczas gdy próbki sterylizowane z tych grup charakteryzowały się perfekcyjną pasywacją w całym zakresie pomiarowym.

**TABLE 2. Results of ion release into the Ringer' solution.**  
**TABELA 2. Wyniki badań stężenia jonów metalicznych w roztworze Ringera.**

Oznaczenie próbek / Sample	Ti		Al		V		Cr	
	ppm	SD	ppm	SD	ppm	SD	ppm	SD
1/3	1.03	0.085	0.337	0.003	0.01	0.0002	-	-
1/4	3.01	0.065	1.605	0.016	0.13	0.011	-	-
1/3/5	2.13	0.025	1.450	0.006	0.98	0.009	0.100	0.007
1/4/5	1.54	0.093	0.334	0.010	0.19	0.003	0.040	0.003
1/3/57V	2.07	0.055	1.318	0.004	1.20	0.050	-	-
1/3/77V	1.92	0.082	1.020	0.002	0.91	0.005	-	-
1/3/87V	1.88	0.054	0.988	0.002	0.80	0.008	-	-
1/3/97V	1.78	0.048	0.856	0.005	0.13	0.030	-	-
1/4/57V	2.77	0.160	1.550	0.005	0.44	0.088	-	-
1/4/77V	1.79	0.025	0.755	0.003	0.40	0.004	-	-
1/4/87V	1.78	0.190	0.613	0.004	0.29	0.029	-	-
1/4/97V	1.66	0.170	0.589	0.001	0.22	0.009	-	-
1/3/5/57V	2.00	0.165	1.000	0.001	0.98	0.085	0.072	0.024
1/3/5/77V	1.85	0.072	0.855	0.001	0.78	0.025	0.048	0.005
1/3/5/87V	1.81	0.120	0.728	0.007	0.57	0.190	0.034	0.003
1/3/5/97V	1.77	0.078	0.525	0.005	0.19	0.017	0.033	0.003
1/4/5/57V	1.77	0.057	0.341	0.007	0.25	0.009	0.098	0.009
1/4/5/77V	1.73	0.540	0.315	0.005	0.22	0.015	0.056	0.003
1/4/5/87V	1.65	0.095	0.311	0.002	0.31	0.002	0.039	0.004
1/4/5/97V	1.63	0.020	0.290	0.005	0.09	0.002	0.014	0.001

Ekspozycja w roztworze Ringera dla większości próbek spowodowała wzrost wartości potencjału korozyjnego, przyjmował on wartości dodatnie. Wyjątek stanowią grupy 1/3/5, 1/4/77V oraz 1/3/5/57V. Ponadto dla większości próbek anodyzowanych przetrzymywanych w roztworze Ringera, których program modyfikacji powierzchni obejmował polerowanie elektrolityczne (5) (1/3/5/XV i 1/4/5/XV) zaobserwowano wzrost wartości potencjału przebicia oraz spadek wartości potencjału repasywacji lub jego brak (1/4/5/XV).

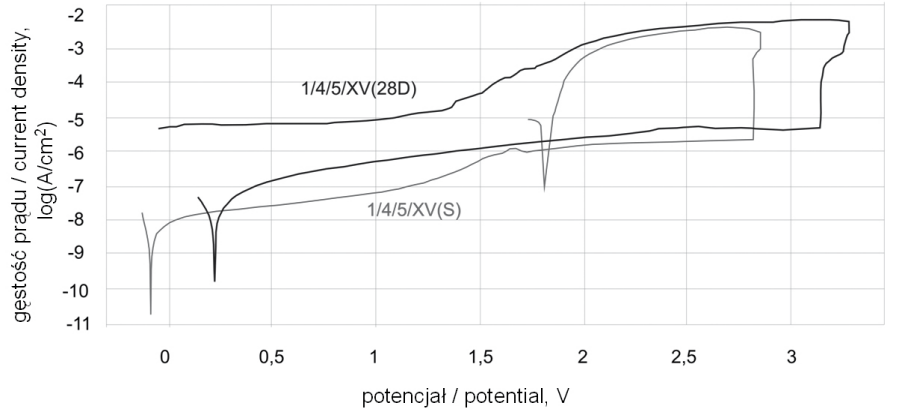
W grupach próbek polerowanych elektrolitycznie (1/3/5 i 1/4/5) po długotrwałej ekspozycji na roztwór Ringera zaobserwowano wzrost wartości oporu polaryzacyjnego. Podobny efekt zaobserwowano dla grupy 1/4/XV. W przypadku pozostałych grup (1/3/XV, 1/3/5/XV, 1/4/5/XV) zaobserwowano spadek wartości oporu polaryzacyjnego.

Najmniejsze stężenie jonów Ti oraz V w roztworze zaobserwowano dla próbek szlifowanych i polerowanych mechanicznie (1/3), natomiast w przypadku jonów Al najmniejsze stężenie obserwowano dla próbek z grupy 1/4/5/97V. Jony Cr występowały w roztworze jedynie w przypadku próbek, których program modyfikacji powierzchni obejmował polerowanie elektrolityczne. Spośród próbek anodyzowanych najmniejsze stężenia jonów metalicznych zaobserwowano dla próbek z grupy 1/4/5/97V. Ogólnie dla wszystkich grup próbek anodyzowanych zaobserwowano zmniejszenie stężenia wszystkich jonów metalicznych w roztworze Ringera wraz ze wzrostem wartości potencjału, przy którym przeprowadzano proces utleniania anodowego.

## Podsumowanie

Procesy korozji inicjowane przy potencjale przekraczającym +2500 mV, na powierzchni próbek z grup 1/3/5/XV oraz 1/4/5/XV ze względu na zakres potencjałów obserwowany w organizmie człowieka (do +250mV) nie mogą być traktowane jako niekorzystne. Istotne jest także, iż procesom tym, zwłaszcza w grupie 1/3/5/XV, towarzyszy zjawisko repasywacji wżerów przy wartościach potencjału około +1800 mV.

Obserwowane (dla próbek sterylizowanych (S) oraz sterylizowanych i przetrzymywanych 28 dni w roztworze Ringera (28D)) znaczące różnice wartości potencjału korozyjnego oraz oporu polaryzacyjnego utlenianego anodowo, po różnych wstępnych procesach modyfikacji powierzchni, stopu Ti6Al4V ELI wskazują na brak stabilności termodynamicznej związków wytworzonych na jego powierzchni. Zachodzącym na powierzchni zmianom własności fizykochemicznych stopu towarzyszy przenikanie jonów metalicznych do roztworu Ringera. Przenikanie do środowiska otaczającego implant produktów jego degradacji jest zjawiskiem bardzo niekorzystnym. Podkreślić należy, iż obecność jonów Cr w roztworze, w którym znajdowały się próbki poddane procesowi polerowania elektrolitycznego (5), stanowiących najprawdopodobniej pozostałość po procesie polerowania elektrolitycznego, czyni wątpliwym sensowność jego stosowania. Badania wykazały ponadto, iż wraz ze wzrostem potencjału procesu utleniania anodowego zmniejsza się ilość jonów metalicznych przenikających do roztworu.



**RYS. 1. Krzywe potencjodynamiczne dla próbek z grupy 1/4/5/XV(S) i 1/4/5/XV(28D).**

**FIG. 1. Potentiodynamic curves for the samples for the group 1/4/5/XV(S) and 1/4/5/XV(28D).**

## Summary

Corrosion processes initiated at the potential of +2500 mV, recorded for samples from the 1/3/5/XV and 1/4/5/XV groups should not be considered as unfavorable, due to potentials observed in human body (up to +250 mV). It is also significant that these processes, especially in the 1/3/5/XV group, are accompanied by repassivation of the pits observed at the potential equal to +1800 mV.

Significant differences of corrosion potential and polarization resistance for the pretreated Ti6Al4V ELI alloy (recorded for the sterilized samples (S) and sterilized and then submerged for 28 days in the Ringer' solution (28D)) show thermodynamic instability of compounds created on the alloy' surface. Changes of physiochemical properties of the alloy are accompanied by metallic ion release into the Ringer' solution. The ion release is highly unfavorable phenomena. It is to be emphasized that the presence of Cr ions in the solution observed for the electropolished samples (5) indicates that application of this type of surface treatment is questionable. Furthermore, the research showed that along with the increase of the anodic oxidation potential, the decrease of ion release is observed.

Taking into consideration ion release, corrosion potentials and polarization resistance of the Ti6Al4V ELI alloy after diverse surface treatment, benefits resulting from the anodization of the alloy, followed by the proposed pretreatment, seem to be ambiguous. Combination of grinding and sandblasting (1/4) seems to be the best option of the applied pretreatment. However, the best properties (increase of corrosion potential and polarization resistance after 28 day exposure to the Ringer' solution) are observed for the samples anodized at the potential of 97V.

The obtained results indicate the need of further research on surface modification of Ti6Al4V ELI alloy in order to increase biocompatibility. Moreover, the results show undoubtedly that biocompatibility evaluation of metallic biomaterials should be done taking into account research on stability of physiochemical properties of surface and influence of all operations of surface treatment.

## Acknowledgements

*The work was financially supported by the research project in years 2010 – 2012.*

Przyjmując ilość produktów degradacji przenikających do roztworu, wartości potencjałów korozyjnych i oporów polaryzacyjnych, charakteryzujących stop Ti6Al4V ELI po różnych zabiegach modyfikacji powierzchni, niejednoznacznie wydają się korzyści wynikające z anodyzacji stopu poprzedzonej zaproponowanymi w pracy zabiegami wstępnej obróbki powierzchniowej. Najlepszym wariantem przygotowania wstępnego powierzchni próbek przed anodyzacją wydaje się być zatem szlifowanie a następnie piaskowanie (1/4). Najlepsze własności zapewnia natomiast proces anodyzacji prowadzony przy potencjale 97V. Tak przeprowadzona modyfikacja powierzchni powoduje po 28 dniowym przebywaniu w roztworze Ringera wzrost wartości potencjału korozyjnego oraz oporu polaryzacyjnego.

Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę dalszych badań mających na celu poprawę biokompatybilności stopu Ti6Al4V ELI poprzez modyfikację jego powierzchni. Ponadto wskazują jednoznacznie, iż oceny biokompatybilności biomateriałów metalowych należy dokonywać z uwzględnieniem badań umożliwiających ocenę stałości w czasie ukształtowanych własności fizykochemicznych powierzchni oraz wpływu wszystkich zabiegów modyfikacji powierzchni stopu.

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010 - 2012 jako projekt badawczy.*

## Piśmiennictwo

## References

- [1] M.A. Khan, R.L. Williams, D.F. Williams, The corrosion behavior of Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solution, *Biomaterials* 20 (1999) 631-637.
- [2] M.A. Khan, R.L. Williams, D.F. Williams, Conjoin corrosion and wear in Ti alloys, *Biomaterials*, 20, (1999) 765-772 .
- [3] J. Marciniak, *Biomateriały*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [4] J. Marciniak, *Inżynieria biomateriałów. Zagadnienia wybrane*, Wydawnictwo Pracowni Komputerowej Jacka Skalmirskiego, Gliwice 2009.
- [5] J. Pouilleau, D. Devilliers, F. Garrido, S. Durand-Vidal, E. Mahé, Structure and composition of passive titanium oxide films, *Materials Science and Engineering B*, 47, 3 (1997) 235-243.
- [6] V. Zwilling, M. Aucouturier, E. Darque-Ceretti, Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach, *Electrochimica Acta* 45 (1999) 921-929.
- [7] J. Szewczenko, W. Walke, K. Nowińska, J. Marciniak, Corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy after diverse surface treatments, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, 41, 5 (2010) 360-371.
- [8] J. Szewczenko, K. Nowińska, J. Marciniak. Wpływ wstępnych zabiegów obróbki powierzchniowej na odporność korozyjną stopu Ti6Al4V ELI po anodyzacji, *Przegląd elektrotechniczny*, 87, 3 (2011) 228-231.
- [9] J. Szewczenko, J. Marciniak, M. Kaczmarek, S. Jadacka, Wpływ modyfikacji powierzchni stopu Ti6Al4V ELI na odporność korozyjną, *Inż. Biomater.*, 13, 96/98 (2010) 77-82.

# SPEKTROSKOPIA MIKRO-RAMANOWSKA W OCENIE POWŁOK HA NA TI

ALICJA STRZAŁA\*, MARTA MARSZAŁEK

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ IM. HENRYKA NIEWODNICZAŃSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, KRAKÓW, POLSKA

\* E-MAIL: ALICJA.STRZAŁA@IFJ.EDU.PL

## Streszczenie

*W celu otrzymania powłok biozgodnych i bioaktywnych na substratach z czystego tytanu formowano hydroksyapatyt  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA) przy użyciu metody hydrotermalnej. Przygotowanie tego rodzaju powłok na metalicznych endoprotezach stawu biodrowego powinno poprawić osseointegrację implantu. Aby przyspieszyć strącanie HA na powierzchni metalu oraz w celu zwiększenia jednorodności powłoki zastosowano różne metody przygotowania podłoża: trawienie w kwasie (HF), zanurzenie w zasadzie (NaOH), zanurzenie w roztworze o składzie zbliżonym do osocza krwi ludzkiej (roztworze Hanka) oraz implantację jonową. Otrzymane powłoki zostały zbadane przy użyciu spektroskopii mikro-ramanowskiej, która jest skuteczną metodą określania składu chemicznego cienkich warstw.*

**Słowa kluczowe:** powłoka HA, spektroskopia mikro-ramanowska

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 26-29]

## Wprowadzenie

Hydroksyapatyt  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA) jest mineralnym składnikiem kości, a jego biozgodność i bioaktywność są doskonałe [1]. Z tego powodu syntetyczny HA znajduje liczne zastosowania biomedyczne, zarówno w ortopedii jak i stomatologii [2]. Z powodu słabych właściwości mechanicznych [3] HA nie może być używany jako samodzielny materiał na implanty. Dlatego używa się go jako materiał na powłoki na implantach metalicznych, takich jak tytan i jego stopy. Tytan jest jednym z najszerzej stosowanych materiałów do produkcji endoprotez z powodu swojej wysokiej biozgodności [4], ale Ti wykazuje stosunkowo słabą osseointegrację w porównaniu do materiałów opartych na fosforanach wapnia.

Istnieją różne metody formowania HA na powierzchni Ti i jego stopów. Stosunkowo tanią i prostą techniką jest metoda hydrotermalna [4-7]. Do otrzymania HA stosuje się różne roztwory, jednym z nich jest roztwór zawierający  $\text{EDTA}^{4-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  [5, 6], innym – roztwór Hanka [4] lub symulowany płyn ustrojowy (SBF) [7].

Spektroskopia ramanowska jest skutecznym i nieniszczącym narzędziem służącym do analizy składu cząsteczkowego badanej powierzchni, jak również do oceny podstawni jonowych. Nie wymaga ona żadnej specjalnej metody przygotowania próbek.

W niniejszej pracy przedstawiono dane uzyskane za pomocą spektroskopii Ramana próbek HA otrzymanych w różnych warunkach na tytanie i przedyskutowano różnice pomiędzy widmami.

# MICRO-RAMAN SPECTROSCOPY IN ASSESSMENT OF HA COATING ON Ti

ALICJA STRZAŁA\*, MARTA MARSZAŁEK

THE HENRYK NIEWODNICZAŃSKI INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES, KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: ALICJA.STRZAŁA@IFJ.EDU.PL

## Abstract

*In order to obtain biocompatible and bioactive coating, hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA) was formed using hydrothermal method on pure titanium substrates. Preparation of such type of coating on metallic hip prosthesis should enhance implant's osseointegration. To accelerate HA precipitation on metal surface and to increase the homogeneity of the coating different surface preparation methods were used: acid etching (HF), alkali treatment (NaOH), immersion in salt solution which composition is near to the composition of human blood plasma (Hank's solution) and ion implantation. The deposited coatings were investigated by Raman microspectroscopy which is a powerful method to determine chemical composition of thin coatings.*

**Keywords:** hydroxyapatite coating, micro-Raman spectroscopy

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 26-29]

## Introduction

Hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HA) is the mineral bone component, and its biocompatibility and bioactivity is excellent [1]. That is why synthetic HA has numerous biomedical applications, both orthopaedic and dental [2]. Due to its poor mechanical properties [3] HA cannot be used as a bulk implant material. HA is therefore used as a coating material on metallic implants, such as titanium and its alloys. Titanium is one of the most widely used materials in endoprosthesis fabrication because of its high biocompatibility [4], but its osseointegration is relatively poor, as compared to calcium phosphate materials.

There are different methods used for forming HA coatings on Ti and its alloys. The relatively cheap and simple technique is hydrothermal method [4-7]. Different solutions are used to obtain HA coating, one of them is a solution containing  $\text{EDTA}^{4-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  [5,6], another – Hank's solution [4] or simulated body fluid (SBF) [7].

Raman spectroscopy is a powerful and non-destructive tool for analysis of molecular composition of investigated surface as well as for studying ionic substitutions. It does not require any special sample preparation method.

In this study we are presenting our Raman data of hydroxyapatite samples obtained on titanium in different conditions and discussing differences between the spectra.

## Materiały i metody

Próbki HA przygotowano na dostępnych na rynku płytach czystego tytanu (99,9%, Koch-Light Laboratory Ltd, Colnbrook). Substraty odtłuszczono w kąpeli ultradźwiękowej przez 10 min w każdym z następujących rozpuszczalników: heksanie, acetonie i etanolu [8]. Po użyciu każdego z rozpuszczalników płytki były płukane wodą dejonizowaną i suszone na powietrzu. Następnie część próbek umieszczono w autoklawie zawierającym 50 cm<sup>3</sup> roztworu zawierającego jony Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i EDTA (grupa HA\_EDTA). Na drugiej partii próbek HA syntetyzowano z roztworu Hanka. W tej grupie tytanowy substrat przygotowywano na różne sposoby przedstawione w TABELI 1.

**TABELA 1. Wykaz sposobów przygotowania próbek Ti.**  
**TABLE 1. Specification of Ti surface preparation methods.**

Sposób przygotowania próbek / Sample preparation method	
Grupa A / Group A	Brak dalszej modyfikacji / Without further modifications
Grupa B / Group B	Trawienie w 1M NaOH / Etching in 1M NaOH
Grupa C / Group C	Trawienie w kwasie HF / Acid etching in HF
Grupa D / Group D	Zanurzenie w HBSS na 96 h / Immersion in HBSS for 96 h
Grupa E / Group E	Implantacja jonami Ca (E1) / Implantation with Ca ions (E1) Implantacja jonami P (E2) / Implantation with P ions (E2)

Syntezę hydrotermalną przeprowadzano w autoklawach laboratoryjnych umożliwiającym prowadzenie reakcji w temperaturach do 300°C i pod ciśnieniem do 20 MPa, niewymagających użycia dużej objętości roztworów (Autoklaw Laboratoryjny Model II, Roth, DE). Syntezę prowadzono w 50 cm<sup>3</sup> roztworu zawierającego Ca-EDTA albo 100 cm<sup>3</sup> roztworu Hanka w temperaturze 200°C. Czas reakcji zmieniał się w zakresie od 5 h do 11 h 10 min.

Referencyjny HA został zakupiony od firmy Merck, DE. Wszystkie użyte reagenty były czystości cz.d.a. i nie były poddawane dalszemu oczyszczaniu (POCh, PL).

Osadzone próbki były analizowane przy użyciu konfokalnego mikrospektroskopu Ramana o wysokiej rozdzielczości Nicolet Almega XR wyposażonego w laser o długości fali 532 nm i zakresie spektralnym od 100 do 4000 cm<sup>-1</sup>.

## Wyniki i dyskusja

Referencyjne widma HA zostały przedstawione na RYS 1. Widoczne są cztery piki powiązane z drganiami wiązań PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, pik przy 963 cm<sup>-1</sup> pochodzący od drgań ν<sub>1</sub> jest najsilniejszy, pozostałe piki (433, 588 i 1049 cm<sup>-1</sup>) są dużo słabsze. Łatwy do zaobserwowania jest również pik przy 3574 cm<sup>-1</sup> odpowiadający wiązaniom OH<sup>-</sup>.

Widmo ramanowskie powłoki HA otrzymanej z roztworu zawierającego EDTA-Ca<sup>2+</sup> oraz PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> pokazano na RYS. 2. Poza pikami charakterystycznymi dla czystego HA występują również piki przy 1330 i 1573 cm<sup>-1</sup>. Te piki są typowe dla drgań C-C w graficie (odpowiednio piki D i G). Może to być wynikiem termicznego rozkładu EDTA opisanego za pomocą reakcji:



W roztworach Ca-EDTA powłoki formowały się stosunkowo szybko, ale zawsze były zanieczyszczone węglem i wykazywały słabą adhezję do podłoża. Ponieważ spontanicznie łuszczyły się podczas przechowywania, nie poddano ich dalszym badaniom. R.Z. LeGeros et al. [9,10] wykazali, że dodatek węgla w powłokach HA powoduje niekorzystne zmiany w krystaliczności i rozpuszczalności HA, ponieważ wraz ze wzrostem stężenia węgla w warstwach HA maleje rozmiar krystalitów oraz zwiększa się szybkość uwalniania jonów Ca.

## Materials and methods

HA samples were prepared on commercially pure titanium plates (99.9%, Koch-Light Laboratory Ltd, Colnbrook). Substrates were degreased in ultrasonic bath for 10 minutes in each of the following solvents: hexane, acetone and ethanol [8]. After each solvent use the sample were rinsed with deionised water and dried in ambient air. Then one part of the samples were placed in an autoclave containing 50 cm<sup>3</sup> of solution containing Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and EDTA ions (HA\_EDTA group). HA on the other part of sample was synthesised from Hank's solution. In this group titanium substrate before HA synthesis was prepared in different ways. Details of the pre-treatment are given in TABLE 1.

Hydrothermal synthesis was performed in laboratory autoclaves that enable reactions at temperature up to 300°C and under pressure up to 20 MPa, without using large volume of solutions (Laboratory Autoclave Model II, Roth, GE). The synthesis was carried on in 50 cm<sup>3</sup> Ca-EDTA solution or 100 cm<sup>3</sup> of Hank's solution at the temperature of 200°C and the reaction time varied from 5 h to 11 h 10 min.

The reference HA was purchased from Merck, DE. All reagents of analytical grade were used without further purification (POCh, PL).

The deposited samples were analysed using high resolution confocal Raman microspectrometry Nicolet Almega XR equipped with laser of wavelength of 532 nm in spectral range from 100 to 4000 cm<sup>-1</sup>.

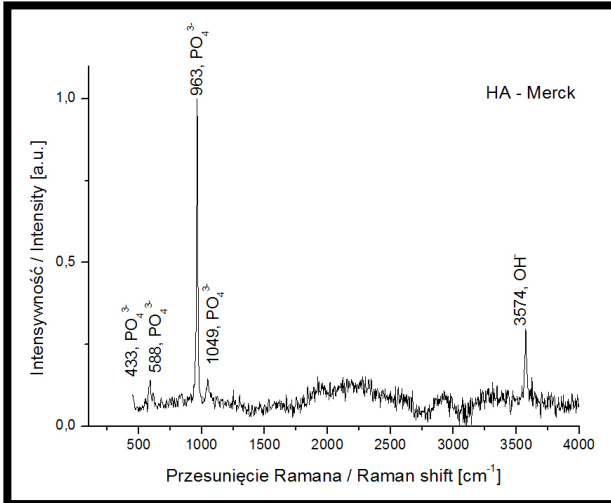
## Results and discussion

Raman spectrum of reference HA is shown in FIG. 1. There are four peaks related to vibrations of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> bonds, peak at 963 cm<sup>-1</sup> deriving from ν<sub>1</sub> vibrations is the strongest, other peaks (at 433, 588 and 1049 cm<sup>-1</sup>) are much weaker. Also peak at 3574 cm<sup>-1</sup> related to OH<sup>-</sup> bonds can be clearly seen.

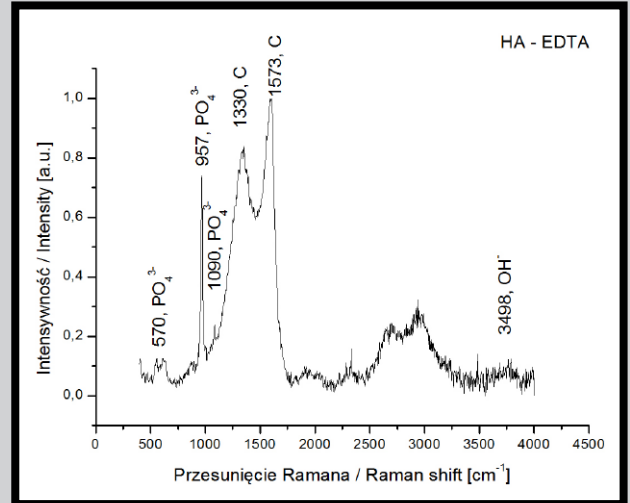
Raman spectrum of HA coatings obtained from solution containing EDTA-Ca<sup>2+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> is shown in FIG. 2. Besides the peaks characteristic for commercially pure HA, peaks at 1330 and 1573 cm<sup>-1</sup> are also present. These peaks are typical of C-C vibrations in graphite (D and G peaks, respectively). They may result from thermal decomposition of EDTA which can be described by the reaction:



In the Ca-EDTA solutions the coatings were formed relatively fast but they were always carbon-contaminated and showed very poor adhesion. Since they spontaneously peeled off during the storage, they were not examined further. R.Z. LeGeros et al. [9,10] showed that the addition of carbon to the HA coatings causes disadvantageous changes in HA crystallinity and solubility because the higher the carbon concentration in the HA coating is, the smaller the crystallites and the higher the Ca release rate.



**RYS. 1. Widmo ramanowskie dostępnego na rynku HA.**  
**FIG. 1. Raman spectrum of the commercially available HA.**



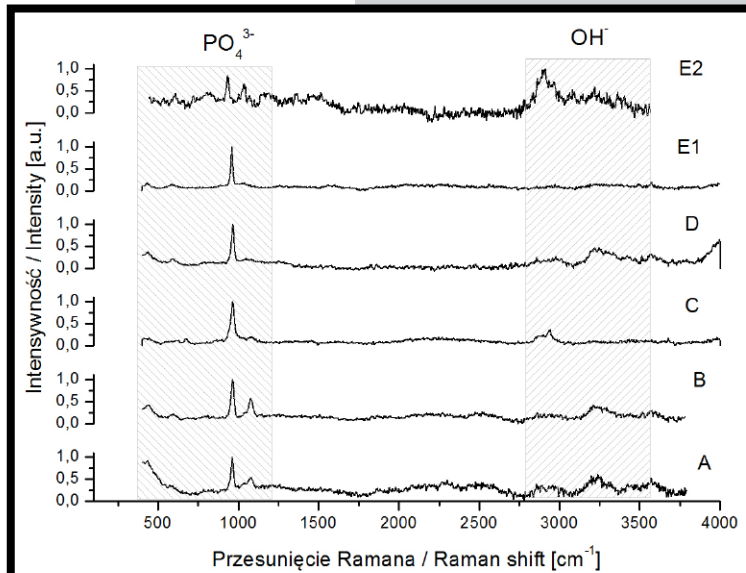
**RYS. 2. Widmo ramanowskie HA otrzymanego z roztworu zawierającego jony Ca, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> i EDTA.**  
**FIG. 2. Raman spectrum of HA obtained from the solution containing jony Ca, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> i EDTA ions.**

Widma ramanowskie powłok HA otrzymanych z roztworu Hanka przedstawiono na RYS. 3. Dla HA strąconego na niemodyfikowanym Ti (RYS. 3A) obecne są tylko piki typowe dla HA. Choć powłoka była złożona z czystego HA, osadzanie warstwy ograniczone było do kilku wysp. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy powłokami HA otrzymanymi na tytanie trawionym w 5M NaOH przez 24 h w temperaturze pokojowej (RYS. 3B) oraz w mieszaninie 4% HF i 4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RYS. 3C), a także na Ti implantowanym jonami Ca (RYS. 3E1) a czystym HA. Piki pojawiają się w tych samych miejscach, a stosunki pomiędzy intensywnościami pików również są zbliżone. Pasma typowe dla PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> v<sub>2</sub> zarejestrowane dla HA strąconego na Ti po zanurzeniu w HBSS (RYS. 3D) jest przesunięte o ok.

15 cm<sup>-1</sup>, co jednak w dalszym ciągu mieści się w zakresie widma dla drgań v<sub>2</sub> wiązań PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Dla powłok HA otrzymanych na Ti implantowanym 5x10<sup>16</sup> jonów/cm<sup>2</sup> jonami fosforu (RYS. 3E2) zaobserwowano mniej intensywny pik przy 960 cm<sup>-1</sup> (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> v<sub>1</sub>). Intensywność tego pików zależy od krystaliczności HA [11]. Intensywność tego pików maleje wraz ze zmniejszeniem rozmiarów krystalitów. To pasmo ramanowskie jest wrażliwe na temperaturę [12], co potwierdza fakt, że niestechiometryczny HA rozkłada się w temperaturze ok. 1000°C.

Intensywność pasm fosforanowych pochodzących od modów v<sub>2</sub> i v<sub>3</sub> oraz pasmo drgań rozciągających OH<sup>-</sup> silnie zależą od orientacji krystalitów względem kierunku padającej wiązki laserowej [13].

W TABELI 2 zestawiono główne linie ramanowskie dla próbek HA.



**RYS. 3. Widma ramanowskie HA otrzymanego na Ti bez dodatkowej obróbki (A), po trawieniu w NaOH (B), po trawieniu w HF (C), po moczeniu w HBSS (D), po implantacji jonami Ca (E1) i P (E2).**

**FIG. 3. Raman spectra of HA obtained on non-modified Ti (A), Ti after etching in NaOH (B), etching in HF (C), soaking in HBSS (D), implantation with Ca (E1) or P (E2) ions.**

Raman spectra of HA coatings obtained from Hank's solution are shown in FIG. 3. For HA precipitated on non-modified titanium (FIG. 3A) only peaks typical for HA are present. Although the coating was pure HA the precipitation was limited to several splats. There are no differences between HA coating obtained on titanium etched in 5M NaOH for 24 h at room temperature (FIG. 3B) or in mixture of 4% HF and 4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FIG. 3C) or on Ti after implantation of Ca ions (FIG. 3E1) and pure HA. The peaks occur in the same places and relations between peak intensities are also similar. Band typical for PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

v<sub>2</sub> recorded for HA precipitated on Ti after soaking in HBSS (FIG. 3D) is shifted about 15 cm<sup>-1</sup>, which still fits spectral range for v<sub>2</sub> vibrations of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> bonds. For HA coatings obtained on titanium implanted with 5x10<sup>16</sup> ions/cm<sup>2</sup> of phosphorus ions (FIG. 3E2) less intense peak at 960 cm<sup>-1</sup> (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> v<sub>1</sub>) is seen. The intensity of this peak depends on HA crystallinity [11]. The lower the crystal size is the weaker is the peak. This Raman band is also reported to be temperature sensitive [12], which is supported by the fact that non-stoichiometric HA decomposes at about 1000°C.

Intensity of phosphate bands due to v<sub>2</sub> and v<sub>3</sub> modes as well as OH<sup>-</sup> stretch band strongly depend on crystal orientation regarding laser beam direction [13].

In TABLE 2 the main Raman lines from the HA samples are listed.



**TABELA 2. Linie ramanowskie obserwowane dla próbek HA (oznaczenia jak w Tabeli 1).**  
**TABLE 2. Raman lines observed for the HA samples (symbols as in Table 1).**

Wibracja / Vibration	Czysty HA / Pure HA Merck	HA-EDTA	A	B	C	D	E1	E2
$\text{PO}_4^{3-} \nu_2$	433	--	423	442	433	448	438	--
$\text{PO}_4^{3-} \nu_4$	588	570	579	589	589	593	583	582
$\text{PO}_4^{3-} \nu_1$	963	957	962	962	963	964	963	964
$\text{PO}_4^{3-} \nu_3$	1049	1090	1080	1079	1050	1049	1040	1070
$\text{OH}^- \nu_1$	3574	3498	3588	3548	3529	3601	3508	3487
C-C D	--	1330	--	--	--	--	--	--
C-C G	--	1573	--	--	--	--	--	--

## Wnioski

Przedstawiono widma ramanowskie powłok HA na Ti przygotowanych na różne sposoby. Spektroskopia mikro-ramanowska potwierdziła, że otrzymane powłoki były zbudowane z hydroksyapatytu. Jednorodność warstw oceniana na podstawie obrazu z mikroskopu optycznego różniła się w zależności od sposobu przygotowania próbki, ale widma ramanowskie powłok były bardzo podobne. Intensywność niektórych pasm fosforanowych oraz pasma OH zależy od orientacji kryształów HA względem padającej wiązki laserowej.

## Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki.

## Conclusions

We presented Raman spectra of HA coating on Ti prepared in different ways. Micro-Raman spectroscopy verified the obtained coatings as hydroxyapatite. Coating uniformity assessed by optical microscopy varied depending on the sample preparation method but Raman spectra of the coatings are very similar. Intensity of some phosphate bands and OH band depends on HA crystal orientation regarding laser beam direction.

## Acknowledgements

The project was partially supported by the grant of National Science Centre.

## Piśmiennictwo

- [1] Zhang Y., Fu T., Han Y., Wang Q., Zhao Y., Xu K.: In vitro and in vivo tests of hydrothermally synthesised hydroxyapatite coating. *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 57-61.
- [2] Chang C., Huang J., Xia J., Ding C.: Study on crystallization kinetics of plasma sprayed hydroxyapatite coating. *Ceramics International* 25 (1999) 479-483.
- [3] Sato M., Slamovich E., Webster T.: Enhanced osteoblast adhesion on hydrothermally treated hydroxyapatite/titania/poly(lactide-co-glycolide) sol-gel titanium coatings. *Biomaterials* 26 (2005) 1349-1357.
- [4] Hamada K., Kon M., Hanawa T., Yokoyama K., Miyamoto Y., Asaoka K.: Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. *Biomaterials* 23 (2002) 2265-2272.
- [5] Fujishiro Y., Nishino M., Sugimori A., Okuwaki A., Sato T.: Coating of hydroxyapatite on various substrates via hydrothermal reactions of  $\text{Ca}(\text{edta})^{2-}$  and phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12 (2001) 333-337.
- [6] Fujishiro Y., Fujimoto A., Sato T., Okuwaki A.: Coating of hydroxyapatite on titanium plates using thermal dissociation of calcium-EDTA chelate complex in phosphate solutions under hydrothermal conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 173 (1995) 119-127.

## References

- [7] Calixto de Andrade M., Tavares Filgueiras M., Ogasawara T.: Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. *Journal of the European Ceramic Society* 22 (2002) 505-510.
- [8] Raikar G., Geregory J., Ong J., Lucas L., Lemons J., Kawakura D., Nakamura M.: Surface characterization of titanium implants. *Journal of Vacuum Science and Technology A* 13 (1995) 2633-2637.
- [9] LeGeros R.Z., Trautz O.R., LeGeros J.P., Klein E., Shirra W.P.: Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology. *Science* 155 (1967) 1409-1411.
- [10] Yao F., LeGeros J.P., LeGeros R.Z.: Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 2169-2177.
- [11] Li H., Ng B.S., Khor K.A., Cheang P., Clyne T.W.: Raman spectroscopy determination of phases within thermal sprayed Hydroxyapatite splats and subsequent in vitro dissolution examination. *Acta Materialia* 52 (2004) 445-453.
- [12] Aminzadeh A.: Fluorescence bands in the FT-Raman spectra of some calcium minerals. *Spectrochimica Acta Part A* 53 (1997) 693-697.
- [13] Tsuda H., Arends J.: Orientational micro-Raman spectroscopy on Hydroxyapatite single crystals and human enamel crystallites. *Journal of Dental Research* 73 (1994) 1703-1710.

# SYNTEZA BIODEGRADOWALNYCH ANTYBAKTERYJNYCH POLIURETANÓW

MARCIN SOBCZAK<sup>1\*</sup>, EWA OŁĘDZKA<sup>1</sup>, CEZARY DĘBEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ, UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA, POLSKA

<sup>2</sup> INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I BARWNIKÓW, UL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUŃ, POLSKA

\* E-MAIL: MARCIN.SOBCZAK@WUM.EDU.PL, MARCIN.SOBCZAK@WP.PL

## Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad syntezą nowych biodegradowalnych antybakteryjnych poliuretanów (PURs). PURs zostały otrzymane w reakcji alifatycznych oligoestrów, ciprofloksacyny i diizocyjanianu 1,6-heksametylenu. Polimery zostały scharakteryzowane za pomocą technik FT-IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR. Przeprowadzono badania uwalniania ciprofloksacyny z otrzymanych koniugatów poliuretanowych w warunkach *in vitro*. Badania biodegradacji zostały przeprowadzone w roztworze buforowym o pH 7 w obecności Cholesterol esterase. Wstępne wyniki sugerują, że nowe biodegradowalne antybakteryjne poliuretany rokują pozytywnie na zastosowanie ich jako materiały implantacyjne.

**Słowa kluczowe:** polimery biodegradowalne, koniugaty polimerowe, ciprofloksacyna, poliuretany biomedyczne

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 30-34]

## Wstęp

Ciprofloksacyna (CIP) jest syntetycznym antybiotykiem należącym do grupy fluorochinolonów. Jest chinolonem trzeciej generacji o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego, łatwo przenikającym przez większość tkanek. CIP niszczy bakterie hamując syntezę DNA poprzez wpływ na enzym komórkowy. Rozwój technologii systemów kontrolowanego uwalniania CIP jest bardzo interesujący ze względu na profilaktykę po-chirurgiczną, prewencję i terapię infekcji [1].

Alifatyczne poliestry i poliuretany są szeroko stosowane w systemach kontrolowanego uwalniania leków, co jest związane z ich biokompatybilnością i biogodnością. Technologia kontrolowanego uwalniania leków jest jednym z najszybciej rozwijających się obszarów farmacji stosowanej. Koniugaty wielkocząsteczkowe i systemy terapeutyczne charakteryzują się unikalną farmakokinetyką i farmakologiczną skutecznością [2-4].

Ostatnio, w naszym laboratorium otrzymano szereg nowych poliesterowych koniugatów fluorochinolonów. Liniowe, trój-, cztero- i sześcioramienne poli(ε-kaprolaktony), polilaktidy i kopolimery ε-kaprolaktonu i laktidu zostały otrzymane w reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia cyklicznych estrów w obecności inicjatorów (glicerolu, pentaerytrytu, dipentaerytrytu, glikolu polioksyetylenowego) oraz oktanianu cyny jako katalizatora [5-7].

Prezentowana praca dotyczy badań nowych biodegradowalnych antybakteryjnych poliuretanów (PURs). PURs zostały otrzymane w reakcji poliaddycji polilaktidu, kopolimerów *rac*-laktidu i glikolidu, ciprofloksacyny i diizocyjanianu 1,6-heksametylenu.

# SYNTHESIS OF BIODEGRADABLE ANTIMICROBIAL POLYURETHANES

MARCIN SOBCZAK<sup>1\*</sup>, EWA OŁĘDZKA<sup>1</sup>, CEZARY DĘBEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY, DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY, UL. BANACHA 1, 02-097 WARSAW, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE FOR ENGINEERING OF POLYMER MATERIALS AND DYES, UL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 55, 87-100 TORUŃ, POLAND

\* E-MAIL: MARCIN.SOBCZAK@WUM.EDU.PL, MARCIN.SOBCZAK@WP.PL

## Abstract

A series of novel biodegradable antimicrobial polyurethanes (PURs) were synthesized by the reactions between aliphatic oligoesters, ciprofloxacin and 1,6-hexane diisocyanate. The obtained polymers were characterized by FT-IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR techniques. The *in vitro* release of ciprofloxacin from the received polyurethane conjugates was investigated. The biodegradation studies were carried out by the incubating of PURs with Cholesterol esterase in the buffer solution at pH 7. The preliminary results suggest that these novel antimicrobial polyurethanes are promising for application as the implantation materials.

**Keywords:** biodegradable polymers, macromolecular conjugates, ciprofloxacin, biomedical polyurethanes

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 30-34]

## Introduction

Ciprofloxacin (CIP) is a synthetic antibiotic of the fluoroquinolone drug class. It is a third-generation fluoroquinolone with a broad spectrum of antibacterial activity and a good penetration in most tissues. CIP kills bacteria by interfering with the enzymes that cause DNA to rewind after being copied, which stops synthesis of DNA and of protein. The development of a controlled release system for CIP is very interesting for post-surgery prophylaxis, prevention and treatment of infections [1].

Aliphatic polyesters and polyurethanes are widely used in drug release systems, due to its biocompatibility and biodegradation. Controlled drug delivery technology represents one of the most rapidly advancing areas of pharmacy. The macromolecular conjugates and therapeutic systems exhibit unique pharmacokinetics and pharmacological efficacy [2-4].

Recently, the polyester conjugates of fluoroquinolones were widely studied in our laboratory. Two-, three, four and six-arm, star-shaped poly(ε-caprolactone), poly(D,L-lactide), and poly(ε-caprolactone-lactide) were synthesized via a ring-opening polymerization of cyclic esters in the presence of glycerol, pentaerythritol, dipentaerythritol and poly(ethylene glycol) as initiators and stannous octoate as a catalyst [5-7].

The present work describes a study on novel biodegradable antimicrobial polyurethanes (PURs). PURs were obtained in the polyaddition reactions between polylactide, *rac*-lactide or glycolide copolymers, ciprofloxacin and 1,6-hexane diisocyanate.

## Materiały i metody

### Materiały

1,4-dioksan-2,5-dion (99%, glikolid, GLI), 3,6-dimetylo-1,4-dioksan-2,5-dion (98%, *rac*-lactyd, *rac*-LA), glikol dietylenowy (98%, DEG), 2-etyloheksanian cyny(II) (95%, oktanian cyny, SnOct<sub>2</sub>), diizocyjanian 1,6-heksametylenu (99%, HDI) zostały nabyte w Aldrich. Przed zastosowaniem, wszystkie substraty suszono przez 2 godz. w temp. pokojowej, pod zmniejszonym ciśnieniem. Cholesterol esterase (99%, ChE, Aldrich), dimetylosulfotlenek (99%, DMSO, Aldrich), dichlorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, POCh) i methanol (MeOH, POCh) były używane bez oczyszczania.

### Synteza oligoestrów

Wszystkie reakcje prowadzono w toluenie. Monomery, DEG oraz SnOct<sub>2</sub> wprowadzono do ampułek o pojemności 10 ml w atmosferze suchego argonu. Ampułki zostały umieszczone w łaźni olejowej w temperaturze 80°C na czas 24 godz. Po zakończeniu reakcji, produkt był rozpuszczany w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, wytrączony z zimnego MeOH z dodatkiem roztworu kwasu solnego (w celu odmycia pozostałości katalizatora) i suszony pod zmniejszonym ciśnieniem przez 72 godz.

### Synteza poliuretanowych koniugatów ciprofloksacyny

Poliuretanowe koniugaty CIP były syntezowane metodą dwuetapową. Oligoestry mieszano z HDI w stosunku molarowym 1:2 i całość rozpuszczano w DMSO. Roztwór ten umieszczono w trój szyjnej kolbie wyposażonej w mieszadło magnetyczne i termometr. Później, SnOct<sub>2</sub> został dodany do kolby i całość mieszano przez 4 godz. w temp. 70°C. Następnie, roztwór CIP w DMSO był stopniowo dodawany do reaktora zawierającego prepolimer (w stosunku molarowym CIP do prepolimeru 1:1). Po przeprowadzeniu powyższych czynności, mieszanina reakcyjna była intensywnie mieszana przez 4 godziny w temp. 70°C. Następnie, dodano wodę destylowaną zakwaszoną 5-procentowym kwasem solnym. Operację wytrącania produktu powtarzano trzykrotnie. Koniugaty poliuretanowe, wydzielone z roztworu jako faza organiczna, suszono przez 2 tygodnie, pod zmniejszonym ciśnieniem, w temp. pokojowej.

### Metody badań

Widma <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR oligoestrów były wykonywane przy użyciu spektrometru a Varian 300 MHz (w CDCl<sub>3</sub> jako rozpuszczalniku). Widma NMR koniugatów poliuretanowych były rejestrowane po rozpuszczeniu próbek w DMSO-d<sub>6</sub>. Próbki polimerów do analizy FT-IR zostały przygotowane w formie tabletek KBr (Perkin-Elmer spectrometer). Masa cząsteczkowa i rozkład masy cząsteczkowej zmierzono w temperaturze 308K przy użyciu chromatografu żelowego a Lab Alliance wyposażonego w kolumny Jordi Gel DVB Mixed Bed (250 mm x 10 mm), z detekcją współczynnika załamania światła, stosując THF lub chloroform jako eluenty (1 mL/min). Zastosowano kalibrację przy użyciu standardu polistyrenowego. Lepkość koniugatów poliuretanowych została zmierzona w dimetyloformamidzie (w temp. 30°C) za pomocą viskozymetru Stabinger Viscometer SVM 3000. Liczba hydroksylowa otrzymanych poliesterów oznaczana została zgodnie z powszechnie stosowaną metodą, wykorzystując jako reagent bezwodnik kwasu octowego. Ilość uwolnionej CIP oznaczano za pomocą spektrometrii UV-Vis (UV-1202 Shimadzu) przy maksimum absorpcji dla wolnego leku w roztworze buforowym ( $\lambda_{\max}$  = 277 nm) stosując 1 centymetrową kuetę kwarcową.

## Materials and methods

### Materials

1,4-Dioxane-2,5-dione (99%, glycolide, GLI), 3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione (98%, *rac*-lactide, *rac*-LA), diethylene glycol (98%, DEG), tin (II) 2-ethylhexanoate (95%, stannous octoate, SnOct<sub>2</sub>), 1,6-hexane diisocyanate (99%, HDI) were purchased from Aldrich. Before use, all substrates were dried at the room temperature under vacuum for 2 h. Cholesterol esterase (99%, ChE, Aldrich), dimethyl sulfoxide (99%, DMSO, Aldrich), dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, POCh) and methanol (MeOH, POCh) were used as received.

### Synthesis of oligoesters

All reactions were carried out in toluene. Monomers, DEG and SnOct<sub>2</sub> were placed into 10-ml ampoules under an inert dry argon atmosphere. The ampoules were placed in an oil bath maintained at 80°C for 24 h. When the reaction time was completed, the cold reaction product was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, precipitated from cold MeOH with diluted hydrochloric acid (to wash out the catalyst residue) and dried under vacuum for 72 h.

### Synthesis of polyurethane conjugates of ciprofloxacin

Polyurethane conjugates of CIP were synthesized using the two-step methods. Oligoesters were mixed with HDI in a molar ratio 1:2 and dissolved in DMSO. This solution was placed in a three-necked flask equipped with a stirrer and a thermometer. Afterwards, a SnOct<sub>2</sub> was added to the flask and the reaction mixture was left with stirring for 4 hours at 70°C. Next, the solution of CIP in DMSO was added dropwise into the reactor with the prepolymer under vigorous stirring (in the molar ratio of CIP to prepolymer equal 1:1). After the addition procedure was completed, the reaction mixture was left with stirring for additional 4 hours at 70°C. Then, it was washed with diluted hydrochloric acid (5% aqueous solution) and water. The precipitation was repeated three times. The polyurethane conjugates isolated from the solution's organic phase were kept under vacuum at room temperature for two week.

### Measurements

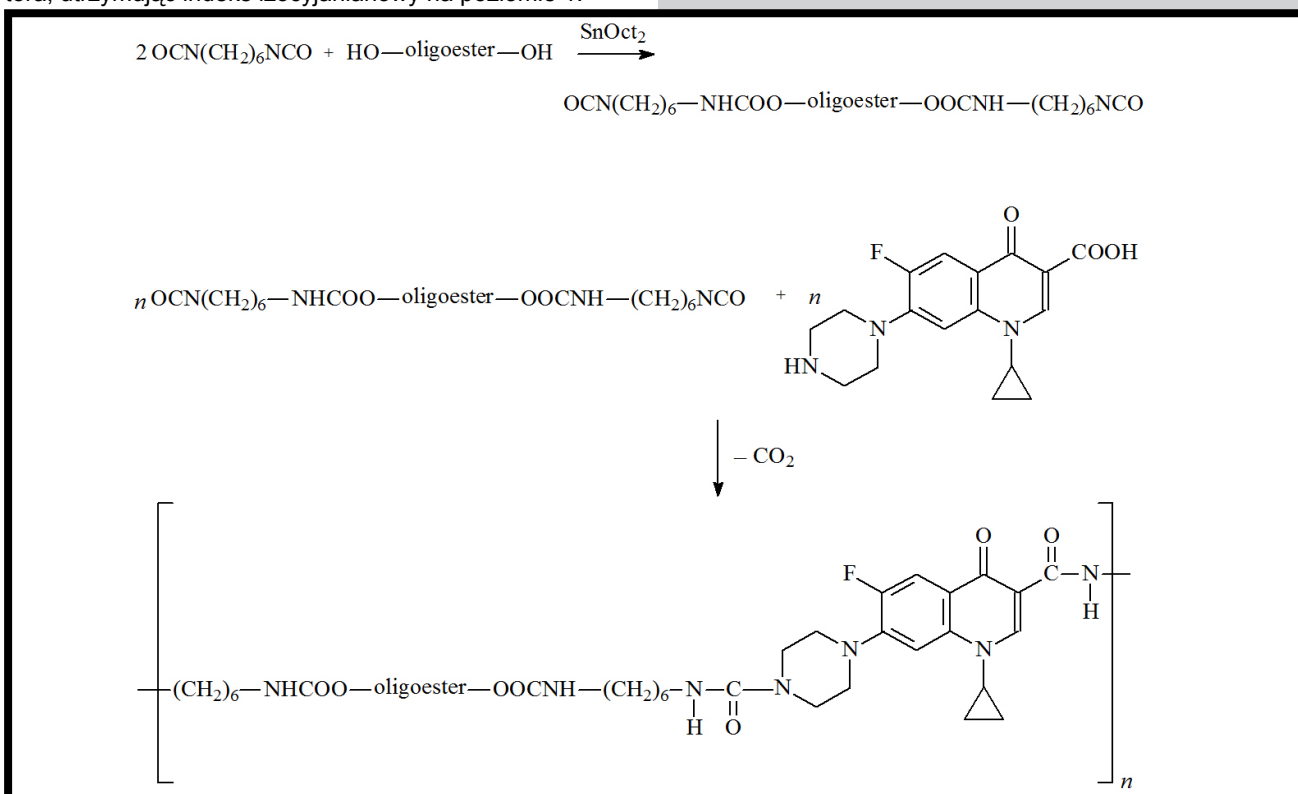
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of oligoesters were obtained by use of a Varian 300 MHz spectrometer using CDCl<sub>3</sub> as solvent. The NMR spectra of polyurethane conjugates were recorded in DMSO-d<sub>6</sub>. The FTIR spectra of polymers were measured from KBr pellets (Perkin-Elmer spectrometer). Molecular mass values and molecular mass distributions of oligoesters were determined at 308 K on a Lab Alliance gel permeation chromatograph equipped with Jordi Gel DVB Mixed Bed (250 mm x 10 mm) columns and a refractive detector, using THF or chloroform as eluent (1 mL/min). The molecular mass scale was calibrated with polystyrene standards. Polyurethane conjugates viscosity was measured in *N,N*-dimethylformamide (at 30°C) on Stabinger Viscometer SVM 3000. The hydroxyl number of the obtained oligoesters was determined according to the conventional method, based on the reaction with acetic acetate. The amount of released CIP was determined by a UV-Vis spectrophotometry (UV-1202 Shimadzu) at the adsorption maximum of the free drug in aqueous buffered solutions ( $\lambda_{\max}$  = 277 nm) using a 1 cm quartz cell.

## Uwalnianie ciprofloksacyny z koniugatów poliuretanowych

Suchy polimer (1 g) i ChE (20 mg) wprowadzono do roztworu buforowego (150 ml, pH 7) w temp. 37°C. Zawartość kolby mieszano, próbka o pojemności 5 ml była pobierana w odpowiednich sekwencjach czasowych, a następnie do mieszaniny dodawano 5 ml świeżego roztworu buforowego. Ilość uwolnionego leku wyznaczano za pomocą spektrometru UV-Vis w oparciu o krzywą wzorcową przygotowaną w tych samych warunkach.

## Wyniki i dyskusja

Poliuretanowe koniugaty CIP (PUR-CONJs) zostały otrzymane w reakcji oligoestrów (OEs) (polylaktydu lub kopolimerów *rac*-LA i GLI) z diizocyjanianem 1,6-heksametyleny (HDI) i ciprofloksacyną (CIP). PUR-CONJs zostały zsyntezowane metodą dwuetapową (SCHEMAT 1). Reakcję polimeryzacji prowadzono w obecności SnOct<sub>2</sub> jako katalizatora, utrzymując indeks izocyjanianowy na poziomie 1.



SCHEMAT 1. Synteza poliuretanowych koniugatów ciprofloksacyny.  
SCHEME 1. The synthesis scheme of polyurethane conjugates of ciprofloxacin.

Serię OEs otrzymano w reakcji polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP) *rac*-LA i GLI w obecności SnOct<sub>2</sub> (TABELA 1). Struktura otrzymanych OEs została potwierdzona za pomocą technik <sup>13</sup>C-, <sup>1</sup>H-NMR i FT-IR (TABELA 2).

Stosunek molowy HDI : oligoester : CIP : SnOct<sub>2</sub> wynosił 2:1:1:0.1. Masę cząsteczkową i zawartość CIP w otrzymanych koniugatach podano w TABELI 3.

Wykonano wstępne badania uwalniania CIP z PUR-CONJs. Ilość uwolnionej CIP została oznaczona metodą UV-Vis przy maksimum absorpcji dla wolnego leku λ<sub>max</sub> = 277 nm. Stabilność hydrolytyczną otrzymanych PUR-CONJs badano w roztworze buforowym (pH 7) w obecności Cholesterol esterase (ChE). Profil uwalniania CIP z różnych PUR-CONJs w warunkach *in vitro* przedstawiono na RYS. 1.

## Ciprofloxacin released from polyurethane conjugates

Dried polymer (1 g) and ChE (20 mg) were poured into aqueous buffered solution (150 mL, pH 7) at 37°C. The mixture was stirred and a 5 mL sample was removed at selected intervals and 5 mL of buffer was replaced. The quantity of released drug was analyzed by means of UV-Vis spectrophotometer determined from the calibration curve obtained previously under the same conditions.

## Results and discussion

The polyurethane conjugates of CIP (PUR-CONJs) were obtained in the reactions of oligoesters (OEs) (polylactide or *rac*-LA and GLI copolymers) with 1,6-hexane diisocyanate (HDI) and ciprofloxacin (CIP). PUR-CONJs were synthesized in two-steps process (SCHEME 1). The polymerization reaction was conducted at the NCO/OH molar ratio of 1 in the presence of SnOct<sub>2</sub> as a catalyst.

A series of OEs were synthesized by a ring-opening polymerization (ROP) of *rac*-LA and GLI in the presence of SnOct<sub>2</sub> (TABLE 1). The chemical structure of the obtained OEs was confirmed by <sup>13</sup>C-, <sup>1</sup>H-NMR and FT-IR studies (TABLE 2).

The HDI : oligoester : CIP : SnOct<sub>2</sub> molar ratio was 2:1:1:0.1. The molecular weight and CIP content of the obtained PUR-CONJs are listed in TABLE 3.

The preliminary studies on the release of CIP from PUR-CONJs have been carried out. The amount of released CIP was determined by UV-Vis spectroscopy at the maximum absorption of the free drug λ<sub>max</sub> = 277 nm. The hydrolytic stability of the prepared PUR-CONJs was tested in the buffer solution (pH 7) in the presence of Cholesterol esterase (ChE). The *in vitro* release profiles of CIP from the different PUR-CONJs conjugates are shown in FIG. 1.

**TABELA 1. Charakterystyka oligoestrów (OEs).**  
**TABLE 1. Characterization of oligoesters (OEs).**

POE	$M_n^{GPC}$ [Da]	$PD^{GPC}$ [Da]	$M_n^{LOH}$ [Da]	$L_{LA}$ (% mol)
PLA-1	1600	1.2	1800	100
PLA-2	2800	1.3	2900	100
PLAGLI-1	2300	1.2	2200	81
PLAGLI-2	2200	1.2	2000	69

$M_n^{GPC}$  - liczbowa średnia masa cząsteczkowa oznaczona metodą GPC;  
 $PD^{GPC}$  - polidispersyjność ( $M_w/M_n$ ) oznaczona metodą GPC;  
 $M_n^{LOH}$  - liczbowa średnia masa cząsteczkowa obliczona na podstawie liczby hydroksylowej;  
 $L_{LA}$  - zawartość LA w łańcuchu kopolimeru, oznaczona za pomocą  $^1H$ -NMR,  
 $L_{LA} = (\text{intensywność sygnału } -OC(O)CH(CH_3)O- / \text{intensywność sygnału } -C(O)CH_2O-) \cdot 100$ ;  
 $M_n^{GPC}$  - number-average molecular weight determined by GPC;  
 $PD^{GPC}$  - polydispersity ( $M_w/M_n$ ) determined by GPC;  
 $M_n^{LOH}$  - number-average molecular weight calculated from hydroxyl number;  
 $L_{LA}$  - LA content in the copolymer chain, determined by  $^1H$ -NMR,  
 $L_{LA} = (\text{signal intensity of the } -OC(O)CH(CH_3)O- / \text{signal intensity of the } -C(O)CH_2O-) \cdot 100$ ;

**TABELA 2. Charakterystyczne sygnały  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR oraz pasma w podczerwieni dla otrzymanych OEs i PURs.**  
**TABLE 2.  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR structural assignments and main absorption bands of the obtained OEs and PURs.**

Polimer / Polymer	Przesunięcie chemiczne [ppm] (Jednostka strukturalna) / Pasma absorpcyjne Chemical shift [ppm] (Structural assignments) / Absorption bands
<i>Homopolimer rac-LA / rac-LA homopolymer</i>	$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , $\delta$ , ppm): 1.52 (-CH(CH <sub>3</sub> )C(O)O-), 4.41 (-CH(CH <sub>3</sub> )OH, grupa końcowa), 5.19 (-OCH(CH <sub>3</sub> )C(O)O-);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , $\delta$ , ppm): 17.3 (-OCH(CH <sub>3</sub> )C(O)O-), 21.1 (-CH(CH <sub>3</sub> )C(O)OH), 67.3 (-CH(CH <sub>3</sub> )OH, grupa końcowa), 69.2 (-OCH(CH <sub>3</sub> )C(O)O-), 169.8 (-C(O)O-);  FTIR (KBr, $cm^{-1}$ ): 2998 ( $\nu_{as}CH_3$ ), 2948 ( $\nu_{s}CH_3$ ), 2882 ( $\nu_{CH}$ ), 1761 ( $\nu_{C=O}$ ), 1452 ( $\delta_{as}CH_3$ );
<i>Kopolimer rac-LA i GLI / rac-LA and GLI copolymers</i>	$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , $\delta$ , ppm): 1.62 (-OCH(CH <sub>3</sub> )C(O)-) 4.40-4.20 (OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C(O)-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O-, -OCH(CH <sub>3</sub> )C(O)-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O-), 4.72 (-OCH(CH <sub>3</sub> )C(O)-OCH <sub>2</sub> C(O)-OCH <sub>2</sub> C(O)-), 4.82 (-OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C(O)-), 5.12 (-OCH(CH <sub>3</sub> )C(O)-);
<i>Koniugaty CIP-poliuretan / CIP-polyurethane conjugates</i>	$^1H$ NMR ( $DMSO-d_6$ , $\delta$ , ppm): 1.15–1.45 ((-O(O)CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-), (-O(O)CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-), 1.50–1.60 ((-CH <sub>3</sub> , CIP), (-CH(CH <sub>3</sub> ))), 2.85–3.10 ((-NH-CH <sub>2</sub> , CIP), (-O(O)CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-)), 3.17 (-CH <sub>2</sub> -N, CIP), 3.34 ((-CH <sub>3</sub> )CHNHC(O)-N(CIP)), 3.43 ((-CH <sub>3</sub> )CHNHC(O)-C(CIP)), 3.88 (-NHC(O)O(CH <sub>3</sub> )CH-), 4.33 (N-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CIP), 5.15–5.35 ((-CH(CH <sub>3</sub> )-), (-CH <sub>3</sub> )CHNHC(O)-N(CIP)), 6.60 (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-C(CIP)), 7.22, 7.94, 9.04 (-CH(Ar), CIP);  $^{13}C$ -NMR ( $DMSO-d_6$ , $\delta$ , ppm): 16.8 (-CH(CH <sub>3</sub> )), 22.5 (-O(O)CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-), 28.9 (-O(O)CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-), 40.9 (-O(O)CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-), 69.2 (-CH(CH <sub>3</sub> -), 169.80 (-C(O)O-), 173.5 (-O(O)CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(O)-) and 14.4, 45.6, 49.2, 50.9, 105.9, 106.9, 110.7, 137.7, 146.6, 148.8, 151.2, 154.6, 167.2, 176.8 (CIP fragment);

**TABELA 3. Synteza poliuretanowych koniugatów ciprofloksacyny.**  
**TABLE 3. Synthesis of polyurethane conjugates of ciprofloxacin.**

Kod / Code	Reagenty / Reagents	$\eta_{inh}^a$ (dL/g)	CIP <sup>b</sup> (mg CIP/g koniugatu) (mg CIP/g conjugate)
PUR-CONJ-1	HDI- PLA-1-CIP	0.88	28
PUR-CONJ-2	HDI- PLA-2-CIP	0.94	19
PUR-CONJ-3	HDI- PLAGLI-1-CIP	0.84	24
PUR-CONJ-4	HDI- PLAGLI-2-CIP	0.83	26

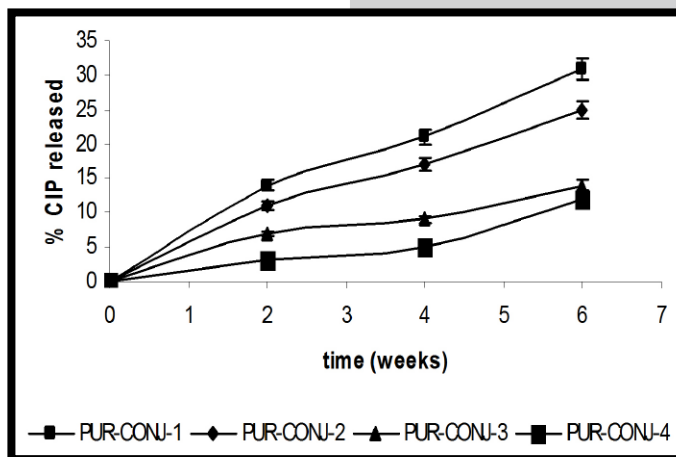
<sup>a</sup> zmierzone w temp. 30°C w DMF; <sup>b</sup> oznaczona metodą  $^1H$  NMR;  
<sup>a</sup> measured at 30°C in DMF; <sup>b</sup> determined by  $^1H$ -NMR;

Procent uwolnionej CIP po 6 tygodniach inkubowania próbek, wynosił około 31% dla PUR-CONJ-1, 25% dla PUR-CONJ-2, 14% dla PUR-CONJ-3 i 12% dla PUR-CONJ-4. Wyniki naszych badań wskazują, że szybkość uwalniania zależy od rodzaju komponentu poliesterowego zastosowanego w syntezie PUR-CONJs. Koniugaty wielkocząsteczkowe zawierające w łańcuchu fragmenty PLA znacznie szybciej ulegały hydrolytycznemu rozpadowi niż te zawierające fragmenty GLI. Szybkość uwalniania CIP w przypadku PUR-CONJ-4 zawierającym fragmenty PLAGLI-2 była mniejsza niż dla PUR-CONJ-3 zawierającego fragmenty PLAGLI-1. Prawdopodobnie, różnice szybkości uwalniania leku obserwowane dla PUR-CONJ-3 i PUR-CONJ-4 mogą być wynikiem różnej zawartości fragmentów GLI w łańcuchach kopolimerów stosowanych w syntezie koniugatów poliuretanowych.

Szybkość uwalniania leku zależała również od masy cząsteczkowej komponentu oligoesterowego. Ciprofloksacyna uwalniała się szybciej z PUR-CONJ-1 w porównaniu do PUR-CONJ-2. W syntezie pierwszego koniugatu użyto poliesteru charakteryzującego się mniejszą masą cząsteczkową. Liczbowo średnia masa cząsteczkowa wyznaczona metodą GPC wynosi 1600 i 2800 Da odpowiednio dla PLA-1 i PLA-2 (TABELA 1).

## Wnioski

W niniejszej pracy opisano syntezę i przedstawiono charakterystykę poliuretanowych koniugatów ciprofloksacyny. Wstępne wyniki badań przeprowadzone w warunkach *in vitro* wskazują, że szybkość uwalniania leku zależy głównie od struktury poliuretanów i może być efektywnie kontrolowana.



**RYS. 1. Uwalnianie ciprofloksacyny z koniugatów poliuretanowych.**  
**FIG. 1. Release of ciprofloxacin from the polyurethane conjugates.**

The percentage of the released CIP was about 31% from PUR-CONJ-1, 25% from PUR-CONJ-2, 14% from PUR-CONJ-3 and 12% from PUR-CONJ-4 after 6 weeks of incubation. The results of this study demonstrate that the hydrolytic release could be controlled by the polyester component used in the synthesis of PUR-CONJs. Macromolecular conjugates having PLA units in the chain were more rapidly hydrolyzed than those having GLI units. The rate of CIP release for PUR-CONJ-4 containing PLAGLI-2 unit appears similar but is slower than for PUR-CONJ-3 containing PLAGLI-1.

The difference in the release rates between these two polymers might be probably resulted from the different content of GLI unit in the copolymers which was used in the synthesis of polyurethane conjugates.

The release rate of CIP also depends on the molecular mass of the oligoester component. CIP was release faster from PUR-CONJ-1 than from PUR-CONJ-2 due to the lower molecular mass of PLA-1 in comparison to PLA-2, 1600 and 2800 Da respectively (TABLE 1).

## Conclusions

The systematic investigation on the synthesis and characterization of novel polyurethane conjugates of ciprofloxacin has been carried out. The preliminary results of *in vitro* studies indicated that the release rate of the drug depends mainly on the structure of polyurethane and could be effectively controlled.

## Piśmiennictwo

- [1] Zejc A., Gorczyca M.: *Chemia Leków*, PZWL, Warszawa 2002.
- [2] Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M.: Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews* 99 (1999) 3181-3198.
- [3] Hoste K., De Winne K., Schacht P.: Polymeric prodrugs. *International Journal Pharmaceutics* 277 (2004) 119-131.
- [4] Khandare J., Minko T.: Polymer-drug conjugates: progress in polymeric prodrugs. *Progress Polymer Science* 31 (2006) 359-397.
- [5] Sobczak M., Witkowska E., Ołędzka E., Kołodziejki W.: Synthesis and structural analysis of polyester prodrugs of norfloxacin. *Molecules* 13 (2008) 96-106.

## References

- [6] Sobczak M.: Synthesis and characterization of polyester conjugates of ciprofloxacin. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 3844-3849.
- [7] Sobczak M., Nałęcz-Jawecki G., Kołodziejki W.L., Goś P., Żółtowska K.: Synthesis and study of controlled release of ofloxacin from polyester conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* 402 (2010) 37-43.

# BADANIA MIKROPRZECIEKU WYBRANYCH KOMPOZYTÓW STOMATOLOGICZNYCH PO PROCESIE ZMĘCZENIA CIEPLNEGO

KRZYSZTOF PAŁKA<sup>1\*</sup>, AGATA NIEWCZAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA LUBELSKA,  
UL. NADBYSTRZYCKA 36, 20-608 LUBLIN

<sup>2</sup> KATEDRA I ZAKŁAD STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ,  
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,  
UL. KARMEŁICKA 7, 20-081 LUBLIN

\* E-MAIL: K.PAŁKA@POLLUB.PL

## Streszczenie

W pracy badano wpływ cyklicznych obciążeń cieplnych na rozwój szczeliny brzeżnej dla 2 nanohybrydowych i 2 mikrohybrydowych materiałów kompozytowych w wypełnieniach klasy I w ludzkich zębach trzonowych. Próbkę były oceniane na mikroskopie stereoskopowym stosując metodę penetrantu. Pomiarów długości szczeliny brzeżnej dokonano z wykorzystaniem systemu analizy obrazu. Mikroprzeciek oceniano na przekrojach wykonanych w kierunku policzkowo – językowym a następnie mezjo-dystalnym poprzez środek wypełnienia, wykorzystując 4-punktowy system oceny. Przedstawiono wyniki szczelności brzeżnej oraz ocenę punktową mikroprzecieku. Zmęczenie cieplne istotnie zwiększa mikroprzeciek w wypełnieniach klasy I, niezależnie od rodzaju kompozytu. Rodzaj kompozytu nie miał również wpływu na szczelność brzeżną.

**Słowa kluczowe:** zmęczenie cieplne, wypełnienia stomatologiczne, szczelność brzeżna, mikroprzeciek

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 35-38]

## Wprowadzenie

W ostatnich latach powstały liczne prace dotyczące kompozytowych wypełnień stomatologicznych i ich odporności na zużycie oraz skurczu polimeryzacyjnego. Materiały te charakteryzują się coraz lepszą trwałością i estetyką oraz przewidywalnym zachowaniem w czasie użytkowania. Skład kompozytów jest stale ulepszany w celu osiągnięcia wysokiej odporności na zużycie [1]. Kompozyty stomatologiczne stosowane w połączeniu z dedykowanymi systemami wiążącymi tworzą niezawodne i trwałe wiązanie do tkanek zęba [2], które zapewnia zabezpieczenie zęba przed próchnicą, przenoszenie i odpowiedni rozkład naprężeń, możliwość wzmocnienia zębów oraz zmniejsza potrzebę stosowania materiałów dodatkowych [3].

Zęby narażone są na zmiany temperatury podczas jedzenia, picia i oddychania. Posiłki gorące mają temperaturę do 85°C, natomiast lody do -12°C [4]. Zmiana temperatury zęba wywołuje naprężenia cieplne, proporcjonalne do gradientu temperatury a wynikające z różnych współczynników rozszerzalności cieplnej szkliwa, zębiny i wypełnienia. Zmiany naprężeń powodują zmęczenie cieplne tkanek i ich uszkodzenie, szczególnie narażony jest obszar granicy zęb - wypełnienie [5,6].

# MICROLEAKAGE OF SELECTED THERMOCYCLED DENTAL RESTORATIONS

KRZYSZTOF PAŁKA<sup>1\*</sup>, AGATA NIEWCZAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING,  
LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
36 NADBYSTRZYCKA ST., 20-618 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF CONSERVATIVE DENTISTRY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,  
7 KARMEŁICKA ST., 20-081 LUBLIN, POLAND

\* E-MAIL: K.PAŁKA@POLLUB.PL

## Abstract

*Microleakage is a major factor contributing to the occurrence of secondary carious lesions around restorations. This study investigated the effect of thermocycling on microleakage of 2 nanohybrid and 2 microhybrid composites Class I restorations in human molars. Specimens were examined by stereomicroscopy using a dye penetration test. The marginal gap was measured using image analysis software before and after thermocycling. Microleakage was evaluated on cross section in a buccolingual direction and then in a mesiodistal direction through the center of the restoration, using the 4-point scoring system. As a result the marginal integrity and microleakage scores were presented. Thermocycling significantly increased the microleakage of Class I composite restorations, independently of composite type. Composite type did not directly determine marginal integrity and microleakage as well.*

**Keywords:** thermocycling, dental restoration, marginal integrity, microleakage

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 35-38]

## Introduction

Composite restorations have steadily improved in recent years in wear resistance and polymerization shrinkage. These materials have progressed in durability, esthetics, and predictability of clinical performance. The current formulations of composites have been improved, demonstrating better wear resistance [1]. Used in combination with the appropriate adhesive systems, composite restorations form a reliable and durable bond to tooth structure [2] which offers the advantages of tooth conservation, transmission and distribution of functional stresses, the potential for tooth reinforcement, and diminished need for the use of additional materials [3].

Teeth are subject to significant temperature changes during intake of food of various temperatures. Hot food is served up to 85°C, and ice cream as low as -12°C [4]. The temperature differences create the thermal stress due to the different thermal expansion of enamel, dentin and restoration. With sufficient cyclic repeated high and low thermal stress shrinkage leads to marginal gap formation in interface of the composite restoration and the walls of the cavity at the weakest bond [5,6].

Kolejnym źródłem naprężeń jest proces polimeryzacji, skutkujący skurczem kompozytu. Wartość skurczu polimeryzacyjnego może wywołać naprężenia, które mogą prowadzić do powstawania pęknięć w szklawie, szczególnie w warunkach interakcji z naprężeniami cieplnymi [7]. Skurcz polimeryzacyjny prowadzi również do powstawania pęknięć w strefie przejściowej zęb-system wiążący-wypełnienie [8]. Szczelina brzeżna skutkuje powstawaniem mikroprzecieku, nadwrażliwości pozabiegowej i nawrotów próchnicy, ze szczególną intensywnością w przypadku zmęczenia cieplnego. Dodatkowo powstawanie szczeliny na granicy zęb/wypełnienie może być wywołane niedostateczną adhezją wypełnienia do tkanek zęba. Ponadto nowe szczeliny mogą powstawać podczas użytkowania wypełnienia, jako wynik naprężeń cieplnych lub mechanicznych [9].

Celem pracy było określenie wpływu zmęczenia cieplnego na mikroprzeciek w wypełnieniach klasy I wykonanych z 4 materiałów kompozytowych – 2 nanohybrydowych i 2 mikrohybrydowych.

## Materiał i metody

Do badań wykorzystano ludzkie zęby trzonowe, które bezpośrednio po ekstrakcji zostały oczyszczone, a następnie przechowywane w roztworze soli fizjologicznej z 3% dodatkiem podchlorynu sodu. Następnie w zębach wykonano wypełnienia klasy I (wg Blake'a) o głębokości ok. 3 mm. W wielu badaniach z zakresu oceny szczeliny brzeżnej wykonywano okrągłe wypełnienia „modelowe” [2,5], w niniejszych badaniach wykonano rzeczywiste wypełnienia, jako odwzorowanie warunków realnych. Wypełnienia zostały wykonane zgodnie z zaleceniami producentów materiałów oraz wiedzą stomatologiczną. Wykorzystano 2 materiały kompozytowe nanohybrydowe: Ceram X (Dentsply) oraz Filtek Supreme (3M ESPE) oraz 2 materiały mikrohybrydowe (TABELA 1). Po przygotowaniu zęby były przechowywane przez 24 h w wodzie destylowanej, po czym ich powierzchnię zabezpieczono lakierem w odległości ok. 1 mm do wypełnienia. Następnie zęby zamocowano w uchwytach i zanurzono część koronową na 30 min. w 1% roztworze błękitu metylenowego (POCH S.A.). Po opłukaniu zębów pod bieżącą wodą i delikatnym osuszeniu były one oceniane pod mikroskopem stereoskopowym SMZ1500 z kamerą cyfrową (Nikon) i systemem akwizycji obrazu (NIS Elements). Długość szczeliny brzeżnej mierzona była jako suma długości szczelin na obwodzie wypełnienia, przy wykorzystaniu oprogramowania ImagePro Plus (Media Cybernetics). Wykonywano po pięć pomiarów długości z dokładnością  $\pm 12 \mu\text{m}$ . Odchylenie standardowe w każdym z przypadków było mniejsze niż 0,15% w odniesieniu do wartości średniej. Szczelność brzeżna oceniona była jako procent obwodu wypełnienia bez obecności szczeliny brzeżnej.

Po wykonaniu pomiarów „zerowych” zęby poddane zostały cyklicznym obciążeniom cieplnym w zakresie temperatur  $5\div 55^\circ\text{C}$  z czasem zanurzenia 30 s. Po 20 000 cykli zęby były oczyszczone, zanurzane w roztworze błękitu metylenowego (30 min), opłukane i osuszone, po czym dokonano pomiaru długości szczeliny brzeżnej. Następnie każdy ząb przecięto w kierunku policzkowo – językowym a następnie mezo – dystalnym poprzez środek wypełnienia wykorzystując tarczę R/Sic o grubości 0,76 mm (Buehler). Po przecięciu każda część próbki była oceniana pod mikroskopem stereoskopowym pod kątem głębokości przecieku. Mikroprzeciek oceniano skalą punktową [2,3] przedstawioną w TABELI 2. Wyniki analizowano statystycznie stosując ANOVA z testem Tukey'a post hoc HSD (Statistica, StatSoft Inc.).

The other source of stresses is the polymerization process results in shrinkage or contraction of the composite. The level of shrinkage could generate contractile forces [7], which may lead to cracking at the enamel margins, especially when synergistic interactions with thermal stresses occur. Polymerization shrinkage also leads to gap formation between the composite restoration and the tooth tissue [8]. Marginal breakdown may result in microleakage, postoperative sensitivity, and recurrent dental caries, more intense when thermocycled. In addition to polymerization shrinkage, gap formation at the tooth/restoration interface may be caused by inadequate wetting of the tooth surface by the restorative material along the preparation walls during placement. Furthermore, new marginal gaps may develop during the service life of the restoration as a result of thermally or mechanically induced stresses [9].

The aim of this study was to investigate the effect of thermocycling on microleakage of Class I restorations made of 4 composite materials: 2 of nanohybrid type, 2 others of microhybrid one.

## Materials and methods

Human molars immediately after extraction were gently cleaned and stored in physiological saline and 3% sodium hypochlorite. A Class I preparation of about 3 mm depth was prepared in each tooth using a high-speed handpiece with water coolant. In many studies there were prepared modelled restorations [2,5] most often in circular shape. In present study the authors prepared a “real” restoration simulating in vivo conditions. Restorations were placed according to manufacturer's instructions and dental knowledge. There were used 2 nanohybrid and 2 microhybrid universal composite materials with its dedicated adhesive systems, which characteristics were presented in TABLE 1. After preparation teeth were stored in distilled water for 24 h, thereafter specimens were coated with nail polish to within 1 mm of the restoration margin prior to being thermocycled. This has been shown to effectively limit microleakage to that possible at the marginal interface of the tooth and restoration. After this the teeth were mounted in specimen holders. All teeth were subjected to exposure in 1% methylene blue solution (POCH S.A.) by 30 min immersing the crown part of the tooth. Thereafter the samples were washed in tap water, gently dried by paper tissue and examined using stereomicroscope SMZ1500 (Nikon) with image acquisition system (NIS Elements). The length of marginal gap, which is the sum of lengths of cracks in the interface zone, was then measured using ImagePro Plus software (Media Cybernetics). Five measuring were taken for each restoration (accuracy  $\pm 12 \mu\text{m}$ ). Consider the differences between restoration's perimeters as a result there was presented the marginal integrity calculated as percentage of restoration's perimeter without a marginal gap.

Thereafter the teeth in holders were thermocycled with temperature range from  $5^\circ\text{C}$  to  $55^\circ\text{C}$  and dwell time of 30 s. After 20 000 thermocycles specimens were cleaned, immersed in methylene blue solution (30 min), rinsed, dried and the length of marginal gap was measured. After this each tooth was sectioned in a buccolingual direction and then in a mesiodistal direction through the center of the restoration with an abrasive cut-off wheel R/Sic 0.76 mm width (Buehler). After sectioning, each specimen was examined under a stereomicroscope to evaluate the extent of dye penetration. The extent of dye penetration was scored according to the scoring system [2,3] presented in TABLE 2. Both sections of each restoration were scored and the mean microleakage score was recorded as the score for that restoration. The results were statistically analyzed by means of ANOVA test with Tukey's post hoc HSD (Statistica, StatSoft Inc.).



**TABELA 1. Materiały użyte do badań.**  
**TABLE 1. Materials used in the study.**

Material (Producent) / Material (Manufacturer)	Rodzaj kompozytu i zastosowanie / Type of composites and application	Rodzaj i wielkość wypełniacza / Type of fillers and size	Udział wypełniacza / Fraction of fillers [% wag., wt%]	Skurcz polimerizacyjny / Polymerization shrinkage [%]
Filtek Supreme (3M ESPE)	nanohybrydowy uniwersalny / nano-hybrid, universal	tlenki cyrkonu i krzemu, konwencjonalny wypełniacz szklany (~1 µm), nanowypełniacze (~10 nm), nanocząsteczki ceramiczne modyfikowane organicznie (2-3 nm) / zirconia/silica filler, conventional glass fillers (~1 µm), nanofillers (~10 nm), organically modified ceramic nanoparticles (2-3 nm)	79	1.8
Ceram X (Dentsply)		nieorganiczny wypełniacz ze szkła barowego, trójfluorek iterbu, szkło fluorosilikatowe z dodatkami Ba i Al, tlenek krzemu o wysokiej dyspersji, mieszanina sferoidalnych tlenków o wielkości cząstek 0,04-3,0 µm / inorganic fillers of barium glass, ytterbium trifluoride, Ba-Al-fluorosilicate glass, highly dispersed silicon dioxide and spheroid mixed oxide, particle size of 0.04-3.0 µm	76	1.9
ELS (Saremco)	mikrohybrydowy, uniwersalny / microhybrid, universal	wypełniacz nieorganiczny / inorganic filler	72.6	2.1
Z250 (3M ESPE)		cyrkonowo-krzemianowy / zirconia-silica 0,01-3.5 µm	66	2.1

**TABELA 2. System oceny punktowej mikroprecieku w teście penetracyjnym.**  
**TABLE 2. Scoring system of microleakage in the dye-penetration test.**

Ocena / score	Opis / description
0	brak penetracji no dye penetration
1	penetracja pomiędzy wypełnieniem a tkankami zęba do połowy długości ściany wypełnienia dye penetration between the restoration and the tooth up to half the length of the restoration wall
2	penetracja wzdłuż całej długości ściany wypełnienia, ale bez osiągnięcia dna ubytku penetration of dye along the entire length of the restoration wall but not reaching the axial wall
3	penetracja wzdłuż całej długości ścian wypełnienia oraz w dnie ubytku penetration of dye along the entire length of the restoration wall and reaching the axial wall

## Wyniki i dyskusja

Wyniki pomiarów przedstawiono w TABELI 3. Zaobserwowano istotne zwiększenie szczeliny brzeżnej wraz z ilością termocykli. Brak było korelacji między szczelnością brzeżną i rodzajem zastosowanego materiału (nano- czy mikrohybrydowy). Podobnie, nie zaobserwowano zależności pomiędzy rodzajem materiału i głębokością przecieku. Różnice istotne statystycznie zaobserwowano tylko w materiałach nanohybrydowych dla początkowej szczelności brzeżnej oraz dla mikroprecieku. Szczelność brzeżna oraz trwałość powierzchni rozdziału wypełnienia zależne są od wielu czynników, m.in. od składu materiału wypełnienia i jego właściwości oraz od właściwości systemu wiążącego, od oddziaływań między materiałami, od właściwości tkanek zęba i od wpływu środowiska jamy ustnej.

Obydwie grupy zastosowanych materiałów reprezentują dwa różne typy kompozytów (nano- i mikrohybrydowe) jednakże z podobną ilością wypełniacza ceramicznego w osnowie o zbliżonym składzie. Proporcje składników wpływają na wartość współczynnika rozszerzalności cieplnej [10], który w przypadku badanych materiałów nie powinien wykazywać dużych rozbieżności ze względu na podobną zawartość wypełniacza. Rozszerzalność cieplna jest głównym czynnikiem indukującym naprężenia cieplne, których skutkiem jest mikropreciek [10]. Wartości skurczu polimerizacyjnego również były zbliżone. Różnice obserwowane były w wartości naprężeń skurczowych powstających w wypełnieniach po procesie utwardzania [11]. Jednakże zarówno naprężenia skurczowe jak i naprężenia cieplne przenoszone są głównie przez system wiążący.

Początkowa długość szczeliny brzeżnej wynosiła od 1,69 mm dla materiału Ceram X (szczelność 84,79%) aż do 15,18 mm dla materiału Filtek Supreme (szczelność 54,99%). W przypadku tych dwóch materiałów zaobserwowano różnice istotne statystycznie w szczelności brzeżnej oraz w ocenie mikroprecieku.

## Results and Discussions

Results of measurements are presented in TABLE 3. It was noticed considerable increasing of marginal gap with the number of cycles. There was no correlation observed between marginal integrity and the type of material used (nano- or microhybrid). Similarly, there was no dependence noticed between type of material and penetration depth. Significant differences were noticed only for nanohybrid composites Filtek Supreme and Ceram X in initial marginal integrity and in microleakage. The marginal integrity and durability of restoration interface is dependent upon several factors, for example of restorative material composition, the physical properties of the material and adhesive system, interactions between materials, physical properties of the tissue interface, and the interaction of the oral environment. Both groups represent two different types of composite (nanohybrid and microhybrid) with similar volume of fillers.

Materials used in this research contained similar amounts of fillers and had similar resin matrix. Based on this there were expected only slight differences in thermal expansion coefficient values which is the main factor involving thermal stresses effecting in microleakage [10]. The values of volumetric polymerization shrinkage were also very similar. The main differences are noticed in shrinkage stresses involved in restoration after curing process [11]. However, the shrinkage stresses and thermal stresses as well affect on bonding system.

The initial length of marginal gap observed had the value from 1.69 mm for Ceram X composite (84.79% of marginal integrity) till 15.18 mm for Filtek Supreme composite (54.99%). These two materials showed significant differences in initial marginal integrity and in microleakage.

**TABELA 3. Szczelność brzeżna oraz ocena mikroprzecieku.**  
**TABLE 3. Marginal integrity and evaluation of microleakage.**

Materiał (Producent) / Material (Manufacturer)	Szczelność brzeżna [%] (odch.std.) / Marginal integrity [%] (SD)		Mikroprzeciek / Microleakage punkty (odch.std.) / score (SD)
	0 termocykli / thermocycles	20 000 termocykli / thermocycles	
Filtek Supreme (3M ESPE)	54.99 (14.55)*	18.41 (23.52)	2.46 (0.88)*
Ceram X (Dentsply)	84.79 (3.09)*	21.43 (10.44)	1.57 (0.79)*
ELS (Saremco)	74.98 (15.14)	5.74 (4.89)	1.75 (1.04)
Z250 (3M ESPE)	53.65 (38.95)	24.47 (20.12)	2.0 (0.87)

\* - różnice istotne statystycznie (w kolumnach) / \* - significant differences (in columns)

Rossomado i in. [2] wykazał, że średnie wartości oceny mikroprzecieku zębów przed zmęczeniem cieplnym wynosiły 2,40, natomiast po zmęczeniu cieplnym 3,0. Podobne wyniki uzyskali Wahab i in. [3], których rezultaty mówiły o powstawaniu początkowej szczeliny brzeżnej (tuż po polimeryzacji) w 40% zębów. Wielkość początkowej szczeliny brzeżnej wypełnień kompozytowych może być przypisana efektowi skurczu materiału wypełnienia. Różnice w początkowej szczelności brzeżnej mogą wynikać z wytrzymałości systemu wiążącego i jego adhezji do przylegających materiałów oraz ze skurczu polimeryzacyjnego i wielkości naprężeń skurczu [2].

Wszystkie materiały charakteryzowały się podobną ilością wypełniacza nieorganicznego, stąd oczekiwana podobna wartość współczynnika rozszerzalności cieplnej [10], co świadczy o tym, że szczelina brzeżna powstaje wskutek zbyt niskiej adhezji systemu wiążącego do tkanek zęba i materiału wypełnienia oraz kohezji systemu wiążącego. System wiążący jest więc najistotniejszym czynnikiem w trwałości wypełnień, podobnie jak doświadczenie stomatologa. Żywiec stosowane jako osnowa kompozytów jak i kompozyty posiadają relatywnie wyższą wartość współczynnika rozszerzalności cieplnej w stosunku do tkanek zęba, są one jednak bardzo dobrymi izolatorami, a ograniczony przepływ ciepła ma złożony wpływ na rozszerzalność cieplną.

## Wnioski

Na obecnym etapie badań sformułowano następujące wnioski:

1. Zmęczenie cieplne istotnie zwiększa mikroprzeciek wypełnień kompozytowych klasy I, niezależnie od rodzaju materiału wypełnienia.

2. Rodzaj wypełnienia nie wpływa bezpośrednio na szczelność brzeżną oraz mikroprzeciek, wpływ na nie mają adhezja i kohezja systemu wiążącego oraz charakterystyka rozszerzalności cieplnej wypełnienia.

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008-20011 jako projekt badawczy, nr 3260/B/T02/2008/35.*

## Piśmiennictwo

- [1] Curtis R.V., Watson T.F. (ed.): Dental biomaterials. Imaging, testing and modeling. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England, 2008.
- [2] Rossomando K.J., Wendt S.L. Jr.: Thermocycling and dwell times in microleakage evaluation for bonded restorations. Dent. Mater. 11 (1995), 47-51.
- [3] Wahab F.K., Shaini F.J., Morgano S.M.: The effect of thermocycling on microleakage of several commercially available composite Class V restorations in vitro. The Journal Of Prosthetic Dentistry (2003) Vol. 90, No 2, 168-174.
- [4] Ernst C.P., Canbek K., Euler T., Willershausen B.: In vivo validation of the historical in vitro thermocycling temperature range for dental materials testing. Clin Oral Invest 8 (2004), 130-138
- [5] Brown W.S., Jacobs H.R., Thompson R.E.: Thermal fatigue in teeth. J Dent Res 51 (1972), 461-467.
- [6] Gräf W.: Thermal exposure of teeth during the consumption of extremely hot and cold food. Dtsch Zahnärztl 15 (1960), 30-34.
- [7] Mayer T., Eickholz P.: Microleakage of temporary restorations after thermocycling and mechanical loading. Journal of Endodontics, Vol. 23, No. 5, pp. 320-322, 1997.

Rossomado et al. [2] showed means values of microleakage scores for non-thermocycled specimens of 2.40 when thermocycled has the value of 3.0. Similar results were obtained by Wahab et al. [3]. The research showed marginal gap formed in 40% of non-thermocycled restoration materials. The extent of marginal gap in the composite restoration can be attributed to the effects of polymerization shrinkage of the composite restoration. The differences of marginal integrity for the non-thermocycled composite specimens can be due to the quality of bonds of the different bonding resin systems and to the polymerization shrinkage and shrinkage stress characteristics [2].

All materials had similar filler volume fraction and should have almost the same value of coefficient of thermal expansion [10], which points, that marginal gap formation is the result of bonding material properties and its adhesion to composite restoration and tooth tissues. So the adhesive system is the most important thing as well as dentist's experience. While unfilled resins and resin composite restorative materials have relatively high linear coefficients of thermal expansion compared to tooth structures, they are extremely good thermal insulators. This insulating characteristic complicates the influence of thermal expansion.

## Conclusions

In the present experimental conditions, it can be concluded that:

1. Thermocycling significantly increased the microleakage of Class I composite restorations, independently of composite type;

2. Composite type did not directly determine marginal integrity and microleakage as well; these factors are influenced by adhesion and strength of bonding system assisted with thermal expansion characteristic of restoration.

## Acknowledgements

*The authors acknowledge to the support of the Ministry of Science and Higher Education, grant No 3260/B/T02/2008/35.*

## References

- [8] Stappert C.F.J., Chitmongkolsuk S., Silva N., Att W., Strub J.R.: Effect of mouth-motion fatigue and thermal cycling on the marginal accuracy of partial coverage restorations made of various dental materials. Dental materials 24:1248-1257, 2008.
- [9] Ehrenberg D., Weiner G.I., Weiner S.: Long-term effects of storage and thermal cycling on the marginal adaptation of provisional resin crowns: A pilot study. The Journal Of Prosthetic Dentistry Vol. 95, No. 3, pp. 230-236, 2006.
- [10] Versluis A., Douglas W.H., Sakaguchi R.L.: Thermal expansion coefficient of dental composites measured with strain gauges. Dental Materials vol. 12, pp. 290-294, 1996 Ernst C.P., Canbek K., Euler T., Willershausen B.: In vivo validation of the historical in vitro thermocycling temperature range for dental materials testing. Clin Oral Invest 8 (2004), 130-138.
- [11] Kleverlaan C.J., Feilzer A.J.: Polymerization shrinkage and contraction stress of dental resin composites. Dental Materials (2005) 21, 1150-1157.

# ANALIZA MES ZĘBÓW Z WYPEŁNIENIEM STOMATOLOGICZNYM PRZY OBCIĄŻENIU TERMICZNYM

KRZYSZTOF PAŁKA<sup>1</sup>, JAROSŁAW BIENIAŚ<sup>1</sup>, HUBERT DĘBSKI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA LUBELSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
NADBYSTRZYCKA 36, 20-618, LUBLIN

<sup>2</sup> POLITECHNIKA LUBELSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
KATEDRA PODSTAW KONSTRUKCJI MASZYN,  
NADBYSTRZYCKA 36, 20-618, LUBLIN,

\* E-MAIL: H.DEBSKI@POLLUB.PL

## Streszczenie

*Termiczno-mechaniczna analiza MES umożliwia określenie poziomu naprężeń spowodowanych obciążeniami termicznymi w zębach zdrowych oraz poddanych leczeniu. W artykule dokonano sprzężonej analizy termiczno-mechanicznej symulującej rozkład naprężeń w zębach, spowodowanych przyjmowaniem zimnych i gorących posiłków. Obciążenia termiczne przyłożone były do powierzchni korony zęba i spowodowały powstawanie naprężeń szczególnie w rejonie powierzchni rozdziału ząb-wypełnienie. Obszary o podwyższonej wartości naprężeń zostały zidentyfikowane i określony zostało ich kliniczne znaczenie z uwzględnieniem uszkodzenia wypełnienia i powstania mikroprzecieku.*

**Słowa kluczowe:** naprężenia termiczne, rozkład temperatury, metoda elementów skończonych (MES)

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 39-43]

## Wprowadzenie

Stale wzrastają wymagania dotyczące wypełnień stomatologicznych, wizualnie dopasowanych do naturalnej barwy zęba i wykazujących odpowiednią adhezję do tkanek. Zastosowanie materiałów kompozytowych pozwala stomatologom na odbudowę zębów łącząc aspekty funkcjonalne i anatomiczne oraz estetyczne [1]. Wypełnienia kompozytowe bazują na adhezji wymagającej efektywnego i trwałego połączenia z tkankami zęba. Materiały te narażone są na różnorodne obciążenia mechaniczne. Skurcz polimeryzacyjny powstający w trakcie utwardzania żywicy osnowy prowadzi do powstawania naprężeń pomiędzy wypełnieniem a tkanką zęba [2]. Naprężenia powstające w obszarze międzyfazowym są sumą naprężeń, których źródłem są obciążenia mechaniczne, powstające w procesie żucia oraz obciążenia termiczne, spowodowane temperaturą przyjmowanych pokarmów [3]. Badanie efektów oddziaływań termicznych w zębach z wypełnieniami oraz niszczenia systemu wiążącego i mikroprzecieku jest zagadnieniem bardzo złożonym. Matematyczne modelowanie procesów z zastosowaniem MES oferuje alternatywne podejście do problemu [4]. Przeanalizowanie wpływu zmian temperatury na wypełnienia stomatologiczne jest konieczne, gdyż umożliwia określenie naprężeń w obszarze międzyfazowym, a spowodowanych różnicami w rozszerzalności cieplnej, co warunkuje trwałość wypełnienia. Kliniczne konsekwencje powstających pęknięć czy szczelin w warstwie adhezyjnej prowadzą do powstawania przecieków, nadwrażliwości oraz próchnicy wtórnej [5].

# FINITE ELEMENT ANALYSIS OF DENTAL RESTORATIONS UNDER THERMAL LOADING

KRZYSZTOF PAŁKA<sup>1</sup>, JAROSŁAW BIENIAŚ<sup>1</sup>, HUBERT DĘBSKI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, MECHANICAL ENGINEERING  
FACULTY, DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING,  
36 NADBYSTRZYCKA ST., 20-618 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, MECHANICAL ENGINEERING  
FACULTY, DEPARTMENT OF MACHINE CONSTRUCTION,  
36 NADBYSTRZYCKA ST., 20-618 LUBLIN, POLAND

\* E-MAIL: H.DEBSKI@POLLUB.PL

## Abstract

*Thermo-mechanical finite element analyses in 3-D models are described for determination of the stress levels due to thermal loads in a healthy and restored tooth. Transient thermal analysis simulating the ingestion of cold and hot drinks was performed to determine the temperature distribution in the models of the teeth, followed by linear elastic stress analyses. The thermal loads were applied on the crown part surfaces. Maximum stresses were verified in resin restoration under thermal loads. Thermal loading showed higher tensile stress values occurred especially at the restoration-dentin interface. Regions of high tensile stress were detected and their possible clinical significance with respect to restoration damage and microleakage were discussed.*

**Keywords:** Thermal stress, temperature distribution, finite element method

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 39-43]

## Introduction

There is an increasing demand for dental restorations that visually match the tooth and which bond to dental tissue effectively. The use of composite dental restorations allows dentists to restore teeth, joining functional and anatomic aspects to aesthetic considerations [1]. The restoration systems using these materials are based on adhesive dentistry, requiring an effective and durable connection to the dental tissues. Composite restorations connected to the dental structure are subjected to a number of different mechanical loads. The polymerization contraction that occurs during curing of the resin matrix can lead to stresses at the interface between the restoration and dental tissue [2]. Additional interfacial stresses are subsequently superimposed by mechanical loading on the tooth during mastication, and by the thermal loading at drinking and eating of hot and cold foods [3]. The investigation of the effects of these thermal changes on restored teeth, and the associated bond failure and microleakage, either in vitro or in vivo, present serious experimental difficulties. Mathematical modeling of the process using finite element analysis offers an alternative approach to the problem [4]. The analysis of the effect of thermal fluctuations on restored teeth should be considered, as it has direct impact on the stress in the interface due to the difference between the thermal properties in the tooth and in the restoring materials, affecting durability of the interface. The clinical consequences of cracks in the adhesive layer are marginal leak, postoperative sensitivity, and the occurrence of recurrent caries [5].

W artykule przeprowadzono analizę numeryczną oddziaływania temperatury na rozkład naprężeń w zębach przedtrzonowych z wypełnieniem klasy I. Celem analizy było wyznaczenie rozkładów naprężeń wynikających z obciążeń termicznych, szczególnie w rejonie granicy międzyfazowej zęb-system wiążący-wypełnienie. Opracowanie to jest uzupełnieniem prowadzonych uprzednio badań nad zmęczeniem cieplnym zębów z wypełnieniami stomatologicznymi [6,7].

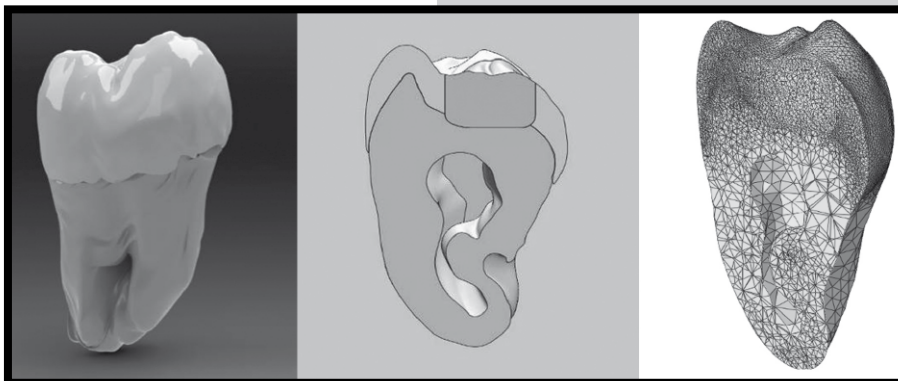
## Metodyka badań

Numeryczny model 3D zęba przedtrzonowego, zastosowany w analizie MES (RYS. 1), wykonano w oparciu o geometrię obiektu rzeczywistego z wypełnieniem klasy I, uzyskaną poprzez skanowanie mikrotomografem RTG. Zastosowano rodzaj elementu skończonego typu C3D4T – czterowęzłowy tetragonalny element bryłowy do termiczno-przemieszczeniowej analizy sprzężonej z liniową funkcją kształtu dla przemieszczeń i temperatury. Sprzężoną analizę typu *coupled temp-displacement analysis* prowadzono w zakresie oddziaływania na powierzchnię zewnętrzną szkliwa podwyższoną temperaturą 55°C oraz obniżoną temperaturą wynoszącą 5°C przez okres 30 s [6]. Jako początkową temperaturę określoną dla całego modelu zęba przyjęto 37°C. Przyjęto następujące wartości warunków brzegowych na powierzchni zewnętrznej szkliwa:

– dla temperatury 55°C: *film coefficient*  $7,37 \cdot 10^{-4}$  [J/(s\*mm<sup>2</sup>\*°C)], *sink temperature* 55°C,

– dla temperatury 5°C: *film coefficient*  $5,95 \cdot 10^{-4}$  [J/(s\*mm<sup>2</sup>\*°C)], *sink temperature* 5°C,

Wysoka wartość górnej temperatury (55°C) oraz długi czas jej oddziaływania (30 s) mają oczywiście destrukcyjny wpływ na tkanki zęba i takie parametry rzadko występują w rzeczywistości [8]. Przyjęte wartości miały na celu określenie rozkładu temperatur i naprężeń w trakcie badań zmęczenia cieplnego, opisanych w pracach [6,7]. Model uwzględniał również warstwę adhezyjną pomiędzy materiałem wypełnienia a tkanką twardą zęba, w tym celu zmodyfikowano interakcje kontaktowe typu *cohesive based surface behavior* w warstwie adhezyjnej dodając parametry dotyczące warunków przepływu ciepła pomiędzy poszczególnymi tkankami zęba [9,10]. Wymagało to uzupełnienia właściwości kontaktu o wartość współczynnika przewodzenia ciepła  $\lambda=0,4 \cdot 10^{-3}$  [J/(s\*mm\*°C)] oraz szerokość szczeliny pomiędzy powierzchniami kontaktowymi, która wynosiła 10 µm. Zastosowano sprężyste modele materiałów dla tkanek zęba oraz materiału wypełnienia. Ze względu na analizę sprzężoną dla każdego elementu określono mechaniczne właściwości materiałowe, tj.: moduł Younga, liczba Poissona, gęstość oraz właściwości termiczne takie, jak: ciepło właściwe, współczynnik rozszerzalności cieplnej oraz współczynnik przewodzenia ciepła. Przyjęte do analizy numerycznej właściwości tkanek zęba i materiałów wypełnienia [na podstawie prac 11÷14] przedstawiono w TABELI 1. Jako narzędzie numeryczne wykorzystano program ABAQUS/Standard.



RYS. 1. Model geometryczny zęba z wypełnieniem.  
FIG. 1. Geometrical model of tooth with restoration.

In this article, numerical analyses were performed and described, comparing the response of a human molar with composite restoration of class I. Initially, a transient thermal model was analyzed to obtain the thermal loading due to temperature distribution at different time steps. Afterwards, the stresses arising from thermal changes were computed. Attention was given to the restoration–tissue interface, where problems are observed in clinical practice. This work is a complement of previous research on thermal fatigue of teeth with restoration [6,7]

## Methods

A three-dimensional numerical model of the premolar tooth used in the FEM analysis (FIG. 1) was made based on the geometry of a real object with a class I restoration, obtained using X-ray microtomography scanning. For a thermal-displacement analysis coupled with the linear function of shape for displacements and temperature, a C3D4T type finite element was utilised – a four-node tetragonal solid body element. The *coupled temperature-displacement analysis* was made to expose the outer surface of enamel to an increased temperature of 55°C, as well as a lowered temperature of 5°C for 30 s [6]. The temperature of 37°C was adopted as the initial temperature for the whole model of the tooth. The following values for the boundary conditions on the outer surface of the enamel were assumed:

– for the temperature of 55°C: *film coefficient*  $7.37 \cdot 10^{-4}$  [J/(s\*mm<sup>2</sup> °C)], *sink temperature* 55°C,

– for the temperature of 5°C: *film coefficient*  $5.95 \cdot 10^{-4}$  [J/(s\*mm<sup>2</sup> °C)], *sink temperature* 5°C,

High value of upper temperature (55°C) and long dwell time (30 s) has obviously destructive influence on tooth tissues and these parameters occur rarely in real [8]. Such values were assumed to determine the distribution of temperature and stresses in thermocycling research, described in works [6] and [7]. The adhesive layer between the filling material and the hard dental tissue has been taken into consideration in the model; for that purpose, the contact interactions of the *surface-based cohesive behaviour* type in the adhesive layer were modified by adding parameters concerning conditions of the heat flow between individual dental tissues [9,10]. It necessitated complementing the contact properties with the thermal conductivity coefficient value  $\lambda=0.4 \cdot 10^{-3}$  [J/(s\*mm\*°C)], as well as the width of the adhesive layer was 10 µm. Elastic models of materials were used for dental tissues and the restoration material. Because of the coupled analysis, the mechanical properties of the materials, i.e. Young's modulus, Poisson's ratio, density, as well as the thermal properties, such as: specific heat, thermal expansion coefficient and thermal conductivity, were defined for every element.

The properties of dental tissues and filling materials adopted for the numerical analysis [based on works 11-14] have been presented in TABLE 1. As a numerical tool, ABAQUS/Standard software was used.

**TABELA 1. Dane materiałów przyjęte do analizy MES.**  
**TABLE 1. Properties of materials used in FE analysis.**

Właściwość materiału / Properties of material		Szklivo / Enamel	Zębina / Dentine	Wypełnienie kompozytowe / Composite restoration	System wiążący / Adhesive system
Moduł Younga / Young's modulus	E [MPa]	84 100	18 600	15 000	4 500
Liczba Poisson'a / Poisson ratio	$\nu$	0.33	0.31	0.3	0.3
Gęstość / Density	$\rho$ [g/mm <sup>3</sup> ]	2.90·10 <sup>-3</sup>	4.0·10 <sup>-3</sup>	1.95·10 <sup>-3</sup>	-
Wsp. rozsz. cieplnej / Thermal expans. coeff.	$\alpha$ [1/°C]	17·10 <sup>-6</sup>	10.6·10 <sup>-6</sup>	25·10 <sup>-6</sup>	-
Wsp. przewodn. cieplnej / Thermal conductivity	$\lambda$ [J/(s*mm°C)]	0.92·10 <sup>-3</sup>	0.63·10 <sup>-3</sup>	1.5·10 <sup>-3</sup>	0.4·10 <sup>-3</sup>
Ciepło właściwe / Specific heat	$C_p$ [J/g°C]	0.7536	1.1724	1.4	-

## Wyniki obliczeń numerycznych

Przeprowadzona analiza numeryczna w zakresie temperaturowo-przemieszczeniowym pozwoliła wyznaczyć rozkłady temperatury oraz wynikające z nich rozkłady naprężeń w tkankach twardych zęba. Analizę naprężeń przeprowadzono w oparciu o naprężenie zredukowane wyznaczone według hipotezy wytrzymałościowej Hubera – Misesa – Hencky'ego. Na RYS. 2 przedstawiono rozkłady naprężenia zredukowanego oraz temperatury w tkankach zęba z wypełnieniem stomatologicznym poddanych działaniu temperatury 55°C w czasie 30 sekund. Na skutek działania środowiska o temperaturze 55°C powierzchnia szkliva zmieniła temperaturę od wartości początkowej  $T_0 = 37^\circ\text{C}$  do wartości 54,37°C. Wartość temperatury w zębiny wyniosła 51,48°C w elementach „szczytowych” geometrii zębiny, bezpośrednio stykających się z powierzchnią wewnętrzną szkliva, natomiast w strefie stykającej się z materiałem wypełnienia temperatura nie przekroczyła wartości 50°C. W materiale wypełnienia stomatologicznego maksymalna wartość temperatury osiągnęła 51,5°C na górnych krawędziach wypełnienia.

Maksymalne wartości naprężenia zredukowanego H-M-H umiejscowione w elementach szkliva na jego zewnętrznej krawędzi kształtują się na poziomie 20÷30 MPa. Zaobserwowano tam gwałtowne gradienty naprężenia do 51 MPa, podobnie jak w pobliżu ostrych krawędzi styku szkliva z wypełnieniem na powierzchni zęba. Obszar ten może stanowić potencjalne źródło uszkodzenia materiału wypełnienia. Pozostała zewnętrzna powierzchnia korony zęba charakteryzuje się równomiernym rozkładem naprężenia zredukowanego o wartości ok. 7,5 MPa łącznie z powierzchnią wypełnienia, na której zaobserwowano nieznacznie niższe wartości naprężeń. Maksymalne wartości naprężenia zredukowanego w modelu zębiny wynoszą 10 MPa i są umiejscowione w pobliżu bocznej ściany styku zębina-wypełnienie. Również w tym przypadku na przeważającym obszarze modelu zębiny rozkład naprężenia jest równomierny, natomiast w obszarze styku z dolną powierzchnią wypełnienia poziom naprężenia osiąga wartość 7,5 MPa.

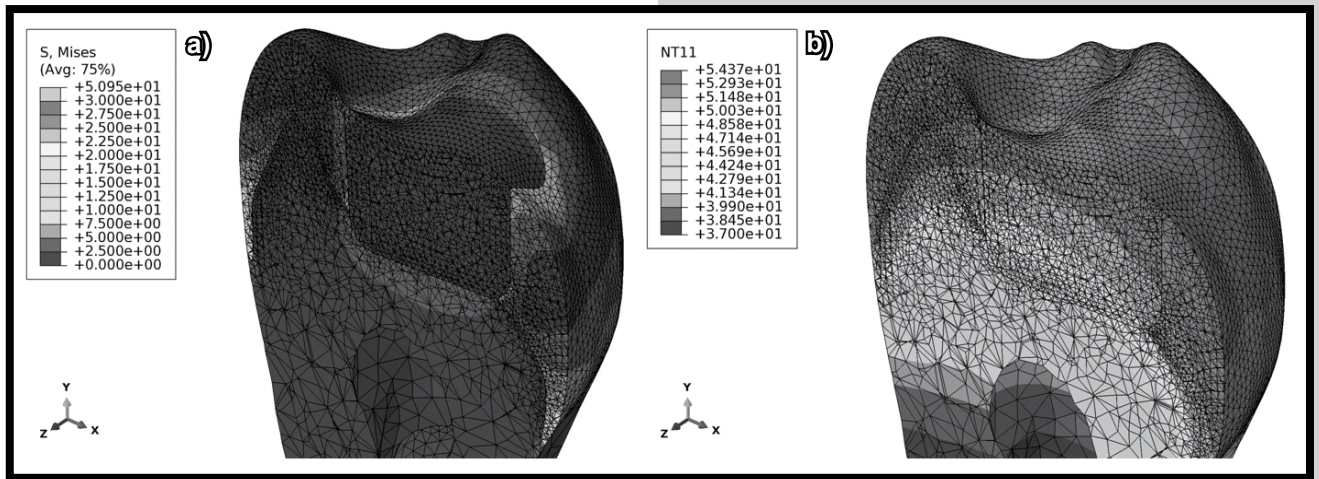
Na RYS. 3 przedstawiono rozkłady naprężenia zredukowanego oraz temperatury w tkankach twardych struktury zęba z wypełnieniem stomatologicznym, poddanego oddziaływaniu środowiska o temperaturze 5°C. Na skutek działania temperatury 5°C na część koronową, temperatura szkliva obniżyła się od wartości początkowej 37°C do wartości 6,62°C. Na powierzchni zewnętrznej szkliva można zaobserwować równomierny rozkład temperatury. Rozkład temperatury ochładzanego zęba wykazywał duże podobieństwo do przypadku ogrzewania. Obserwowano łagodny wzrost temperatury aż do wartości 36,9°C w części korzeniowej. Materiał wypełnienia, pomimo różnic we właściwościach cieplnych, przy czasie chłodzenia 30 s nie stanowi istotnej bariery cieplnej.

## Results of numerical calculations

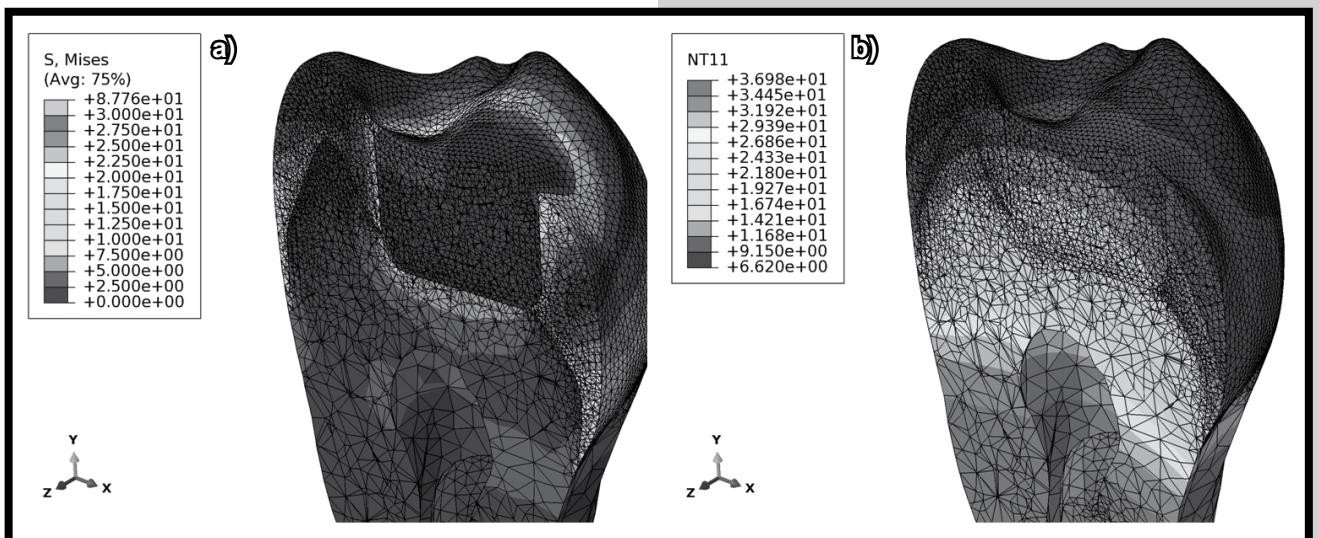
The numerical analysis of temperature and displacement allowed determining the distribution of temperature and the resulting distribution of stress in hard dental tissues. The stress analysis was made based on the reduced stress determined with the Huber-Mises-Hencky strength hypothesis. In FIG. 2, the distribution of reduced stress and temperature in tissues of teeth with dental restoration, exposed to the temperature of 55°C for 30 seconds, has been presented. As a result of exposure to the environmental temperature of 55°C, the enamel surface temperature changed from the initial value  $T_0 = 37^\circ\text{C}$  to the value of 54.37°C. The value of temperature in the dentine was 51.48°C in the “top” elements of the dentine geometry, directly in contact with the inner layer of the enamel, while in the area of direct contact with the filling material the temperature did not exceed the value of 50°C. In the restoration material the maximum temperature value reached 51.5°C on the upper edges of the filling.

The maximum values of the reduced H-M-H stress located in the enamel elements on their outer edge are 20 to 30 MPa. Severe stress gradients up to 51 MPa were observed in this area as well as near the sharp edges of contact between the enamel and the filling on the tooth surface. This area can involve a potential source of damage to the filling material. The remaining outer surface of the crown is characterized by an even distribution of the reduced stress of about 7.5 MPa, jointly with the surface of restoration on which only insignificantly lower stress values were observed. The maximum values of the reduced stress in the dentine model are 10 MPa and are located near the dentine-restoration contact wall. Also in this case, in the vast area of the dentine model the distribution of stress is even, while in the area of contact with the lower surface of the restoration the stress reaches 7.5 MPa.

FIG. 3 presents the distributions of reduced stress and temperature in hard tissues of the tooth structure with a restoration exposed to the environmental temperature of 5°C. As a result of the exposure of the crown part to the temperature of 5°C, the enamel temperature decreased from the initial value of 37°C to 6.62°C. On the outer surface of the enamel, an even distribution of temperature can be observed. The distribution of temperature of a cooled tooth exhibited great similarity to that of heating. A gradual increase in temperature up to the value of 36.9°C in the root part was observed. The filling material, in spite of the differences in thermal properties, with a cooling time of 30 s, does not constitute a significant thermal barrier.



RYS. 2. a) mapa naprężeń zredukowanych H-M-H i b) rozkład temperatury na przekroju modelu zęba (55°C).  
 FIG. 2 a) distribution of reduced stress by H-M-H hypothesis and b) distribution of temperature on cross section of the tooth model (55°C).



RYS. 3. a) rozkład naprężeń i b) rozkład temperatury na przekroju modelu zęba (5°C).  
 FIG. 3. a) distribution of stress and b) distribution of temperature on cross section of the tooth model (5°C).

Naprężenia zredukowane H-M-H na powierzchni zewnętrznej szkliwa charakteryzowały się równomiernym rozkładem, przy czym najwyższa wartość naprężeń wystąpiła na zewnętrznej krawędzi i wynosiła 87,7 MPa, natomiast najniższa w guzkach zęba i wynosiła ok. 5 MPa. Na powierzchni żującej zaobserwowano wyraźną różnicę naprężeń między szkliwem (30 MPa) i wypełnieniem (5 MPa). Dla materiału wypełnienia otrzymano równomierny rozkład naprężenia zredukowanego nie przekraczającego wartości 10 MPa. Poziom naprężenia w elementach zębiny stykającej się ze szkliwem był bardzo niski i wynosił ok. 5 MPa. Maksymalne wartości naprężenia zredukowanego w modelu zębiny wynoszą 10 MPa i są umiejscowione w zewnętrznej części zęba w pobliżu krawędzi styku szkliwo-zębina oraz w dnie wypełnienia.

### Dyskusja wyników i podsumowanie

W praktyce klinicznej występowanie plamek i przecieków obserwowanych na granicy wypełnienia jest dość częste, stąd wybór właściwego materiału do odbudowy powinien być staranny. Sukces kliniczny jest konsekwencją wyboru materiału o odpowiednich właściwościach biologicznych i mechanicznych jak również o odpowiedniej estetyce.

The reduced H-M-H stresses on the outer surface of the enamel were characterized by even distribution, and the highest stress value was observed on the outer edges and was 87.7 MPa, while the lowest – in the nodules and it was about 5 MPa. On the masticating surface, a marked difference in stresses between the enamel (30 MPa) and the filling (5 MPa) was observed. For the restoration material, an even distribution of reduced stress, not exceeding 10 MPa, was found. The value of stress in the elements of dentine contacting the enamel was about 5 MPa. The maximum values of reduced stress in the dentine model are 10 MPa and are located in the outer part of the tooth near the border of the enamel-dentine contact as well as in the bottom of restoration.

### Discussion of results and summary

In clinical practice, the occurrence of spots and leaks observed on the border of the filling is quite frequent, thus suitable material for the restoration should be carefully selected. The clinical success is a consequence of the choice of material with suitable biological and mechanical properties, as well as appropriate aesthetics.

Zarówno naprężenia termiczne jak i mechaniczne zależne są od właściwości materiałów. W zębach poddanych leczeniu problem ten jest wzmacniany przez użycie materiałów kompozytowych, który wykazują dużą różnicę w rozszerzalności cieplnej w porównaniu do tkanek zęba. Sumowanie naprężeń termicznych i mechanicznych w warstwie bondu może prowadzić do powstawania pęknięć i skutkować mikropreciekaniem. Wyniki uzyskane zarówno dla obniżonej jak i dla podwyższonej temperatury są zbliżone z wynikami uzyskanymi w pracach [1,3,4]. Cornacchia i in. [4] określili również rodzaj naprężeń przy chłodzeniu i ogrzewaniu zęba, chłodzenie powoduje powstawanie naprężeń rozciągających w szkliwie a naprężeń ściskających w zębiny, przy ogrzewaniu kierunki naprężeń odwracają się. Wobec tego wskazaniem do zastosowań w leczeniu jest stosowanie materiałów wypełnień z tej samej grupy materiałów ze względu na brak różnic we współczynnikach rozszerzalności cieplnej i generowane niskie naprężenia termiczne. Szczególną uwagę należy zwrócić na opracowanie ubytku w taki sposób, aby krawędzie miały łagodny kształt zmniejszający gradient naprężeń. Konieczne jest również dobre opracowanie wypełnienia przez polerowanie, co zabezpiecza przed powstawaniem miejsc koncentracji naprężeń, oraz częsta kontrola wypełnienia w celu szybkiej interwencji w przypadku powstawania uszkodzeń.

Wartości naprężeń uzyskanych z analizy MES nie należy traktować jako ścisłych, właściwości tkanek zębów oraz materiałów wypełnień zawierają się w szerokich granicach. Geometria zębów również jest indywidualną cechą osobniczą. Na podstawie wyników niniejszej pracy można stwierdzić, że zmienne obciążenia spowodowane zmianami temperatury w zakresie od 5 do 55°C mogą generować naprężenia zredukowane o wartości maksymalnej 50÷90 MPa, co w porównaniu do wytrzymałości tkanek zęba (szkliwo 310 MPa, zębina 247 MPa) nie jest wartością znaczącą, natomiast jest zbliżone do wartości wytrzymałości materiału wypełnienia [9÷14]. Jednakże zmienny gradient naprężeń może przyczynić się zarówno do uszkodzenia najsłabszego elementu - systemu wiążącego, jak również do uszkodzenia materiału wypełnienia i tkanek zęba.

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008-20011 jako projekt badawczy.*

## Piśmiennictwo

- [1] Toparli M, Aykul H, Sasaki S (2003) Temperature and thermal stress analysis of a crowned maxillary second premolar tooth using three-dimensional finite element method. *J Oral Rehabil* 30(1):99-105.
- [2] Kleverlaan C.J., Feilzer A.J.: Polymerization shrinkage and contraction stress of dental resin composites. *Dental Materials* (2005) 21, 1150-1157.
- [3] Fenner DN, Robinson PB, Cheung PM-Y (1998) Three-dimensional finite element analysis of thermal shock in a premolar with a composite resin MOD restoration. *Med Eng Phys* 20(4): 269-275 11.
- [4] Cornacchia T.P. M., Las Casas E.B., Cimini Jr. C.A., Peixoto R.G.: 3D finite element analysis on esthetic indirect dental restorations under thermal and mechanical loading. *Med Biol Eng Comput* (2010) 48:1107-1113.
- [5] Ehrenberg D., Weiner G.I., Weiner S.: Long-term effects of storage and thermal cycling on the marginal adaptation of provisional resin crowns: A pilot study. *The Journal Of Prosthetic Dentistry* Vol. 95, No. 3, pp. 230-236, 2006.
- [6] Pałka K., Niewczas A.: Badania zmęczenia cieplnego stomatologicznych wypełnień kompozytowych. *Inżynieria Biomateriałów (Engineering of Biomaterials)*, nr 96-98, 2010, str. 61-65.
- [7] Pałka K., Gruszecka M., Niewczas A.: Rozwój szczeliny brzeżnej jako efekt zmęczenia cieplnego wypełnień stomatologicznych. *Inżynieria Biomateriałów (Engineering of Biomaterials)* (w druku).

Both the thermal and mechanical stresses are dependent on the properties of the materials. In treated teeth the problem is enhanced by the use of composite materials, which exhibit significant difference in thermal expansion compared with dental tissues. Adding up thermal and mechanical stresses in the bonding layer can lead to cracks and result in microleakage. The results obtained for both the lowered and the increased temperatures are convergent with the results obtained in works [1,3,4]. Cornacchia et al. [4] defined also the type of stresses for cooling and heating of the tooth; cooling down causes tensile stresses in the enamel and compressive stresses in the dentine; in heating, the stress directions are reversed. For that reason, the use of filling materials from the same group is recommended for treatment due to lack of differences in the thermal expansion coefficients and generation of low thermal stress. Special attention should be paid in preparation of the cavity that the edges are smooth, which reduces the stress gradient. Also, good preparation of the filling by polishing is necessary, as it protects against formation of stress concentration points, as well as frequent check-ups of the filling to enable quick intervention in the event of damage.

The stress values determined in the FEM analysis should not be treated as exact, as the properties of dental tissues and filling materials are broad in range. Also, tooth geometry is an individual, ontogenetic characteristic. Based on the results of this research, it can be stated that variable loads caused by temperature changes ranging from 5 to 55°C can generate reduced stresses of the maximum value of 50÷90 MPa, which are considerably lower in comparison to the strength of tooth tissues (for enamel 350 MPa, for dentine 247 MPa) but near the strength of filling material [9÷14]. However the variable stress gradient can contribute to damage both the weakest element – the bonding system and cracking of the filling material and dental tissues as well.

## Acknowledgements

*The authors acknowledge to the support of the Ministry of Science and Higher Education in the years 2008-2011 in the research project.*

## References

- [8] Barańska-Gachowska M.: Endodoncja wieku rozwojowego i dojrzałego. Wyd.Czelej, Lublin, 2011.
- [9] Ausiello P., Rengo S., Davidson C.L., Watts D.C.: Stress distributions in adhesively cemented ceramic and resin-composite Class II inlay restorations: a 3D-FEA study. *Dental Materials* (2004) 20, 862-872.
- [10] Ausiello P., Apicella A., Davidson C.L.: Effect of adhesive layer properties on stress distribution in composite restorations-a 3D finite element analysis. *Dental Materials* (2002) 18, 295-303.
- [11] Dobosz A., Panek H., Napadłek P.: Implementation of Numerical Analysis in Assessment of Stresses in Hard Tissues of Teeth Reconstructed with Selected Fixed Prosthesis, *Dent. Med. Probl.* 2005, 42, 4, 657-662.
- [12] Tribiño R., Szymaniak E., Waszkiel D., Syczewski M.: Zastosowanie metody elementów skończonych do analizy stanu naprężeń w tkankach twardych zęba. *Czas. Stomat.* 1989, 42, 1-7.
- [13] Szymaniak E., Kierklo A., Tribiño R.: Praktyczne zastosowanie metody elementów skończonych (MES) do analizy naprężeń w tkankach zęba i wypełnieniu. *Czas. Stomat.* 1991, 44, 271-275.
- [14] Dejak B., Młotkowski A.: Analiza naprężeń w dwu- i trójwymiarowych modelach zębów badanych metodą elementów skończonych. *Prot. Stomat.* 1994, 44, 209-212.

## ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCJI W BADANIACH KOROZJI KLAMER NiTi UŻYTYCH W OSTEOSYNTYZIE ZŁAMAŃ KOŚCI TWARZY

B. ŁOSIEWICZ<sup>1\*</sup>, Z. LEKSTON<sup>1</sup>, K. PRUSIK<sup>1</sup>, A. WINIARSKI<sup>2</sup>,  
M. JĘDRUSIK-PAWŁOWSKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, UNIwersYTET ŚLĄSKI,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE

<sup>2</sup> INSTYTUT FIZYKI, UNIwersYTET ŚLĄSKI,  
UL. UNIwersYTECKA 4, 40-007 KATOWICE

<sup>3</sup> KLINIKA CHIRURGII CZASZKOWO-SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ,  
ŚLĄSKI UNIwersYTET MEDYCZNY,  
UL. FRANCUSKA 20/2, 40-027 KATOWICE

\* E-MAIL: BOZENA.LOSIEWICZ@US.EDU.PL

*[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 44-49]*

### Wprowadzenie

Stopy NiTi wykazujące zjawiska pamięci kształtu i super-sprężystość w ostatnich latach są przedmiotem intensywnych badań interdyscyplinarnych, które są prowadzone w celu potwierdzenia ich biokompatybilności i opracowania nowych, certyfikowanych wyrobów medycznych z tych stopów do zastosowań w chirurgii małoinwazyjnej [1,2]. Do najbardziej rozpowszechnionych implantów z tych stopów należą klamry do wewnętrznego zespalania złamań kości stosowane w ortopedii i chirurgii szczękowo-twarzowej, które aktywowane są ciepłem ciała pacjenta. W kraju w ostatnich latach w badaniach klinicznych prowadzonych w Klinice Chirurgii Czaszkowo-Szczękowo-Twarzowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach zastosowano klamry NiTi opracowane w Instytucie Nauki o Materiałach Uniwersytetu Śląskiego, wykazujące w temperaturze pokojowej własności supersprężyste [3,4]. Wstępne badania powierzchni tych implantów i ich funkcjonalnych własności przedstawiono w poprzednich pracach [5-7].

Korozja klamer NiTi o wysokiej zawartości Ni jest kluczowym zagadnieniem, ponieważ może niekorzystnie wpływać na ich biokompatybilność i właściwości mechaniczne [8]. Korozja i rozpuszczanie warstwy powierzchniowej stanowią dwa mechanizmy odpowiedzialne za przechodzenie jonów niklu z klamer do ciała pacjenta. Wydzielenie się jonów niklu, toksycznych dla otaczających tkanek i żywych komórek, może wywołać alergię lub skutkować niepożądanymi reakcjami biologicznymi a nawet prowadzić do mechanicznego uszkodzenia implantu. Korozja warstwy ochronnej na implancie w ciele ludzkim jest procesem elektrochemicznym, wskutek tego do badań zachowania korozyjnego implantu stosowane są techniki elektrochemiczne. Ostatnio rozwijana jest elektrochemiczna spektroskopia impedancji (ESI), która jest uniwersalnym narzędziem pomiarowym w takich badaniach, dostarczającym wartościowych informacji o właściwościach granicy faz: metaliczny implant | warstwa pasywna | płyn ustrojowy [9,10]. Należy podkreślić, że tę granicę faz charakteryzuje warstwa elektrochemiczna (podwójna), gdzie ważną rolę odgrywa pojemność elektryczna warstwy a impedancja faradajowska opisuje szybkość przeniesienia elektronu.

## APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY FOR CORROSION INVESTIGATIONS OF THE NiTi STAPLES USED IN OSTEOSYNTHESIS OF THE FACIAL BONE FRACTURES

B. ŁOSIEWICZ<sup>1\*</sup>, Z. LEKSTON<sup>1</sup>, K. PRUSIK<sup>1</sup>, A. WINIARSKI<sup>2</sup>,  
M. JĘDRUSIK-PAWŁOWSKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, UNIVERSITY OF SILESIA,  
BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF PHYSICS, UNIVERSITY OF SILESIA,  
UNIwersYTECKA 4, 40-007 KATOWICE, POLAND

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF CRANIOMAXILLOFACIAL SURGERY,  
SILESIA MEDICAL UNIVERSITY,  
FRANCUSKA 20/2, 40-027 KATOWICE, POLAND

\* E-MAIL: BOZENA.LOSIEWICZ@US.EDU.PL

*[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 44-49]*

### Introduction

Recently, the NiTi alloys exhibiting shape memory effects and superelasticity are the subject of intensive interdisciplinary studies which are conducted in order to confirm their biocompatibility and to develop new certificated medical products of these alloys for the use in a low-invasive surgery [1,2]. To the most widespread implants of these alloys belong staples for the internal joining of the bone fractures applied in orthopaedics and maxillofacial surgery that use the patient's body heat to activate. Lately, in our country in the clinical investigations carried out at the Department of Craniomaxillofacial Surgery of Silesian Medical University in Katowice, the NiTi staples developed at the Institute of Materials Science of University of Silesia that exhibit superelastic properties at room temperature were applied [3-5]. Preliminary surface studies of these implants and their functional properties have been presented in the previous works [6,7].

Corrosion of the NiTi staples of a high Ni content is a key-problem because it can adversely affect their biocompatibility and mechanical properties [8]. Corrosion and surface film dissolution are two mechanisms responsible for passing nickel ions from the staples to the patient's body. Release of nickel ions that are toxic for the surrounding tissues and living cells can cause allergy or result in adverse biological reactions and even lead to mechanical failure of the implant. Corrosion of a protective film on the implant in the human body is an electrochemical process. Hence electrochemical techniques are applied for study of the implant corrosion behavior. Recently, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) has been developed as an universal measurement tool in these studies, providing valuable information on the interfacial properties of the metallic implant | passive film | body fluid [9, 10]. It should be stressed that this interface is characterized by the electrochemical layer (double) where an important role plays the electrical capacitance of the layer, and the faradaic impedance describes a rate of electron transfer.



Prezentowana praca została podjęta w celu określenia korozyjnego zachowania pasywowanych w autoklawie klamer NiTi przed i po implantacji przy użyciu techniki ESI. Zastosowano koncepcję elektrycznego obwodu zastępczego dla korozji wżerowej w roztworze Ringer'a w temperaturze 310 K oraz przeprowadzono dyskusję dotyczącą użytych elementów obwodu z uwzględnieniem ich fizycznego znaczenia.

## Material i metody

Przedmiotem badań były klamry NiTi użyte w zespołach złamań jarzmowo-szczękowo-oczodołowych, które wykonano z supersprężystego drutu NiTi SE-508 firmy Euroflex o średnicy 1,1 mm. Przed implantacją klamry były sterylizowane przy pomocy pary wodnej w temperaturze 407 K przez 3,5 min pod ciśnieniem 304 hPa w autoklawie STATIM 5000S. Klamry usunięte po 14 miesiącach implantacji były dezynfekowane i poddane sterylizacji tlenkiem etylenu w temperaturze 328 K pod ciśnieniem 850 hPa przez 2 h i 45 min w sterylizatorze gazowym STERIVAC 5XL. Klamry odgazowywano przez 12 h.

Elektrochemiczne zachowanie korozyjne klamer NiTi przed i po implantacji badano przy zastosowaniu metody ESI w roztworze Ringer'a (Solutio Ringeri, Fresenius Kabi) o pH w zakresie od 6,59 do 7,07 (pH-metr CP-101 Elmetron) w temperaturze 310 K. Po badaniach korozyjnych pH roztworów zmieniało się od 9,30 do 10,36. Przed każdym pomiarem świeży roztwór był odpowietrzany za pomocą Ar (czystość: 99,999%) przez 30 min. W celu utrzymania obojętnej atmosfery w trójelektrodowym naczyniu elektrochemicznym w trakcie trwania pomiaru utrzymywano strumień Ar nad powierzchnią roztworu. Elektrode pracującą stanowiła klamra NiTi. Przeciwelektrodę zastosowano w postaci siatki Pt (~1 dm<sup>2</sup>). Wszystkie wartości mierzonych potencjałów wyznaczone zostały względem nasyconej elektrody kalomelowej (NEK). Pomiary ESI prowadzono przy potencjale obwodu otwartego ( $E_{OO}$ ) stosując zestaw elektrochemiczny Autloab PGSTAT12 Potentiostat/Galvanostat firmy Metrohm/Eco Chemie. Skanowano 10 częstotliwości na dekadę stosując sygnał wzbudzający w postaci fali sinusoidalnej o amplitudzie 5 mV. Pomiary ESI prowadzono w zakresie częstotliwości: 50 kHz - 1 MHz. Dane impedancyjne były analizowane w oparciu o elektryczne obwody zastępcze przy zastosowaniu programu EQUIVCRT [1] i aproksymacji metodą CNLS (ang. *complex non-linear least squares*). Obwody zastępcze definiowano zgodnie z kodem opisu obwodu zaproponowanym przez Boukamp'a [12].

Badania morfologii powierzchni oraz składu chemicznego w mikroobszarach klamer przed i po implantacji przeprowadzono odpowiednio przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego Jeol JSM-6480, wyposażonego w detektor EDS firmy IXRF i oprogramowania EDS 2008 oraz wielofunkcyjnego spektrometru elektronów model PHI5700/660 firmy Physical Electronics z krystalicznym monochromatorem kwarcowym ze źródłem promieniowania Al<sub>Kα</sub>.

## Wyniki badań i dyskusja

Zachowanie korozyjne pasywowanych klamer NiTi badano w roztworze Ringer'a na podstawie pomiarów ESI rejestrowanych przy  $E_{OO}$ , który dla elektrody przed i po implantacji wynosił odpowiednio:  $-245 \pm 10$  i  $-298 \pm 17$  mV. Wyznaczenie potencjału korozyjnego i charakterystyka potencjodynamiczna tego materiału zostały przedstawione w naszej poprzedniej pracy [7]. Dla elektrody NiTi przed i po implantacji uzyskano doświadczalnie podobne wykresy Bode:  $\log|Z|=f(\log f)$  i  $\varphi=f(\log f)$  z dwoma stałymi czasowymi, charakterystyczne dla impedancyjnego zachowania metalu pokrytego warstwą tlenkową ze strukturą dwufazową (RYS. 1).

This work was undertaken in order to determine the corrosion behavior of the passivated by autoclaving NiTi staples before and after implantation using the EIS technique. Concept of the equivalent electrical circuit for the pitting corrosion in Ringer solution at 310 K was applied and discussed with respect to the physical meaning of the used circuit elements.

## Material and experiments

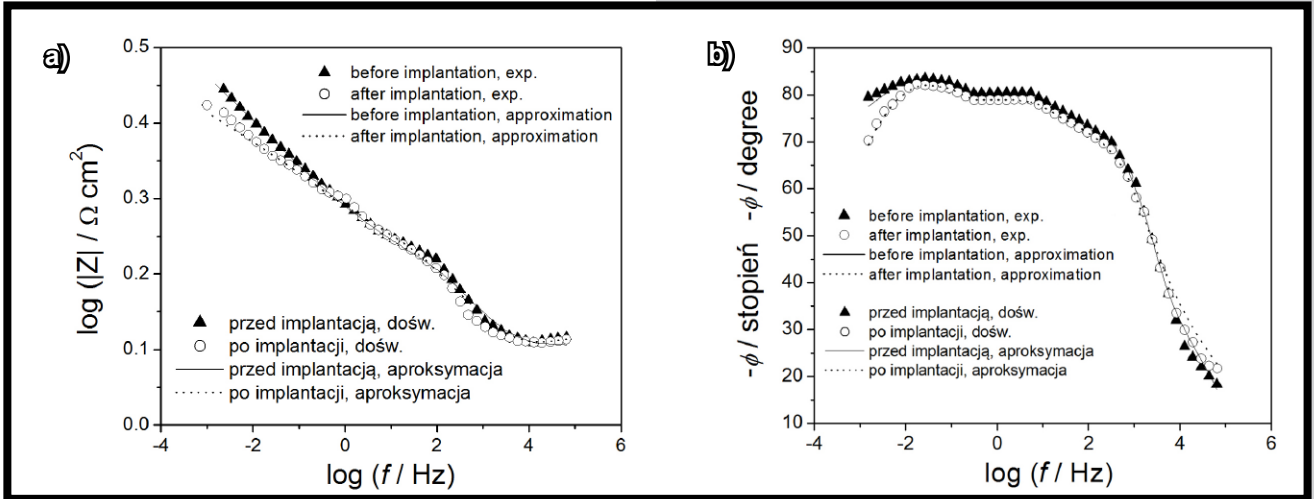
The object of investigations were the NiTi staples used in the fixation of the zygomatico-maxillo-orbital fractures, obtained from a superelastic NiTi SE-508 Euroflex wire with diameter 1.1 mm. The staples before implantation were sterilized in water vapour at 407 K for 3.5 min under pressure of 304 hPa using a STATIM 5000S autoclave. The staples removed after 14 months of implantation were disinfected and ethylene oxide sterilization was carried out at 328 K for 2 h and 45 min under pressure of 850 hPa using a STERIVAC 5XL gaseous sterilizer. The staples were degassed minimum for 12 h.

Electrochemical corrosion behavior of the NiTi staples before and after implantation was studied using EIS method in Ringer solution (Solutio Ringeri, Fresenius Kabi) of pH ranging from 6.59 to 7.07 (CP-101 Elmetron pH-meter) at 310 K. The solution pH after corrosion tests changed in the range of 9.30-10.36. Before each measurement the fresh solution was deaerated by bubbling Ar (99.999% purity) for 30 min. To maintain the inert atmosphere in a three-electrode electrochemical cell, Ar was circulated above the solution surface during the tests. The working electrode was the NiTi staple. The counter electrode was a Pt mesh (~1 dm<sup>2</sup>). All measured potentials are referred to the saturated calomel electrode (SCE). The EIS measurements were performed at open circuit potential ( $E_{OCP}$ ) using a Metrohm/Eco Chemie Autloab PGSTAT12 Potentiostat/Galvanostat Electrochemical System. Ten frequencies per decade were scanned using a sine-wave amplitude of 5 mV. The EIS tests were carried out in the frequency range: 50 kHz - 1 MHz. The impedance data were analyzed based on the equivalent electrical analogs using the program EQUIVCRT [11] and complex non-linear least squares (CNLS) approximation method. The equivalent circuits were defined using circuit description code given by Boukamp [12].

The surface morphology and composition studies in the microregions of the samples before and after implantation were carried out using a scanning electron microscope (Jeol JSM-6480) equipped with an EDS detector (IXRF) and EDS 2008 software, and a Multitechnique Electron Spectrometer PHI5700/660 from Physical Electronics equipped with a quartz crystal monochromator with an Al<sub>Kα</sub> X-ray source, respectively.

## Results and discussion

The corrosion behavior of the passivated NiTi staples was assessed in Ringer solution based on the EIS measurements carried out at  $E_{OCP}$  which was  $-245 \pm 10$  and  $-298 \pm 17$  mV for the electrode before and after implantation, respectively. The corrosion potential determination and potentiodynamic characteristics of this material have been presented in our previous paper [7]. Similar Bode plots:  $\log|Z|=f(\log f)$  and  $\varphi=f(\log f)$  with two time constants that are characteristic of ac impedance behavior of a metal covered with an oxide film with duplex structure, were obtained experimentally for the NiTi electrode before and after implantation (FIG. 1).



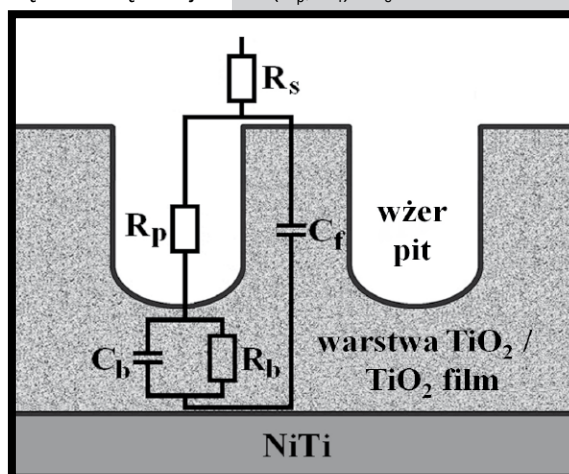
**RYŚ. 1.** Doświadczalne i symulowane wykresy Bode (a, b) dla korozji wżerowej na pasywowanych klamrach NiTi przed i po implantacji, rejestrowane w roztworze Ringer'a w temp. 310 K.  
**FIG. 1.** Experimental and simulated Bode plots (a, b) for the pitting corrosion at the passivated NiTi staples before and after implantation registered in Ringer solution at 310 K.

Obserwuje się wysokie wartości  $|Z|_{f \rightarrow 0}$  oraz  $\phi$  bliskie  $-90^\circ$ , co świadczy o typowym zachowaniu pojemnościowym materiału o wysokiej odporności korozyjnej. W przypadku elektrody NiTi przed implantacją zarejestrowano nieznacznie większe wartości impedancji (RYŚ. 1a) i szersze plateau (RYŚ. 1b), które odpowiadają efektywniejszej odporności na korozję. Obserwowany spadek modułu impedancji dla elektrody po implantacji, zwłaszcza w zakresie niskich częstotliwości poniżej 10 mHz, wskazuje na początek korozji wżerowej, jednak elektroda wciąż wykazuje właściwości materiału o wysokiej odporności na korozję. Takie zachowanie jest podobne do charakterystyki korozyjnej pasywowanych materiałów w roztworach zawierających chlorki, znanych z wywoływania korozji wżerowej [13]. Uzyskane wyniki pozostają także w bardzo dobrej zgodności z wartościami impedancji otrzymanymi przez Figueirę i współpracowników [10] dla elektrod NiTi w roztworze Hank'a oraz płynach zawierających jony nieorganiczne w ilościach występujących w organizmie oraz proteiny.

Dla wyjaśnienia impedancyjnego zachowania badanych elektrod zastosowano odpowiedni model reprezentujący układ: NiTi | warstwa  $\text{TiO}_2$  | roztwór, przedstawiony na RYŚ. 2. W modelu tym warstwa pasywna składa się z wewnętrznej warstwy barierowej  $\text{TiO}_2$  ( $R_b$ ,  $C_b$ ) oraz warstwy zewnętrznej z obecnymi wżerami na powierzchni ( $R_p$ ,  $C_f$ ).  $R_s$  jest oporem roztworu,  $R_b$  oznacza opór warstwy barierowej,  $C_b$  jest pojemnością warstwy barierowej,  $R_p$  odpowiada dodatkowemu oporowi roztworu wewnątrz wżeru a  $C_f$  jest pojemnością ścianki wżeru. Otrzymano bardzo dobre dopasowanie do doświadczalnych danych impedancyjnych dla spasywowanej elektrody NiTi przed i po implantacji stosując elektryczny obwód zastępczy przedstawiony na RYŚ. 2. Do sprawdzenia ważności parametrów modelu użyto testu F. Na RYŚ. 1 linie ciągłe oznaczają wyniki uzyskane na drodze dopasowania. W procedurze aproksymacji w miejsce kondensatorów zastosowano element stałofazowy CPE (ang. *constant phase element*), którego impedancja zdefiniowana jest jako [13]:

One can observe the high values of  $|Z|_{f \rightarrow 0}$  and  $\phi$  close to  $-90^\circ$  which are typical of a capacitive behavior of a high corrosion resistance material. The slightly higher impedance values (FIG. 1a) and the wider plateau (FIG. 1b) corresponding to the more effective corrosion resistance, was registered for the NiTi electrode before implantation. A decrease in the modulus of the impedance, especially in the low frequency range below 10 mHz, that is observed for the electrode after implantation points the onset of pitting corrosion, however, the electrode still exhibits the properties of a high corrosion-resistant material. Such a behavior is similar to that found for passivated materials in chloride-containing solutions which are known to cause pitting [13]. The obtained results are also in a very good agreement with the impedance values obtained by Figueira et al. [10] for NiTi electrodes in Hank solution and fluids containing inorganic ions in amounts that are present in the organism and proteins.

To explain ac behavior of the tested electrodes, a suitable model representing the system of the NiTi |  $\text{TiO}_2$  film | solution shown in FIG. 2, was used. In that model, the passive film consists of an inner barrier  $\text{TiO}_2$  layer ( $R_b$ ,  $C_b$ ) and an outer layer with the present pits on the surface ( $R_p$ ,  $C_f$ ).  $R_s$  is the resistance of the solution,  $R_b$  denotes the resistance of the barrier layer,  $C_b$  is the capacitance of the barrier layer,  $R_p$  is the additional resistance of the solution inside the pit and  $C_f$  is the capacitance of the pit wall. A very good fit to the experimental ac impedance data for the passivated NiTi electrode before and after implantation was obtained using the electrical equivalent circuit shown in FIG. 2. The F test was used to check the importance of model parameters. The continuous lines in FIG. 1 indicate fitting results. In the fitting procedure, instead of capacitors the constant phase element (CPE) was used with impedance defined as [13]:



**RYŚ. 2.** Elektryczny obwód zastępczy dla korozji wżerowej na pasywowanych klamrach NiTi.  
**FIG. 2.** Equivalent electrical circuit for the pitting corrosion at the passivated NiTi staples.

$$\hat{Z}_{\text{CPE}} = \frac{1}{T(j\omega)^\phi} \quad (1)$$

gdzie  $T$  jest parametrem pojemnościowym w  $\text{F cm}^{-2} \text{s}^{\phi-1}$ , który może być zależny od potencjału elektrody a  $\phi$  odpowiada kątowi obrotu czysto pojemnościowej linii na wykresach płaszczyzny zespolonej:  $\alpha = 90^\circ(1-\phi)$ . CPE reprezentuje „nieszczelny” kondensator, który posiada niezerową składową rzeczywistą i urojoną. Czysto pojemnościowe zachowanie  $T = C_{\text{dl}}$  jest otrzymane tylko wówczas, gdy  $\phi = 1$ . Ogólnie równanie (1) może odpowiadać czystej pojemności dla  $\phi = 1$ , nieskończonej impedancji Warburga dla  $\phi = 0,5$ , czystej rezystancji dla  $\phi = 0$  oraz czystej indukcyjności dla  $\phi = -1$ . Wartość  $\phi$  jest związana z chropowatością elektrody oraz powierzchniowymi niejednorodnościami. W prezentowanych wynikach wartości  $\phi$  mieściły się w zakresie od 0,80 do 0,85.

$$\hat{Z}_{\text{CPE}} = \frac{1}{T(j\omega)^\phi} \quad (1)$$

where  $T$  is the capacitance parameter in  $\text{F cm}^{-2} \text{s}^{\phi-1}$  which may be dependent on the electrode potential, and  $\phi$  is related to the angle of rotation of purely capacitive line on the complex plane plots:  $\alpha = 90^\circ(1-\phi)$ . CPE represents a „leaking” capacitor, which has non-zero real and imaginary components. Only when  $\phi = 1$ ,  $T = C_{\text{dl}}$  and purely capacitive behavior is obtained. In general, Eq. (1) may represent pure capacitance for  $\phi = 1$ , infinite Warburg impedance for  $\phi = 0.5$ , pure resistance for  $\phi = 0$ , and pure inductance for  $\phi = -1$ . The value of  $\phi$  is related to the electrode roughness and surface heterogeneities. In the presented results values of  $\phi$  ranged from 0.80 to 0.85.

**TABELA 1. Parametry obwodu zastępczego otrzymane na podstawie danych EIS w roztworze Ringera w temp. 310 K.**  
**TABLE 1. Equivalent circuit parameters obtained from EIS data in Ringer solution.**

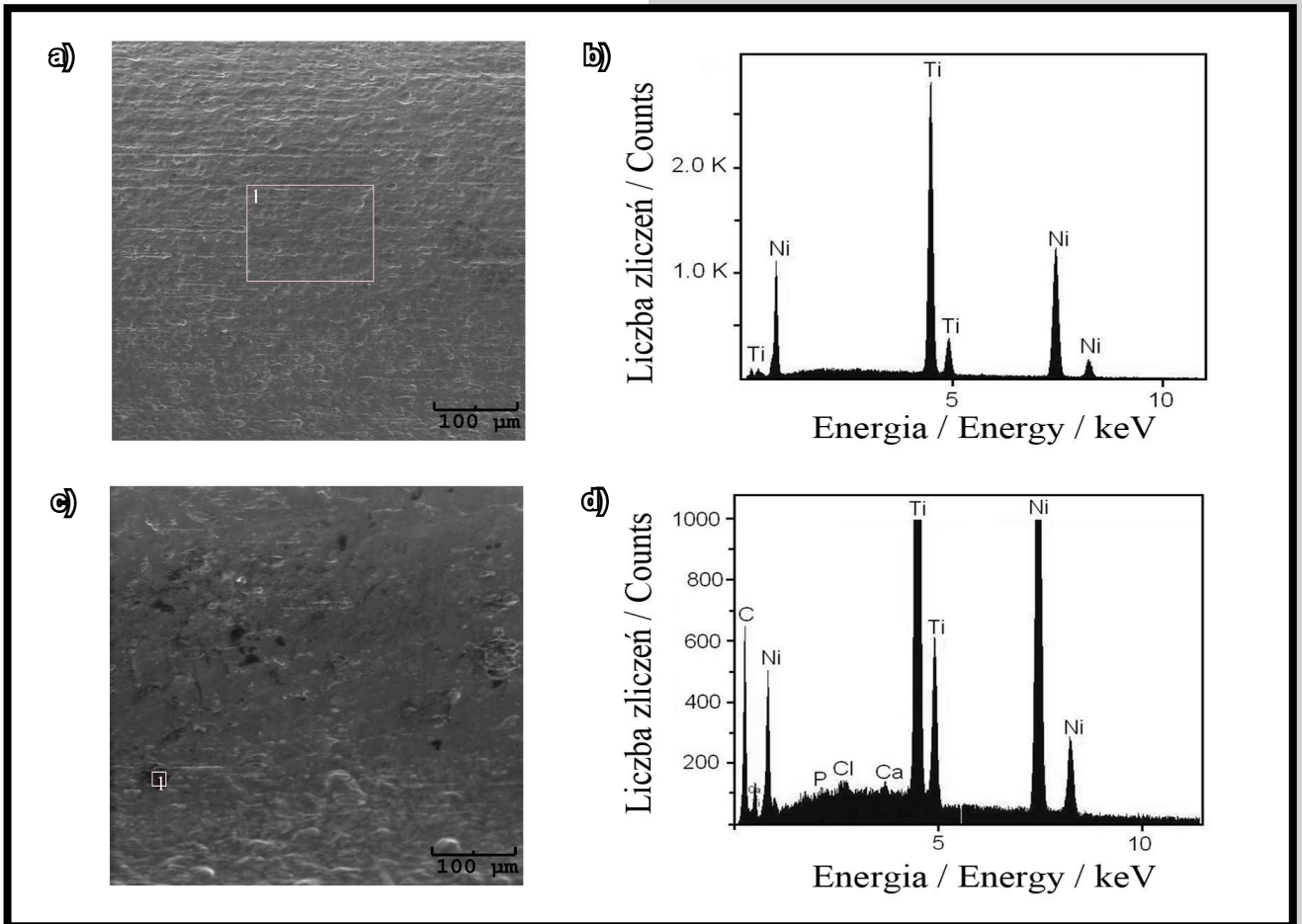
Parametr / Parameter	$R_b$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$C_b$ ( $\text{F cm}^{-2}$ )	$R_p$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$C_f$ ( $\text{F cm}^{-2}$ )
Przed implantacją / Before implantation	$6.3 \times 10^6$	$4.1 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^3$	$8.8 \times 10^{-6}$
Po implantacji / After implantation	$8.5 \times 10^4$	$5.0 \times 10^{-5}$	$3.1 \times 10^3$	$1.1 \times 10^{-5}$

Wyniki otrzymane w procedurze dopasowania przedstawiono w TABELI 1. Błąd określenia poszczególnych parametrów był zawsze poniżej 20%. Wartości parametrów obwodu zastępczego świadczą o różnicach w charakterystyce granicy międzyfazowej: NiTi | warstwa  $\text{TiO}_2$  | roztwór dla elektrody przed i po implantacji. Parametr  $R_b$  przyjmuje większą wartość  $6.3 \times 10^6 \Omega \text{ cm}^2$  dla elektrody przed implantacją sugerując silniejsze właściwości ochronne tlenkowej warstwy barierowej w porównaniu do elektrody po implantacji ( $R_b = 8.5 \times 10^4 \Omega \text{ cm}^2$ ). Wynik ten pozostaje w dobrej zgodności z wartością  $E_{\text{oc}}$ , która dla drugiej z wymienionych elektrod jest bardziej katodowa. Pojemność wewnętrznej warstwy barierowej i rezystancja roztworu wewnątrz wżeru w obydwu badanych przypadkach przyjmują te same wartości w granicach błęd pomiarowego. Można także zaobserwować, że pojemność zewnętrznej warstwy z wżerami na powierzchni  $\text{TiO}_2$  wzrosła z  $8,8 \mu\text{F cm}^{-2}$  dla elektrody przed implantacją do  $11,0 \mu\text{F cm}^{-2}$  dla elektrody po implantacji. Taka zmiana parametru  $C_f$  może sugerować, że warstwa tlenku na powierzchni klamry po usunięciu z organizmu pacjenta jest cieńsza niż przed implantacją. Odporność korozyjna warstwy  $\text{TiO}_2$  jest nieznacznie osłabiona w wyniku długiego czasu implantacji klamry i warstwa pasywna staje się bardziej przewodząca. Jednak obecność Ni nie została stwierdzona na powierzchni elektrody po badaniach korozyjnych. Należy dodać, że proponowany model (RYS. 2) został wcześniej pomyślnie zastosowany w badaniach zachowania korozyjnego stopu NiTi w roztworze Hank’a [10] oraz Ti i stopów o wysokiej zawartości Ti jak Ti-6Al-4V [14-16]. Można wnioskować, że warstwa tlenkowa utworzona przez pasywację w autoklawie na stopie NiTi z pamięcią kształtu, pomimo mniejszej zawartości Ti, jest podobna do warstw tlenkowych utworzonych na Ti i stopach bogatych w Ti.

RYS. 3 przedstawia mikrofotografie morfologii powierzchni spasywowanej klamry bezpośrednio po sterylizacji w autoklawie (RYS. 3a) i klamry usuniętej z organizmu po 14 miesiącach implantacji (RYS. 3c) oraz skład chemiczny w wybranych mikroobszarach (RYS. 3b i 3d). Na spektrogramie próbki po implantacji (RYS. 3d) widoczne są dodatkowe linie spektralne należące do pierwiastków wchodzących w skład środowiska tkankowego (Ca, P, Cl, C).

The results of the fitting procedure are presented in TABLE 1. The error of the particular parameter determination was always below 20%. The values of equivalent circuit parameters indicate differences in the interface characteristics of the NiTi |  $\text{TiO}_2$  film | solution for the electrode before and after implantation. The  $R_b$  parameter is characterized by the higher value of  $6.3 \times 10^6 \Omega \text{ cm}^2$  for the electrode before implantation and points the stronger protective properties of the barrier oxide layer as compared to the electrode after implantation ( $R_b = 8.5 \times 10^4 \Omega \text{ cm}^2$ ). This result stays in a good agreement with the  $E_{\text{ocp}}$  value that is more cathodic for the latter electrode. The capacitance of the inner barrier layer and resistance of the solution inside the pit in the both investigated cases are the same within the limit of error. One can also see that the capacitance of the outer layer with the pits on the  $\text{TiO}_2$  surface increased from  $8.8 \mu\text{F cm}^{-2}$  for the electrode before implantation to  $11.0 \mu\text{F cm}^{-2}$  for the electrode after implantation. Such a change in the  $C_f$  parameter may suggest that the oxide film on the surface of the staple after implantation is thinner than the one before implantation. The  $\text{TiO}_2$  film corrosion resistance is slightly weakened with the long-term implantation of the staple and the passive layer become more conductive. However, the presence of Ni was not detected on the surface of the electrode after the corrosion test. It should be added that the proposed model (FIG. 2) has been also successfully used in the studies of corrosion behavior of NiTi alloy in Hank solution [10] or Ti and Ti-rich alloys such as Ti-6Al-4V [14-16]. It can be concluded that the oxide film formed on the NiTi shape memory alloy by autoclaving, despite the lower Ti content, is similar to those formed on Ti and Ti-rich alloys.

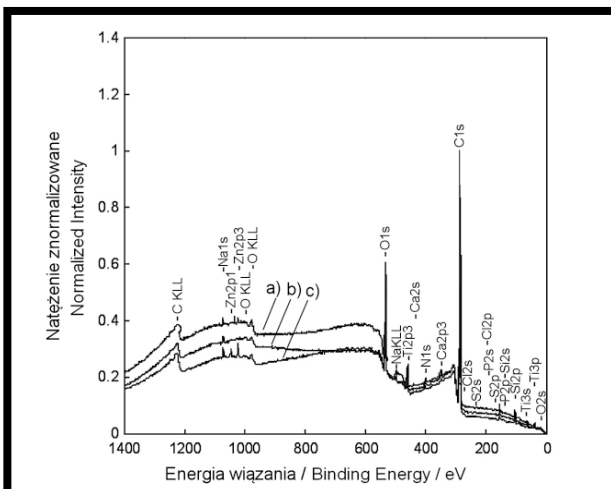
FIG. 3 presents microphotographs of the surface morphology for the passivated staple directly after sterilization in autoclave (FIG. 3a) and for the staple removed from the organism after 14 months of implantation (FIG. 3c), and the appropriate composition in the chosen microregions (FIGS. 3c and d). One can observe in the spectrogram for the sample after implantation (FIG. 3d) the additional spectral lines of elements (Ca, P, Cl, C) which come from the tissue environment of the implant.



**RYS. 3.** Morfologia powierzchni oraz skład chemiczny w wybranych mikroobszarach powierzchni klamry po pasywacji w autoklawie przed implantacją (a,b) i po usunięciu z organizmu (c,d).

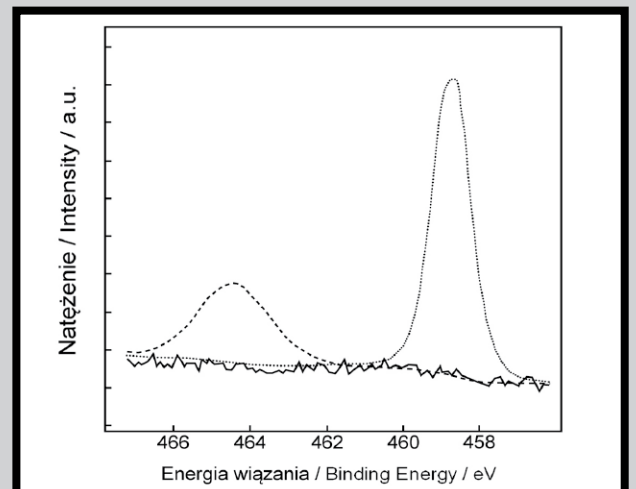
**FIG. 3.** Surface morphology and composition in the chosen microregions of the staple surface after passivation in autoclave before implantation (a,b) and after removal from the organism (c,d).

Również w badaniach metodą spektroskopii fotoelektronów XPS przeprowadzonych na powierzchni badanej klamry usuniętej z organizmu (RYS. 4a,c) potwierdzono obecność śladowych ilości pierwiastków pochodzących ze środowiska tkankowego. Energia wiązania linii  $Ti2p_{3/2}$  jest równa 458,7 eV (RYS. 5). Uzyskana wartość odpowiada energii wiązania linii  $Ti2p_{3/2}$  w  $TiO_2$  [17].



**RYS. 4.** Widma przeglądowe XPS z powierzchni klamry NiTi po implantacji (a,c) i przed implantacją (b).  
**FIG. 4.** XPS survey spectra of the NiTi staple surface after (a,c) and before (b) implantation.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) measurements carried out for the surface of the investigated staple after removal from the organism (FIGs. 4a and c) also confirmed the presence of trace elements coming from the tissue environment. The binding energy of  $Ti2p_{3/2}$  line is equal to 458.7 eV (FIG. 5). It corresponds to the binding energy of  $Ti2p_{3/2}$  line in  $TiO_2$  [17].



**RYS. 5.** Widma XPS z powierzchni klamer NiTi po implantacji: linia  $Ti2p_{3/2}$  (—) i  $Ti2p_{1/2}$  (- - -).  
**FIG. 5.** XPS spectra of the NiTi staple surfaces after implantation:  $Ti2p_{3/2}$  (—) and  $Ti2p_{1/2}$  (- - -) lines.

## Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań ESI stwierdzono, że po 14 miesiącach implantacji klamer NiTi w ciele pacjenta badane implanty wciąż wykazują wysoką odporność korozyjną. Jednak warstwa tlenkowa utworzona przez pasywację w autoklawie stała się bardziej przewodząca i odporność korozyjna została nieznacznie osłabiona w porównaniu do tlenkowej warstwy barierowej przed implantacją. Należy podkreślić, że na wszystkich spektrogramach XPS nie stwierdzono obecności linii spektralnych od niklu, co świadczy o poprawnej obróbce powierzchniowej klamer przygotowanych do implantacji, jak również o braku dyfuzji niklu przez warstwę pasywną na powierzchnię pod wpływem organicznego środowiska otaczającego implant. Drugi składnik stopowy, tytan, jest związany z tlenem tworząc na powierzchni implantu barierową warstwę  $\text{TiO}_2$ , która zabezpiecza przed przenikaniem niklu lub tytanu z implantu do otaczających tkanek.

## Summary

On the basis of the carried out EIS investigations it was ascertained that after 14 months of implantation of the NiTi staple in the patient body, the tested implants still exhibit the high corrosion resistance. However, the oxide layer formed by autoclaving became more conductive and the corrosion resistance was slightly weakened as compared to the barrier oxide layer before implantation. It should be stressed that in all XPS spectra the presence of spectral lines coming from nickel was not ascertained what testifies that surface treatment of the NiTi staples prepared for implantation was correct as well as a lack of nickel diffusion through the passive film to the surface under the influence of organic environment surrounding the implant. The second alloying component, titanium, is bounded with oxygen forming the  $\text{TiO}_2$  barrier layer on the implant surface which protects against passing of nickel or titanium from the implant to the surrounding tissues.

## Piśmiennictwo

- [1] D. Stoeckel, *Min. Invas. Ther. & Allied Technol.* 9 (2000) 81-88.
- [2] S. Shabalovskaya, J. Anderegg, J.V. Humbeeck, *Acta Biomater.* 4 (2008) 447-467.
- [3] Z. Lekston, M. Jędrusik-Pawłowska, T. Cieśliak, J. Drugacz, *Eng. Biomater.* 89-91 (2009) 42-46.
- [4] M. Jędrusik-Pawłowska, Z. Lekston, J. Drugacz, M. Kromka-Szydek, T. Cieśliak, *Eng. Biomater.* 89-91 (2009) 79-82.
- [5] Z. Lekston, M. Jędrusik-Pawłowska, M. Kromka-Szydek, T. Cieśliak, J. Drugacz, *Pol. J. Environ. Stud.* 18 (6A) (2009) 251-255.
- [6] H. Morawiec, T. Goryczka, J. Lelaćko, Z. Lekston, A. Winiarski, E. Rówiński, G. Stergioudis, *Mater. Sci. Forum* 636-637 (2010) 971-976.
- [7] Z. Lekston, B. Łosiewicz, A. Winiarski, M. Jędrusik-Pawłowska, M. Kromka-Szydek, K. Miernik, *Eng. Biomater.* 96-98 (2010) 29-33.
- [8] *Shape memory and superelastic alloys: Applications and technologies*, (eds.) K. Yamauchi, I. Ohkata, K. Tsuchiya, and S. Miyazaki, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 2011.
- [9] J.A. Ruiz, I. Rosales, J.G. Gonzalez-Rodriguez, J. Uruchurtu, *Int. J. Electrochem. Sci.* 5 (2010) 593-604.
- [10] N. Figueira, T.M. Silva, M.J. Carmezim, J.C.S. Fernandes, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 921-926.

## References

- [11] User manual for frequency response analysis (FRA) for Windows version 4.9, Eco Chemie B.V., Kanaalweg, Utrecht, The Netherlands, 2001.
- [12] B.A. Boukamp, *Solid State Ionics* 18-19 (1986) 136-140; 20 (1986) 31-44.
- [13] *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*, Evgenij Barsoukov, J. Ross Macdonald (Edts.), Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, New Jersey, 2005, USA.
- [14] J.E.G. González, J.C. Mirza-Rosca, *J. Electroanal. Chem.* 471 (1999) 109-115.
- [15] I. Costa, H.G. de Melo, M. Saiki, O.V. Correa, S.O. Rogero, *J. Electroanal. Chem.* 544 (2003) 113-120.
- [16] S.L. Assis, S. Wolyneć, I. Costa, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 1815-1819.
- [17] J.F. Moulder, W.F. Stickle, P.E. Sobol, K.D. Bomben, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy: A reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data*, 1995, Physical Electronics.

# CHARAKTERYZACJA NOWEGO PRZECIWBAKTERYJNEGO CEWNIKA MOCZOWEGO PODDANEGO DZIAŁANIU TOSUFLOKSACYNY

DOROTA KOWALCZUK<sup>1\*</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, UL. JACZEWSKIEGO 4, 20-090 LUBLIN

<sup>2</sup> KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII, UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, UL. CHODŹKI 1, 20-093 LUBLIN

\* E-MAIL: DORKOW@VP.PL

## Abstrakt

Przeciwbakteryjny cewnik moczowy poddany działaniu tosufloksacyiny (TOS) otrzymano przez immobilizację TOS na powierzchni cewnika, uprzednio pokrytego chitozanem, z użyciem aldehydowego łącznika. Całkowitą ilość antybiotyku przyłączonego do chitozanej warstwy oceniono na podstawie różnicy w stężeniu leków, przed i po immobilizacji, zmierzonych metodą HPLC. Jak udowodniły badania uwalniania *in vitro*, antybiotyk został połączony z matrycą cewnika na dwa sposoby: stosunkowo stabilne wiązanie kowalencyjne i słabe wiązanie niekowalencyjne. Aktywność przeciwbakteryjną cewnika modyfikowanego antybiotykiem wobec szczepów *S. aureus* i *E. coli* oceniono stosując test hamowania stref i test liczenia kolonii. Przeprowadzone badania wykazały, że immobilizacja TOS na powierzchni cewnika stanowi stabilną przeciwbakteryjną ochronę przez co najmniej 30 dni.

**Słowa kluczowe:** przeciwbakteryjna ochrona, cewnik moczowy, tosufloksacyina, badanie uwalniania

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 50-53]

## Wprowadzenie

Zakażenia układu moczowego są najczęściej zgłaszanymi zakażeniami szpitalnymi liczącymi do 40% [1,2]. Znaczący procent tych zakażeń jest związany z cewnikami moczowymi. Stosowanie cewników może zakłócać fizjologiczny system obronny układu moczowego umożliwiając kolonizację bakterii, która prowadzi do tworzenia biofilmu i rozwoju infekcji trudnych do zwalczania z użyciem antybiotyków [3].

Z punktu widzenia prewencji, nadrzędną potrzebą jest otrzymanie cewnika z substancją, która zapobiega powstawaniu biofilmu. Uprzednio donosiliśmy o opracowaniu takiego przeciwbakteryjnego cewnika urologicznego ze sparfloksacyiną przyłączoną do heparynowego filmu umieszczonego na jego powierzchni [4].

Celem prezentowanej pracy była ocena immobilizacji TOS na powierzchni nowego przeciwbakteryjnego cewnika moczowego.

# CHARACTERIZATION OF THE NOVEL ANTIMICROBIAL TOSUFLOXACIN-TREATED URINARY CATHETER

DOROTA KOWALCZUK<sup>1\*</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CHAIR AND DEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, JACZEWSKIEGO STREET 4, 20-090 LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, CHODZKI STREET 1, 20-093 LUBLIN, POLAND

\* E-MAIL: DORKOW@VP.PL

## Abstract

*Antimicrobial tosufloxacin (TOS)-treated urinary catheter was developed by the immobilization of TOS on the catheter surface, previously coated with chitosan, by use of aldehyde as linker (according to the patented method). The total amount of the antibiotic attached to the chitosan layer was evaluated on the basis of the difference in the drug concentration before and after immobilization measured by HPLC method. As demonstrated by *in vitro* release studies, the antibiotic was coupled with the catheter matrix in two modes: relatively stable covalent binding and weak non-covalent binding. Antimicrobial activity of the antibiotic-modified catheter against *S. aureus* and *E. coli* strains was assessed using the zone of inhibition and colony count assays. The performed research indicated that the immobilization of TOS on the catheter surface resulted in the stable antibacterial protection for at least 30 days.*

**Keywords:** antimicrobial protection, urinary catheter, tosufloxacin, release study

[*Engineering of Biomaterials*, 106-108, (2011), 50-53]

## Introduction

Urinary tract infections are the most frequently reported nosocomial infections, accounting for up to 40%. A significant percentage of these infections is associated with urinary catheters [1,2]. The use of catheters can interfere with the normal defences of urinary tract, allowing the bacterial colonization which lead to the biofilm formation and infections, which are difficult to eradicate by antibiotics [3].

From a prevention standpoint, the need to develop a catheter with substance that prevents a biofilm formation is paramount. We have previously reported the production of such antimicrobial urological catheter with sparfloxacillin attached to heparin film deposited on its surface [4].

The aim of the present study was to evaluate the immobilization of TOS on the surface of the novel antimicrobial urinary catheter.

## Metody

Fragmenty cewnika lateksowego (około 0,15 g) (Rusch, Malaysia) modyfikowano według procedury opisanej w Zgłoszeniu Patentowym [5].

Celem optymalizacji procesu immobilizacji, zmodyfikowane próbki poddano oddziaływaniu roztworom TOS (CHEMOS GmbH, Germany) o różnych stężeniach 4,0 mg/ml, 2,0 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,2 mg/ml. Roztwory przygotowane do immobilizacji i otrzymane po tym procesie, po odpowiednim rozcieńczeniu, oznaczono metodą HPLC z detekcją UV przy 272 nm (Waters HPLC system).

Badania uwalniania TOS ze zmodyfikowanej powierzchni cewnika przeprowadzono płuczając próbki cewnika, w warunkach intensywnego wstrząsania, w różnych roztworach płuczających (chlorek sodu, bufor fosforanowy o pH 3,5; bufor fosforanowy o pH 8,5) i oznaczając bezpośrednio (bez rozcieńczania) ilość uwolnionego antybiotyku metodą UV-HPLC.

Aktywność przeciwbakteryjną zmodyfikowanych próbek cewników z TOS testowano *in vitro* wobec szczepów bakteryjnych *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25992, z zastosowaniem badania hamowania stref wzrostu bakterii (Mueller-Hinton agar) i liczenia koloni (Mueller-Hinton bulion). Obecność żywych bakterii kontrolowano przyrostem wartości CFU.

## Rezultaty i dyskusja

Przeciwbakteryjne właściwości cewników moczowych otrzymano przez kowalencyjne i niekowalencyjne wiązanie TOS do ich powierzchni, uprzednio pokrytej chitozanem za pomocą aldehydu jako łącznika.

## Methods

A latex catheter segments (about 0.15 g) (Rusch, Malaysia) were modified according to the procedure described in the Polish Patent Pending [5].

With the aim of optimizing the immobilization process, the modified samples were subjected to an impact of TOS (CHEMOS GmbH, Germany) solutions at the different concentrations of 4.0 mg/ml, 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.2 mg/ml. The solutions prepared for the immobilization and the solutions obtained after this process, adequate diluted, were determined by HPLC method with UV-detection at 272 nm (Waters HPLC system).

The release studies of TOS from the modified catheter surface was carried out washing catheter sample, under intense stirring, in various washing solutions (sodium chloride, phosphate buffer at pH 3.5, phosphate buffer at pH 8.5) and determining directly (without diluting) the amount of the released antibiotic by UV-HPLC method.

Antimicrobial activity of the modified catheter samples with TOS was tested *in vitro* against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25992 bacterial strains, using zone of bacterial growth inhibition (Mueller-Hinton agar) and colony count (Mueller-Hinton broth) assays. The presence of living bacteria in broth medium was controlled as a CFU value increase.

## Results and discussion

Antimicrobial properties of the urinary catheters were developed by the covalent and non-covalent binding of TOS to their surface, previously coated with chitosan, by using aldehyde as linker (according to the patented method).

**TABELA 1. Ocena wiązania tosufloksacyny (TOS) na powierzchni zmodyfikowanego cewnika z zastosowaniem metody HPLC; roztwory przed (roztwory A) i po (roztwory B) immobilizacji.**

**TABLE 1. Evaluation of tosufloxacin (TOS) binding on the modified catheter surface with using of HPLC method; solutions before (solutions A) and after (solutions B) immobilization.**

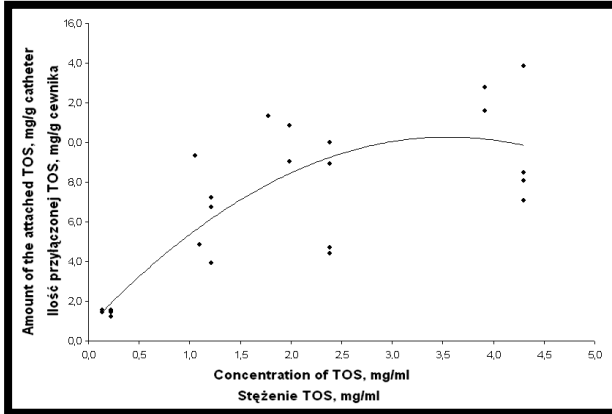
Roztwór A Solution A [mg/ml]	Roztwór B Solution B [mg/ml]	Ilość TOS przyłączona do cewnika / Amount of TOS attached to catheter [mg]	Całkowita ilość TOS przyłączona do cewnika / Total amount of TOS attached to catheter [mg/g ± RSD%]	Wydajność immobilizacji / Immobilization yield [%]
4.2956	3.0758	1.2198	10.3086 ± 27.13	29.31
2.3849	1.4505	0.9344	7.9838 ± 34.37	41.99
1.0971	0.4852	0.6119	7.2315 ± 38.04	55.77
0.2245	0.0573	0.1672	1.4626 ± 8.78	86.36

Całkowitą ilość TOS związaną ze zmodyfikowaną powierzchnią cewnika obliczono na podstawie różnic w stężeniach TOS, przed i po immobilizacji, oznaczonych metodą UV-HPLC (TABELA 1). Ilości TOS przyłączone do biomateriału były różne w zależności od jej stężenia w roztworach użytych do immobilizacji. Ze wzrostem początkowego stężenia leku, wiązanie TOS z nośnikiem stopniowo rosło (RYS. 1), podczas gdy wydajność immobilizacji malała (RYS. 2). Stężenie antybiotyku w zakresie 2-1 mg/ml zostało wybrane jako optymalne do immobilizacji TOS biorąc pod uwagę wydajność tego procesu (około 40-50%) i aktywność przeciwbakteryjną tak zmodyfikowanego cewnika.

Badania uwalniania pokazały, że stosunkowo niewielka część całkowitej, początkowo przyłączonej ilości TOS została wmyta (TABELA 2). Uwalnianie TOS stopniowo malało z każdym kolejnym płukaniem. Sumaryczna ilość TOS uwolniona do roztworów płuczających zmieniła się w zakresie od 0,76 do 4,50%. Stąd można wyciągnąć wniosek, że przyłączenie TOS do zmodyfikowanej powierzchni cewnika jest stosunkowo stabilne.

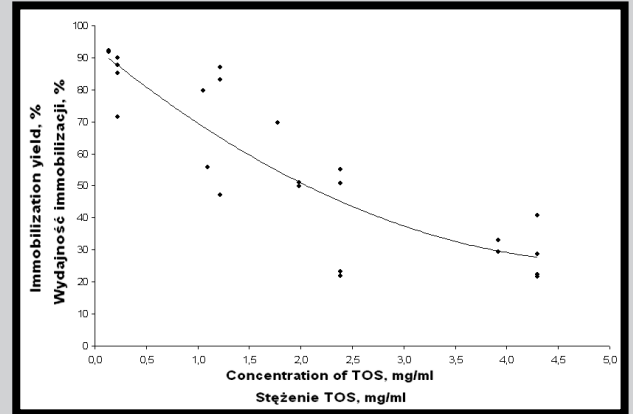
The total amount of the drug bound to the modified catheter surface was calculated on the basis of the differences in TOS concentrations, before and after immobilization, determined by UV-HPLC method (TABLE 1). The quantity of TOS attached to biomaterial was altered by changing its concentration in the solutions used for immobilization. The TOS binding with the carrier was progressively increased (FIG. 1), whereas the immobilization yield was decreased (FIG. 2) as the initial concentration of drug was increased. The antibiotic concentration in the range of 2-1 mg/ml was selected as optimal for immobilization of TOS, taking into account the yield of this process (about 40-50%) and antimicrobial activity of such modified catheter.

The release studies showed that the relatively inconsiderable fraction of the total amount of the initially attached TOS was washed (TABLE 2). The release of TOS was gradually decreased with each successive washing. It was found that the totally added amount of TOS released to washing solvents varied from 0.76 to 4.50%. Hence it can be concluded that TOS attachment to the modified surface of catheter is relatively stable.



**RYS. 1.** Wpływ stężenia TOS w roztworach użytych do immobilizacji na ilość TOS związaną z powierzchnią cewnika.

**FIG. 1.** Influence of TOS concentration in the solutions used for immobilization on the TOS amount attached to the catheter surface.



**RYS. 2.** Wydajność procesu immobilizacji wobec początkowych stężeń TOS.

**FIG. 2.** The yield of immobilization process versus initial TOS concentrations.

**TABELA 2.** Badanie uwalniania tosufloksacyny (TOS), immobilizowanej na cewniku, do różnych roztworów płuczących z zastosowaniem metody UV-HPLC.

**TABLE 2.** The release study of tosufloxacin (TOS), immobilized on the catheter, to the different washing solutions using UV-HPLC method.

Roztwór płuczący / Washing solution	Całkowita ilość TOS związana z cewnikiem / Total amount of TOS attached to catheter	Ilość TOS uwolniona z cewnika / Amount of TOS released from catheter		Ilość TOS pozostająca na cewniku / Amount of TOS remained on catheter	
	[mg]	[mg]	[%]	[mg]	[%]
NaCl	0.25	0.0065	2.49	0.2475	97.51
Bufor fosforanowy 8,5 Phosphate buffer 8.5	0.22	0.0020	0.76	0.2168	99.24
Bufor fosforanowy 3,5 Phosphate buffer 3.5	0.23	0.0117	4.50	0.2145	95.50

Zmodyfikowane próbki z TOS zbadano pod względem ich działania wobec szczepów *S. aureus* i *E. coli* stosując test płytkowy. Strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół próbek z TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 0,2 mg/ml wynosiły 15-20 mm, a dla próbek z TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 2,0 mg/ml wynosiły 30-40 mm. Próbki niemodyfikowane (bez antybiotyku) nie wykazały stref zahamowania wobec wszystkich badanych szczepów. Obecność stref zahamowania wokół próbek zawierających antybiotyki demonstruje, że proces immobilizacji nie zmienił aktywności przeciwbakteryjnej TOS.

Aktywność przeciwbakteryjną zmodyfikowanych próbek z TOS otrzymanych przy stężeniu 1 mg/ml potwierdzono przy użyciu testu cieczowego wobec tych samych szczepów bakteryjnych jak w badaniu płytkowym. Brak wzrostu bakterii może sugerować, że antybiotyk był zdolny dyfundować do bulionu i był aktywny. Próbki zmodyfikowane TOS były chronione przed kolonizacją mikrobów przez 30 dni (*E. coli*) i 27 dni (*S. aureus*).

Na podstawie testów mikrobiologicznych można wyciągnąć wniosek, że aktywność przeciwbakteryjna cewników zmodyfikowanych TOS była spowodowana dyfuzją TOS do agaru i bulionu (niekowalencyjne wiązanie leku) i obecnością TOS na powierzchni (kowalencyjne wiązanie leku).

The samples modified with TOS were examined for their effect against *S. aureus* and *E. coli* strains by using of plate test. The zones of bacterial growth inhibition around the samples with TOS obtained after immobilization in a solution of 0.2 mg/ml were 15-20 mm, and for the samples with TOS obtained after immobilization in a solution of 2.0 mg/ml were 30-40 mm. The unmodified samples (without antibiotic) showed no zones of inhibition against all tested strains. The presence of inhibition zones around antibiotic-containing samples demonstrated that the immobilization process did not change the antimicrobial activity of TOS.

Antimicrobial activity of the modified samples with TOS, obtained at concentration of 1 mg/ml, was confirmed by use of the liquid test against the same bacterial strains as in plate test. The lack of bacterial growth can suggest that antibiotic was able to diffuse into the culture medium and was active. The TOS-modified samples were protected from microbial colonization for 30 days (*E. coli*) and 27 days (*S. aureus*).

From microbiological tests, it can be deduced that the antimicrobial activity of TOS modified catheters was due to the diffusion of TOS into agar and broth media (non-covalent attached drug) and to the presence of TOS on the surface (covalent attached drug).



## Wnioski

Biorąc pod uwagę zapobieganie infekcjom odcewnikowym otrzymaliśmy cewnik z TOS jako substancją przeciwbakteryjną, który chroni przed kolonizacją mikroorganizmów przez co najmniej miesiąc. Ilość TOS związaną z matrycą cewnika oceniono stosując metodę HPLC. Okazało się, że immobilizacja TOS z roztworu w zakresie stężeń między 2 a 1 mg/ml zapewnia jak najbardziej zadowalającą wydajność i skuteczną aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych. Badania uwalniania udowodniły, że wiązanie TOS jest stosunkowo trwałe. Uwalnianie TOS ze zmodyfikowanego cewnika przebiegało stopniowo zachowując aktywność przeciwbakteryjną powierzchni, ponieważ znaczna część TOS pozostawała na cewniku. Taki nośnik zawierający lek unieruchomiony za pośrednictwem mieszanych, kowalencyjnych i niekowalencyjnych wiązań gwarantuje skuteczną ochronę przeciw infekcjom.

## Podziękowania

*Praca sfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Grant Nr N N405 385037).*

## Conclusions

Taking account of the prevention of the catheter-related infections, we developed the catheter with TOS as antibacterial agent that protects from microbial colonization for at least month. The amount of TOS bound to the catheter matrix was evaluated using the HPLC method. We found that immobilization of TOS from the solution in the 2-1 mg/ml concentration range assured the most satisfactory yield and effective antimicrobial activity against gram-negative and gram-positive bacteria. The release studies proved that the binding of TOS is relatively stable. The release of TOS from the modified catheter proceeded gradually maintaining antibacterial activity of the surface because the significant part of TOS remained on the catheter. This carrier containing the drug immobilized via mixed, covalent and non-covalent bonds guarantees the effective protection against infections.

## Acknowledgements

*This work was sponsored by Ministry of Science and Higher Education (Grant No. N N405 385037).*

## Piśmiennictwo

- [1] Chenoweth CE., Saint S. Infections associated with urinary catheters. In: Seifert H., Jansen B., Farr B. (Eds.). Catheter-related infections. Marcel Dekker, New York, 2005.
- [2] Nicolle LE. Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging*. 2005; 22: 627-639.
- [3] Tenke P., Kovacs B., Jäckel M., Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J. Urol.* 2006; 24: 13-20.

## References

- [4] Kowalczyk D., Ginalska G., Golus J. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. *Int J Pharm* 2010; 402: 175-183.
- [5] Kowalczyk D., Ginalska G. Sposób otrzymywania przeciwbakteryjnego biomateriału przez immobilizację na jego powierzchni substancji przeciwbakteryjnej. Zgłoszenie Patentowe Nr P.392616, 2010.

# WPLÝW JONÓW $\text{SiO}_4^{4-}$ NA STRUKTURĘ CHEMICZNĄ ORAZ WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE SYNTETYCZNEGO NANOKRYSTALICZNEGO HYDROKSYAPATYTU

JOANNA KOLMAS\*, ARKADIUSZ PRZYBYLSKI,  
ŁUKASZ PAJCHEL, WACŁAW KOŁODZIEJSKI

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,  
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

\* E-MAIL: JOANNA.KOLMAS@WUM.EDU.PL

## Streszczenie

*W pracy przedstawiono badania struktury chemicznej oraz morfologii nanokrystalicznych hydroksyapatytów: niedomieszkowanego oraz domieszkowanego jonami krzemianowymi  $\text{SiO}_4^{4-}$ . Próbkę do badań uzyskano niekonwencjonalną techniką chemicznej kondensacji w fazie gazowej z wykorzystaniem niskociśnieniowego płomienia (CCVC). Do badań zastosowano mikroskopię elektronową TEM i SEM oraz metody spektroskopii NMR i IR w ciele stałym. Stwierdzono istotny wpływ jonów krzemianowych na strukturę chemiczną hydroksyapatytu.*

**Słowa kluczowe:** krzem, hydroksyapatyt, NMR w ciele stałym, spektroskopia FTIR, mikroskopia elektronowa

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 54-61]

## Wprowadzenie

Apatyty ze względu na wysoką bioaktywność, biogodność i osteokonduktywność stosowane są do tworzenia implantów ceramicznych, materiałów wypełniających ubytki kostne (materiały kościzastępcze), a także cienkowarstwowych powłok na implantach metalicznych [1-2]. Wzorcowym przedstawicielem apatytów jest hydroksyapatyt wapniowy  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , dalej oznaczany jako HA. Przedstawiony wzór chemiczny dotyczy apatytu stechiometrycznego, jednakże cechą charakterystyczną apatytów jest możliwość występowania różnorodnych podstawień (substytucji) jonowych. Wprowadzenie do sieci krystalicznej innych jonów w miejsce jonów  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{OH}^-$  będzie wpływało na strukturę chemiczną, a także na właściwości fizykochemiczne oraz biologiczne hydroksyapatytu [3]. Można w ten sposób uzyskać materiał implantacyjny o poszerzonym działaniu biologicznym, polepszonych parametrach mechanicznych czy fizykochemicznych (wytrzymałość, rozpuszczalność, porowatość, trwałość w wysokich temperaturach) [4-5].

Apatyty domieszkowane krzemem od kilku lat są przedmiotem zainteresowań inżynierii materiałowej i chirurgii odtwórczo-naprawczej. Badania wykazały, że krzem odgrywa znaczącą rolę w formowaniu się tkanki kostnej i prawidłowym jej wapnieniu. Okazało się, że zahamowanie namnażania oraz pogorszenie funkcjonowania osteoblastów w osteopenii oraz osteoporozie jest związane ze zmniejszoną zawartością krzemu w tkance kostnej [6,7]. W związku z tym przypuszcza się, że obecność w hydroksyapatycie krzemu może korzystnie wpływać na interfejs implant/kość zwiększając aktywność osteoblastów, a tym samym poprawiając nowotworzenie tkanki kostnej [8].

# INFLUENCE OF $\text{SiO}_4^{4-}$ IONS ON THE CHEMICAL STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF SYNTHETIC NANOCRYSTALLINE HYDROXYAPATITE

JOANNA KOLMAS\*, ARKADIUSZ PRZYBYLSKI,  
ŁUKASZ PAJCHEL, WACŁAW KOŁODZIEJSKI

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, FACULTY OF PHARMACY,  
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,  
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSAW, POLAND

\* E-MAIL: JOANNA.KOLMAS@WUM.EDU.PL

## Abstract

*This paper reports a systematic investigation on Si-substituted and unsubstituted synthetic hydroxyapatites produced by the NanoSpray™ and combustion chemical vapor condensation (CCVC) process. The studies were focused on structural properties, crystal morphology and chemical composition of the samples. Various analytical methods, such as electron microscopy, high-resolution solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectroscopy were used. A significant effect of silicate ions on the hydroxyapatite structure was found.*

**Keywords:** silicon, hydroxyapatite, solid-state NMR, FT-IR spectroscopy, electron microscopy

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 54-61]

## Introduction

Apatites are widely used in reconstructive surgery as bone substitutes, ceramic implants and thin metallic implant coatings because of their beneficial bioactivity, osseointegration and biocompatibility with the bone tissue [1,2]. The main, representative member of the apatite group is calcium hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , hereafter designated by HA. The presented formula is valid for stoichiometric HA, but the characteristic feature of this mineral is its propensity to undergo various ionic substitutions into the crystal lattice. The incorporation of various ions into the crystal lattice for  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{OH}^-$  determines the chemical structure, physicochemical and biological properties of substituted HA [3]. The ionic substitution may improve implantation efficacy, osseointegration or mechanical properties of a ceramic implant, and extend and diversify its properties (mechanical resistance, solubility, porosity and thermal stability) [4,5].

Silicon substituted apatites are the subjects of intense studies in material engineering and reconstructive surgery. Researches proved a crucial role of silicon in the metabolic process and calcification in bone tissue. Recently, it has been demonstrated that silicon deficiency may cause inhibition of osteoblasts proliferation in osteopenia and osteoporosis [6,7]. Accordingly, it can be assumed that the silicon incorporation into the HA material may improve the implant/bone interface by stimulation osteoblasts activity and bone formation [8].

Hydroksyapatyty domieszkowane krzemem można otrzymać na drodze syntezy różnymi metodami, m.in. metodą zol-żel, metodą moką czy też metodą reakcji w ciele stałym [9-11]. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że metoda syntezy może wpływać na niektóre parametry fizykochemiczne hydroksyapatytu, m.in. na morfologię kryształów i ich wielkość, a także na jego krystaliczność.

Celem naszej pracy jest analiza struktury chemicznej oraz właściwości fizykochemicznych hydroksyapatytu domieszkowanego krzemem, syntetyzowanego z zastosowaniem połączonych metod NanoSpray™ wraz z procesem kondensacji w fazie gazowej z wykorzystaniem niskociśnieniowego płomienia (ang. combustion flame-chemical vapor condensation, CCVC) [12-14]. Ta niekonwencjonalna metoda stosowana jest do otrzymywania nanokrystalicznego hydroksyapatytu bądź amorficznych fosforanów wapnia. Jej zaletą jest możliwość uzyskania materiału jednorodnego morfologicznie, najczęściej w postaci kulistych cząstek. W celu zbadania wpływu obecności krzemu na strukturę hydroksyapatytu, analizie został poddany również hydroksyapatyt zsyntetyzowany w tych samych warunkach bez dodatku krzemu. Badania fizykochemiczne wykonane zostały następującymi metodami analitycznymi: mikroskopią elektronową TEM oraz SEM, spektrometrią emisyjną z plazmą wzbudzoną indukcyjnie ICP-OES, spektroskopią NMR oraz FTIR. Mikroskopia elektronowa pozwoliła na analizę morfologii i wielkości kryształów badanych hydroksyapatytów, a także na ocenę tendencji do tworzenia aglomeratów. Dzięki metodzie ICP-OES zbadano zawartość krzemu w próbce domieszkowanej. Metody magnetycznego rezonansu jądrowego NMR oraz spektroskopii w podczerwieni FTIR w ciele stałym były narzędziami do oceny struktury chemicznej obydwu materiałów.

## Material i metody

W badaniach wykorzystano próbki syntetycznego hydroksyapatytu (HA) oraz syntetycznego hydroksyapatytu domieszkowanego krzemem (Si-HA) (Sigma-Aldrich). Próbkę zsyntetyzowano opatentowaną techniką NanoSpray Combustion™ oraz poddano procesowi kondensacji w fazie gazowej (CCVC). Producent nie dostarcza szczegółowych informacji dotyczących metody otrzymania badanych próbek.

Deklarowana przez producenta zawartość krzemu w próbce Si-HA wynosi  $2,33 \pm 0,93\%$  wag.

W celu zbadania morfologii kryształów otrzymany materiał badano pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym TEM (JEM 1400, Jeol). Kroplę zawiesiny sporządzonej w etanolu umieszczano na miedzianej siateczce pokrytej formvarem, suszono i umieszczano pod mikroskopem. Napięcie przyspieszające wynosiło 80 kV.

Zdolność hydroksyapatytów do tworzenia aglomeratów badano pod skaningowym mikroskopem elektronowym SEM (Quanta 200 ESEM, FEI). Próbkę napyłano złotem, napięcie przyspieszające wynosiło 25 kV.

Krystaliczność hydroksyapatytów analizowano metodą XRD korzystając z dyfraktometru D8 Discover Bruker pracującego z lampą miedziową - promieniowanie Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ ).

Zawartość krzemu została oznaczona metodą ICP-OES (Optima3100, Perkin Elmer) techniką krzywej kalibracji.

Widma w podczerwieni zostały wykonane przy użyciu spektrometru działającego w zakresie średniej podczerwieni od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  (Spectrum 1000, PerkinElmer) w technice transmisyjnej z pastylki z KBr. Widma wykonano z rozdzielczością 2  $\text{cm}^{-1}$ , a liczba wykonanych powtórzeń (skanów) wyniosła 30.

Silicon substituted hydroxyapatite can be synthesized by various methods, i.e. sol-gel methods, wet methods and solid-state reactions [9-11]. Many studies indicate that the way of synthesis may affect various physicochemical properties, such as morphology and sizes of crystals, and material crystallinity.

The present work is focused on the chemical structure and physicochemical properties investigations of two samples: hydroxyapatite and Si-substituted hydroxyapatites. Both samples were synthesized by the NanoSpray and combustion chemical vapor condensation (CCVC) process [12-14]. This unconventional method is used for production of nanocrystalline or amorphous materials. Its great advantage is morphological homogeneity of obtained materials (usual in spherical particles). In order to determine the Si-substitution effect on the HA structure, the unsubstituted sample synthesized in the same conditions was studied as a reference material. This comprehensive study was done using various analytical methods: transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM), inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES), FT-IR spectroscopy in the middle infrared range (transmission mode) and high-resolution solid-state NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  and  $^{29}\text{Si}$  nuclei observed). The electron microscopy provided information on the morphology and crystal sizes, and their tendency to agglomeration. The Si content was analyzed using the ICP-OES method. The solid-state NMR and IR spectroscopy were found suitable for the chemical structural analysis of the apatites.

## Materials and methods

Nanocrystalline hydroxyapatite (HA) and nanocrystalline Si-substituted hydroxyapatite (Si-HA) were purchased from Sigma-Aldrich, Poland. The samples were synthesized by the NanoSpray and combustion chemical vapor condensation (CCVC) process. The manufacturer has not provided more detailed information on the synthesis of HA and Si-HA.

The concentration of silicon in Si-HA sample was declared as  $2.33 \pm 0.93 \text{ wt}\%$ .

Morphology of hydroxyapatite crystals was monitored by transmission electron microscopy TEM (type JEM 1400, Jeol). A drop of sample suspension in EtOH was put on a Cu grid covered with a formvar film, then dried in air. The acceleration voltage was 80 kV.

Agglomeration tendency of crystals was investigated using scanning electron microscopy SEM (Quanta 200 ESEM, FEI). The samples were coated with Au, the accelerating voltage was 25 kV.

Crystallinity of samples was examined by X-Ray powder diffraction (XRD) using D8 Discover Bruker diffractometer with Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ) radiation.

The silicon content was determined by ICP-OES method (Optima3100, Perkin Elmer) using the calibration curve technique.

FT-IR spectra were recorded between 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  in the transmission mode from KBr pellets using a Spectrum 1000 spectrometer of Perkin Elmer. The measurements were done with 2  $\text{cm}^{-1}$  spectral resolution and with 30 scans.

Widma NMR w ciele stałym wykonano w temperaturze pokojowej na spektrometrze Bruker Avance 400 WB (Bruker) o częstości 400, 160 i 80 MHz, odpowiednio dla  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  oraz  $^{29}\text{Si}$ . Eksperymenty  $^1\text{H}$  wykonano przy użyciu sondy do rotorów o średnicy 2,5 mm. Pozostałe eksperymenty przeprowadzono przy użyciu sondy do rotorów o średnicy 4 mm. Wszystkie pomiary zostały przeprowadzone z wirowaniem pod kątem magicznym (MAS). Dla obydwu próbek, HA oraz Si-HA zostały wykonane konwencjonalne eksperymenty jednoimpulsowe na protonach i jądrach fosforu-31 (tzw. eksperymenty Bloch-decay – BD). Pomiary  $^1\text{H}$  BD MAS NMR przeprowadzono z wirowaniem pod kątem magicznym 30 kHz, czas repetycji wynosił 50 s, a liczba powtórzeń 32. Pomiary  $^{31}\text{P}$  BD MAS NMR wykonano przy częstości wirowania 7 kHz, czasie repetycji 30 s i liczbie powtórzeń 32. Dla próbki Si-HA przeprowadzono eksperyment  $^{29}\text{Si}$  BD MAS NMR przy częstości wirowania 5 kHz, czasie repetycji 40 s oraz liczbie skanów 2000. Ponadto, dla próbki zawierającej krzem wykonano eksperyment z polaryzacją skrośną od protonów do krzemu-29, pozwalający na wzmocnienie sygnałów od jąder krzemu-29 znajdujących się w pobliżu protonów. Eksperyment  $^1\text{H}\rightarrow^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR wykonano przy częstości wirowania 5 kHz, czasie repetycji 5 s, czasie kontaktu 2 ms i liczbie powtórzeń 14400. Przesunięcie chemiczne dla protonów oraz  $^{29}\text{Si}$  mierzono względem TMS, dla fosforu-31 względem 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

## Wyniki i dyskusja

### Mikroskopia elektronowa, dyfraktometria proszkowa XRD oraz analiza zawartości krzemu

Na RYS. 1 (a oraz b) przedstawiono obrazy badanych materiałów HA oraz Si-HA uzyskane pod mikroskopem elektronowym TEM. Jak widać, obydwie próbki są nanokryształiczne. Kryształy charakteryzują się regularnym, kulistym kształtem, co jest charakterystyczne dla zastosowanej w procesie syntezy techniki CCVC. Średnica kryształów w obydwu materiałach jest dość zróżnicowana i waha się w granicach 20-120 nm.

Zdjęcia uzyskane pod mikroskopem SEM (RYS. 1c i 1d) wskazują jednoznacznie na silną tendencję do tworzenia aglomeratów przez kryształy badanych hydroksyapatytów. Wydaje się, że próbka HA jest bardziej zwarta, kryształy są bardziej zbite, natomiast domieszkowanie hydroksyapatytu krzemem powoduje „rozluźnienie” tej swoistej makrostruktury.

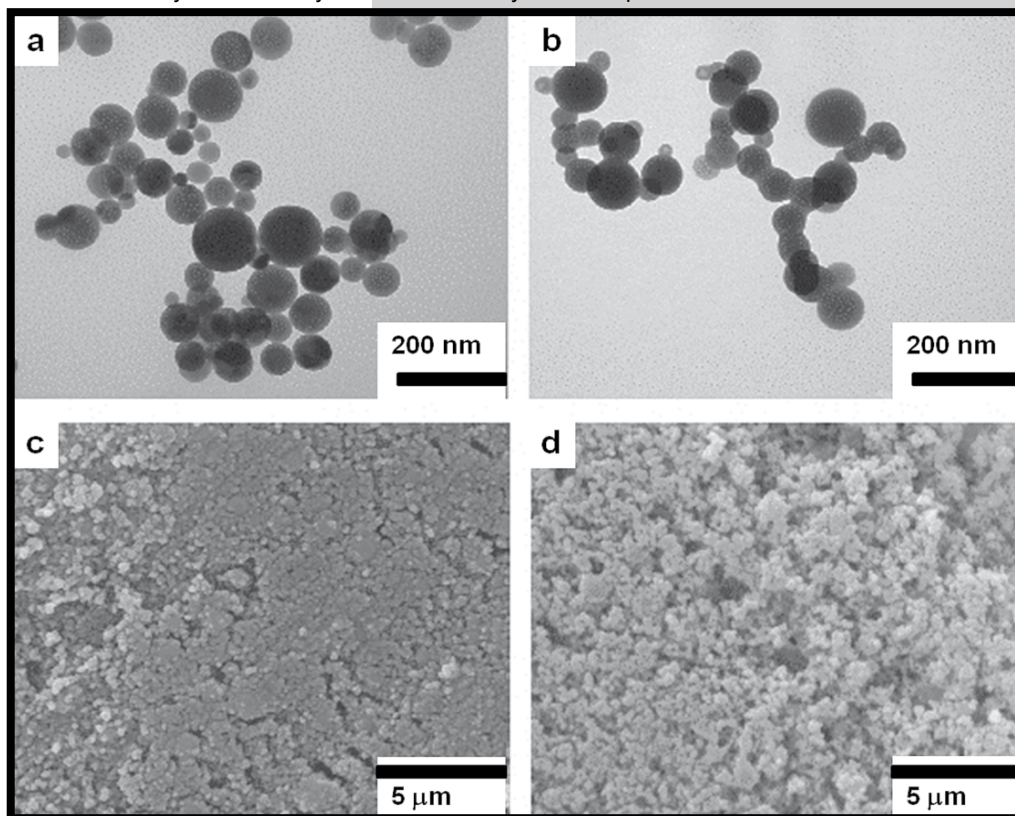
High-resolution solid-state NMR spectra were measured at 298 K using a Bruker Avance 400 WB spectrometer at resonance frequencies of 400, 160 and 80 MHz for  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  and  $^{29}\text{Si}$ , respectively. The proton spectra were acquired using a 2.5 mm probe. Other spectra were acquired using a 4 mm probe. The experiments were done under magic-angle spinning (MAS) using  $\text{ZrO}_2$  rotors driven by dry air. For both HA and Si-HA samples, conventional pulse-acquire experiments (Bloch-decay, acronym BD) were done on protons and phosphorus-31. The proton BD/MAS NMR spectra were recorded with MAS at 30 kHz and a repetition time of 50 s, using 32 scans. The  $^{31}\text{P}$  BD/MAS NMR spectra were recorded with MAS at 7 kHz and a repetition time of 30 s, using 32 scans. For Si-HA, the  $^{29}\text{Si}$  BD/MAS NMR spectrum was recorded with MAS at 5 kHz and a repetition time of 40 s, using 2000 scans. Moreover, for that sample, we have also done an experiment with cross-polarization (CP) from protons, which enhances signals from  $^{29}\text{Si}$  nuclei having nearby protons. The  $^1\text{H}\rightarrow^{29}\text{Si}$  CP/MAS NMR spectrum was recorded with MAS at 5 kHz and repetition time of 5 s, using a contact time of 2 ms and 14400 scans. Proton and  $^{29}\text{Si}$  chemical shifts were referenced to TMS, while  $^{31}\text{P}$  chemical shifts were referenced to 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

## Results and discussion

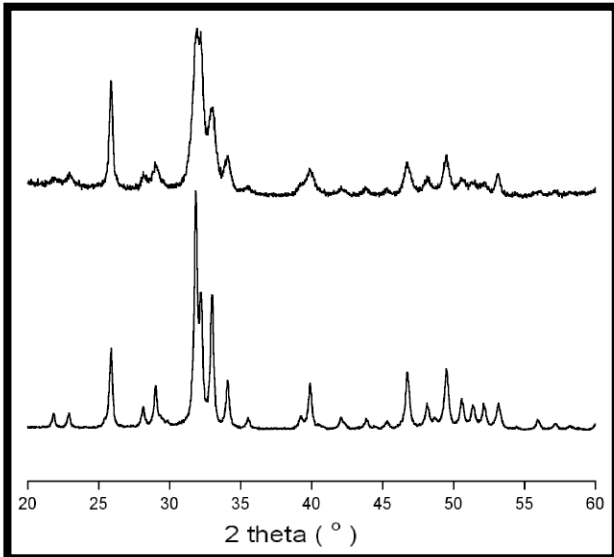
### Electron microscopy, X-ray powder diffraction and silicon content analysis

The TEM images of HA and Si-HA materials are presented in FIG. 1a and 1b. Samples are composed of regular, spherical particles, typical of the CCVC synthetic method. The obtained materials are nano-sized powders with 20-120 nm particles (on average).

The SEM images (FIG. 1c and 1d) show crystal aggregation. Both samples, HA and Si-HA, form dense grains. However, the Si-HA powder macrostructure seems to be more fluffy and less packed.



RYS. 1. Zdjęcia TEM (a, b) oraz SEM (c, d) próbki HA (a, c) i Si-HA (b, d).  
FIG. 1. TEM (a, b) and SEM (c, d) images of HA (a, c) and Si-HA (b, d).



**RYS. 2. Dyfraktogramy proszkowe próbki HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry).**  
**FIG. 2. XRD diffractograms of HA (bottom) and Si-HA (top).**

W celu potwierdzenia tożsamości analizowanych materiałów wykonano badania metodą dyfraktometrii proszkowej (RYS. 2). Obydwie próbki nie wykazały cech obecności dodatkowej fazy krystalicznej. Dość szerokie, ale dobrze rozdzielone refleksy na dyfraktogramie próbki HA wskazują na obecność fazy słabokrystalicznego hydroksyapatytu. Dyfraktogram próbki Si-HA zawiera znacznie szersze refleksy i słabiej rozdzielone, co świadczy o niższym stopniu krystaliczności próbki domieszkowanej krzemem. Korzystając ze wzoru Scherrera uwzględniającego poszerzenie refleksów na dyfraktogramie można było oszacować wielkość kryształów w badanych materiałach. Średnia wielkość kryształów w próbce niedomieszkowanej krzemem wynosi 31 nm, natomiast w próbce zawierającej jony krzemianowe 20 nm.

W hydroksyapatycie Si-HA została oznaczona zawartość krzemu metodą ICP-OES na poziomie 2,43%. Otrzymana przez nas wartość jest zgodna ze specyfikacją analizowanego materiału, gdzie deklarowana zawartość krzemu wynosi  $2,33 \pm 0,93\%$  wag.

### Spektroskopia w podczerwieni

Widma IR uzyskane techniką transmisyjną przedstawiono na RYS. 3. W obydwu widmach dominują pasma fosforanów w zakresie  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  pochodzące od drgań  $\nu_1$  i  $\nu_3$  oraz w zakresie  $650-500\text{ cm}^{-1}$  pochodzące od drgań  $\nu_4$  [15]. Należy zauważyć, że widma w tych zakresach różnią się szerokością i rozdzielaniem pasm. Widmo HA charakteryzuje się znacznie węższymi pasmami drgań grup fosforanowych, a w zakresie  $\nu_4$  można łatwo wyróżnić dwie składowe. Z dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że wąskie pasma  $\nu_1$  i  $\nu_3$  a także dobrze rozdzielony zakres  $\nu_4$  charakteryzują apatyty o wysokim stopniu krystaliczności [16-17]. Widmo próbki Si-HA w zakresie  $650-500\text{ cm}^{-1}$  jest praktycznie nierozdzielone, a złożone pasmo w zakresie  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  jest bardzo szerokie. Świadczyć to może o dużym udziale fazy amorficznej w badanym materiale i/lub o niskiej krystaliczności badanego hydroksyapatytu.

Zakres  $3700-2500\text{ cm}^{-1}$  odpowiada draniom rozciągającym wolnych, niezwiązanych wiązaniami wodorowymi strukturalnych grup OH<sup>-</sup> apatytu oraz od molekuł wody zaadsorbowanej na powierzchni apatytu lub ułożonych w wakacjach jego sieci krystalicznej [15].

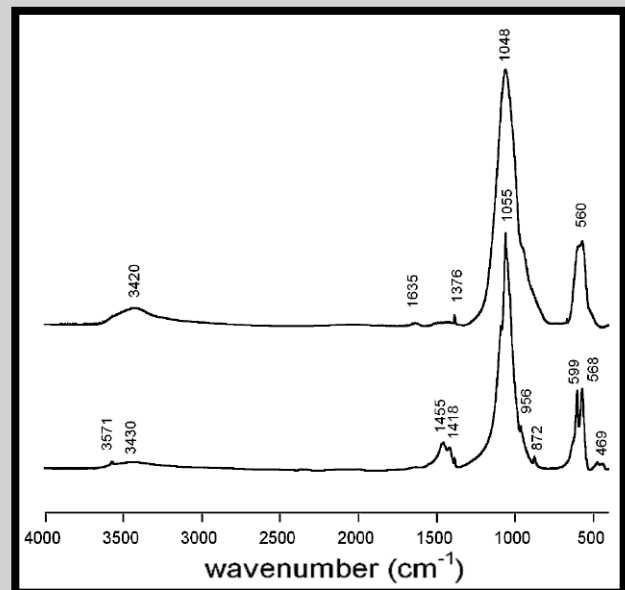
To confirm chemical identity of the analyzed samples, the XRD experiments were performed (FIG. 2). The powder diffraction patterns ruled out the presence of extra crystalline phases. Broad but sufficiently resolved peaks in the HA patterns indicated that the unsubstituted material was poorly crystalline. The Si-HA diffractogram contained broader and poorly resolved peaks giving evidence of even less crystalline material than in the HA sample. The peak broadening of the XRD reflections was used to estimate the crystallite size according to the Scherrer's formula. The average crystal sizes were estimated at 31 and 20 nm in the HA and Si-HA samples, respectively.

In the Si-HA sample, silicon content was determined using the ICP-OES method as 2.43 wt%, which result agrees well with the value declared in the material specification ( $2.33 \pm 0.93\%$ ).

### Infrared spectroscopy

The IR spectra recorded in the transmission mode are presented in FIG. 3. Both our spectra contain prominent phosphate  $\nu_1$  and  $\nu_3$  bands in the  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  range, and  $\nu_4$  bands in the  $650-500\text{ cm}^{-1}$  range [15]. Consider that the observed phosphate bands differ in resolution and width, which is indicative of the sample crystallinity. It has been shown that those bands are broader and worse resolved in less crystalline samples [16,17]. In our case, the phosphate ( $\nu_1 + \nu_3$ ) bands of Si-HA are broader and its  $\nu_4$  bands worse resolved (the splitting has disappeared) than those of HA. In accordance with the former XRD results, one may conclude that the Si-HA powder is poorly crystalline and can contain a significant amount of amorphous phase.

The  $3700-2500\text{ cm}^{-1}$  region corresponds to stretching vibrations, both from apatite structural hydroxyl groups and from water, the latter adsorbed on the apatite surface and/or located in crystal vacancies. Free structural hydroxyl groups (those uninvolved in hydrogen bonding) give a narrow band at ca.  $3570\text{ cm}^{-1}$ . Such band is only detectable in the HA spectrum. In the HA spectrum, the broad water band over  $3000\text{ cm}^{-1}$  is very weak and the water bending band at  $1640\text{ cm}^{-1}$  is hardly visible. In the Si-HA spectrum we can easily detect both water bands. This fact indicates that the water content is higher in the Si-HA material.



**RYS. 3. Widma FT-IR próbek HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry).**  
**FIG. 3. FT-IR spectra of HA (bottom) and Si-HA (top).**

Strukturalne grupy OH<sup>-</sup> (nie zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych) dają wąskie pasmo przy ok. 3570 cm<sup>-1</sup>, które widoczne jest wyłącznie w widmie próbki HA. Szerokie pasmo drgań grup OH<sup>-</sup> wody jest bardzo słabe na widmie HA, niewidoczne jest także pasmo drgań zginających wody przy ok. 1640 cm<sup>-1</sup>. W widmie Si-HA pasma wody przy 3700-2500 cm<sup>-1</sup> oraz 1635 cm<sup>-1</sup> są wyraźne, co świadczy o większej zawartości wody w tym materiale. Brak pasma przy 3570 cm<sup>-1</sup> w widmie Si-HA może być wynikiem niskiej zawartości strukturalnych grup hydroksylowych. Należy tutaj podkreślić, że wprowadzenie jonów krzemianowych SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> w miejsce jonów fosforanowych wymaga zbilansowania ładunku w sieci krystalicznej hydroksyapatytu. W związku z tym w procesie takiej substytucji może dochodzić do usuwania części jonów hydroksylowych [18].

Warto też zauważyć, że w widmie HA widoczne są dość intensywne pasma w zakresie 1550-1400 cm<sup>-1</sup> odpowiadające drganiom jonów węglanowych, podczas gdy w widmie Si-HA są one śladowe. Jony węglanowe są podstawowym „zanieczyszczeniem” w hydroksyapatytach syntetycznych, dość łatwo podstawiają się zarówno w miejsce grup fosforanowych jak i hydroksylowych [19]. Korzystając z metody opisanej przez Clasen i Ruytera [20] możliwe było oszacowanie zawartości węglanów zajmujących miejsce grup OH<sup>-</sup> (typ A) oraz grup PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (typ B). Zawartość węglanów typu A w próbce HA wynosi ok. 0,4% wag., natomiast węglanów typu B ok. 2,1% wag. Znaczne obniżenie zawartości jonów CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> w próbce Si-HA może świadczyć o ich konkurowaniu z jonami SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> w procesie substytucji jonów PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> podczas syntezy tego materiału.

### Spektroskopia NMR w ciele stałym

RYS. 4 przedstawia widma <sup>31</sup>P NMR uzyskane dla obydwu próbek konwencjonalną techniką jednoimpulsową BD NMR. Próbka HA daje niesymetryczny sygnał główny przy ok. 3,2 ppm. Na lewym zboczku widać dodatkowy sygnał niewielkiej intensywności przy ok. 6,7 ppm. Praca Jarbrlinga i in. [21] oraz praca Kolmas i in. [22] pokazują, że główny sygnał pochodzi od fosforu znajdującego się we wnętrzu kryształu hydroksyapatytu, natomiast sygnał po lewej stronie reprezentuje nieprotonowane grupy fosforanowe znajdujące się na powierzchni. Uzyskany sygnał przy 3,4 ppm dla próbki Si-HA jest bardzo szeroki i symetryczny. Jednak bliższa analiza sygnału wskazuje na obecność sygnałów bocznych po obydwu stronach sygnału głównego odpowiadających nieprotonowanym (lewe zbocze) i protonowanym (prawe zbocze) powierzchniowym grupom fosforanowym. Możemy więc przypuszczać, że próbka jest słabo krystaliczna i charakteryzuje się niskim stopniem uporządkowania w sieci krystalicznej i dużą zawartością powierzchniowych grup fosforanowych.

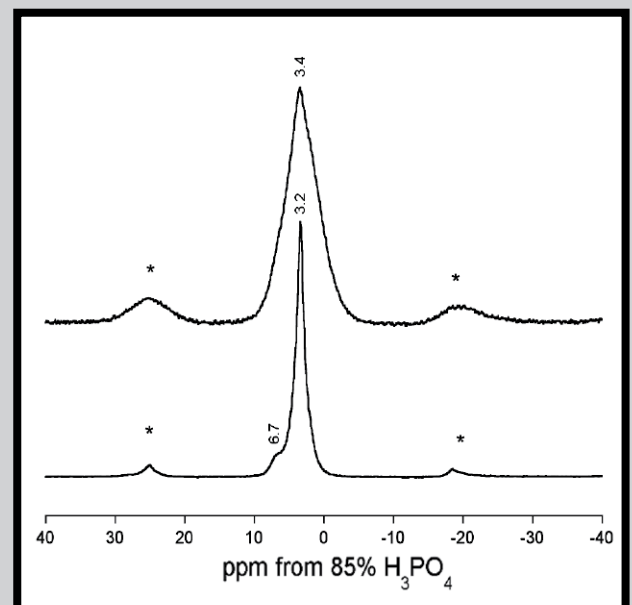
Widma protonowe z zastosowaniem szybkiego wirowania pod kątem magicznym przedstawiono na RYS. 5. Obydwa otrzymane widma są złożone z kilku składowych, niektórych z nich przypisania nadal są dyskutowane w literaturze [23,24]. Należy zauważyć, że sygnał pochodzący od protonów strukturalnych grup hydroksylowych widoczny jest przy ok. 0,1 ppm. Stosując metodę opisaną przez nas w pracy [25] możliwe było oszacowanie zawartości grup OH<sup>-</sup> w badanych materiałach. Wykonane obliczenia pokazały, że w materiale niedomieszkowanym HA zawartość strukturalnych grup hydroksylowych wynosi ok. 40%, natomiast w próbce zawierającej jony krzemianowe ok. 10% względem stechiometrycznego hydroksyapatytu. Tak mała zawartość grup OH<sup>-</sup> w hydroksyapatytach badanych może wydawać się zaskakująca. Przede wszystkim należy jednak pamiętać, że badane próbki są nanokrystaliczne. W literaturze można znaleźć hipotezę dotyczącą wpływu wielkości kryształów na zawartość grup OH<sup>-</sup> [26].

The band from free structural OH<sup>-</sup> groups of Si-HA has not been detected, probably because of their deficiency in this material. The decreased content of the structural OH<sup>-</sup> groups is related to the silicon incorporation into the hydroxyapatite. It is simply a matter of a charge balance in the crystal lattice, since the SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> substitution requires simultaneous elimination of the structural OH<sup>-</sup> groups [18].

Let us focus now on distinctive bands in the 1550-1400 cm<sup>-1</sup> region of the HA spectrum. They correspond to carbonate ions, often present as “contamination” of synthetic hydroxyapatites. Carbonates can easily be incorporated into the crystal lattice, both for phosphates and structural OH<sup>-</sup> groups [19]. Using the Clasen and Ruyter method [20], it was possible to determine contents of carbonate groups in HA, which replaced hydroxyl (A-type carbonates) and phosphate (B-type carbonates) groups. The estimation gave 0.4 and 2.1 wt%, respectively. Consider that for Si-HA the carbonate bands are much lower than for HA. This is a hint that, during the Si-HA synthesis and the concomitant substitution processes, carbonates may compete with silicates for the phosphate sites.

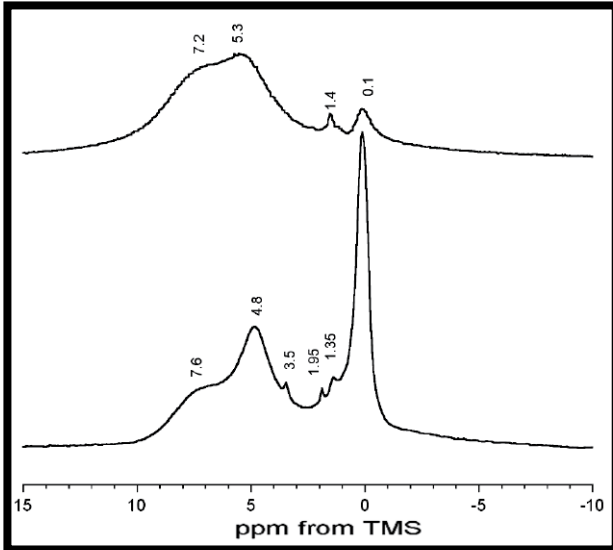
### Solid-state NMR spectroscopy

FIG. 4 shows the <sup>31</sup>P MAS NMR spectra recorded using conventional pulse-acquire (BD) technique. The HA sample gives one central peak at ca. 3.2 ppm with a minor high-frequency component at ca. 6.7 ppm. According to Jarbrling et al. and our previous work [21,22] the main peak comes from bulk phosphate groups buried in the crystal interior, whereas the left-side peak can be assigned to unprotonated phosphate groups on the crystal surface. The Si-HA signal at ca. 3.4 ppm is significantly broader and for this reason looking quite symmetric. However, a closer inspection suggests that within the base this signal contains side peaks from unprotonated (left slope) and protonated (right slope) surface phosphate groups [21,22]. Thus, we can assume that the Si-containing sample is poorly crystalline, with substantial disorder in the crystal lattice and rich in unprotonated and protonated surface phosphate groups.



RYS. 4. Widma <sup>31</sup>P BD/MAS NMR próbek HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry). Gwiazdki oznaczają rotacyjne pasma boczne.

FIG. 4. <sup>31</sup>P BD/MAS NMR spectra of HA (bottom) and Si-HA (top). Asterisks denote rotational sidebands.



**RYS. 5. Widma  $^1\text{H}$  BD/MAS NMR próbek HA (u dołu) oraz Si-HA (u góry).**  
**FIG. 5.  $^1\text{H}$  BD/MAS NMR spectra of HA (bottom) and Si-HA (top).**

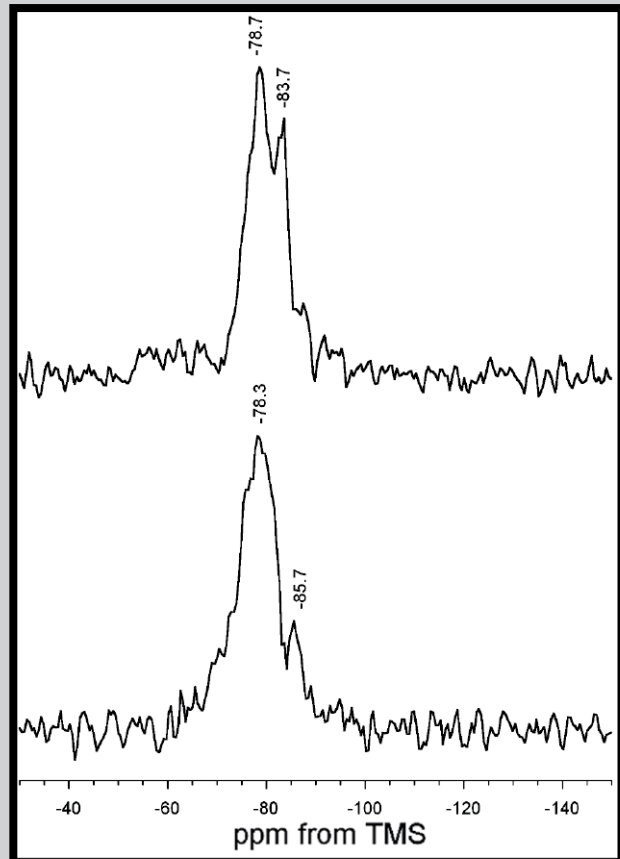
Dodatkowo wpływ może również mieć niekonwencjonalna metoda syntezy CCVC. Badany materiał oprócz fazy krystalicznej może zawierać fazę amorficzną, zubożoną w strukturalne grupy hydroksylowe. Obniżenie zawartości grup  $\text{OH}^-$  w próbce Si-HA wynika dodatkowo z usuwania ich z sieci krystalicznej podczas substytucji jonów fosforanowych jonami krzemianowymi.

Warto zauważyć, że w obydwu próbkach obecne są „średnio” kwaśne grupy wodorofosforanowe (na widmach widoczne są sygnały w zakresie 7,2-7,6 ppm). Grupy P-OH mogą znajdować się na powierzchni kryształów hydroksyapatytu, bądź też jony  $\text{HPO}_4^{2-}$  mogą zajmować wakancje w zaburzonej sieci krystalicznej [27]. Na widmach obydwu materiałów HA oraz Si-HA widoczny jest sygnał pochodzący od wody (odpowiednio przy ok. 4,8 oraz 5,3 ppm). Znacząca różnica w przesunięciu chemicznym sygnału wody może wynikać z różnego stopnia związania wody w badanych próbkach. Wydaje się, że hydroksyapatyt niedomieszkowany krzemem zawiera przede wszystkim wodę silnie związaną (sygnał przy 4,8 ppm), natomiast hydroksyapatyt krzemowy również wodę słabiej zaadsorbowaną na powierzchni [23].

W celu oceny lokalizacji jonów krzemianowych w próbce domieszkowanej krzemem wykonano eksperymenty  $^{29}\text{Si}$  NMR dwiema technikami: standardową jednoimpulsową oraz techniką z polaryzacją skrośną (RYS. 6). Ogólnie można powiedzieć, że eksperyment jednoimpulsowy daje informacje o całej puli jąder krzemu-29 w materiale, natomiast eksperyment z polaryzacją skrośną promuje jądra krzemu znajdujące się w pobliżu protonów. Na widmie Si-HA wykonanym techniką BD (RYS. 6) obecne są dwa sygnały przy -78,3 ppm oraz przy -85,7 ppm (wykonane dopasowanie linii pokazało, że jądra krzemu-29 dające sygnał przy -78,3 ppm stanowią ok. 90% całej puli jąder krzemu w próbce). Zgodnie z danymi z literatury sygnał przy -78,3 ppm można przypisać grupom krzemianowym podstawionym w miejsce grup fosforanowych [28,29]. Trudno przypisać drugi sygnał przy -85,7 ppm. W widmie wykonanym techniką CP (RYS. 6) jest on bardziej intensywny i przesuwają się w stronę wyższych przesunięć chemicznych (-83,7 ppm). Można więc przypuszczać, że sygnał ten pochodzi od krzemu na powierzchni kryształów apatyty. Jądra te mogą polaryzować się od protonów wody zaadsorbowanej na powierzchni materiału i stąd wzmocnienie tego sygnału w widmie CP.

The proton spectra recorded under fast magic angle spinning (MAS) are shown in FIG. 5. Both spectra contain several peaks, some of them with uncertain assignments still discussed in the literature [23,24]. The signal originating from structural hydroxyl groups was found at ca. 0.1 ppm. According to the procedure described in our previous work [25], we have estimated contents of the structural  $\text{OH}^-$  groups in the HA and Si-HA samples at 40 and 10%, respectively, comparing to the stoichiometric hydroxyapatite. Such low  $\text{OH}^-$  concentrations may be surprising, but one has to consider that the studied samples were nanocrystalline. Some authors postulate that the  $\text{OH}^-$  group content in hydroxyapatite decreases with the crystals size [26]. Moreover, in this case, the effect of the unconventional CCVC synthetic process may be of the crucial importance. The studied materials could probably comprise an amorphous calcium phosphate phase deficient in structural hydroxyl groups. We would like to emphasize that the significant decrease of the  $\text{OH}^-$  content in the Si-HA sample may be caused by the silicate incorporation.

In the both proton spectra (FIG. 5), there are clearly visible signals at 7.2-7.6 ppm from moderately acidic hydrogenophosphate groups. The P-OH groups can protrude from the crystal surface of hydroxyapatite, whereas  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions can be located in vacancies of the disordered crystal lattice [27]. The proton signal of water is present in the HA and Si-HA spectra at ca. 4.8 and 5.3 ppm, respectively. This noticeable difference in chemical shifts may result from different types of water, contributing to those resonances. It seems that the unsubstituted HA predominantly contains strongly adsorbed water (signal at ca. 4.8), whereas the Si-HA sample has more loosely-adsorbed liquid-like water on the crystal surface [23].



**RYS. 6. Widma  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR próbki Si-HA zarejestrowane techniką BD (u dołu) oraz CP (u góry).**  
**FIG. 6.  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR spectra of Si-HA recorded using BD and CP techniques.**

## Podsumowanie i wnioski

W pracy wykonano badania strukturalne nanoapatytów, niedomieszkowanego (HA) i domieszkowanego krzemem (Si-HA), zsyntetyzowanych kompleksową metodą NanoSpray™ CCVC. Wyniki tych badań można podsumować następująco:

- próbki HA oraz Si-HA są morfologicznie do siebie zbliżone. Charakteryzują się kulistymi, regularnymi kryształami o wielkości 20-120 nm. Kryształy wykazują tendencję do tworzenia gęstych skupisk,
- zawartość krzemu w materiale domieszkowanym Si-HA jest zgodna z deklarowaną przez producenta i wynosi ok. 2,42 % wag.,
- krzem zlokalizowany jest zarówno na powierzchni (ok. 10%), jak i wewnątrz kryształów hydroksyapatytu,
- hydroksyapatyty HA oraz Si-HA cechują się słabą krystalicznością, podstawienie jonów fosforanowych jonami krzemianowymi powoduje obniżenie stopnia krystaliczności,
- obydwa materiały różnią się znacznie zawartością strukturalnych grup hydroksylowych od stechiometrycznego hydroksyapatytu (HA – 40%, Si-HA – 10% względem stechiometrycznego hydroksyapatytu),
- podstawienie jonów fosforanowych jonami krzemianowymi powoduje obniżenie zawartości grup OH w sieci krystalicznej, co wynika najprawdopodobniej z usuwania tych grup w celu zbilansowania ładunku,
- wyłącznie próbka niedomieszkowana krzemem zawiera jony węglanowe, jony te prawdopodobnie konkurują z jonami krzemianowymi w podstawianiu jonów fosforanowych,
- obydwa analizowane materiały zawierają „średnio” kwaśne grupy wodorofosforanowe ( $\delta^H = 7,2-7,6$  ppm),
- materiał domieszkowany krzemem zawiera więcej wody niż próbka HA.

## Podziękowania

*Autorzy składają serdeczne podziękowanie dr Marzenie Kuras (WUM) za pomoc w analizie zawartości krzemu metodą ICP-OES, a także dr Mirosławowi Salamończykowi (Laboratorium Badań Strukturalnych UW) za pomiary metodą XRD. Przedstawione w pracy badania zostały sfinansowane ze środków MNiSW (1270/B/H03/2009/37). Badania TEM zostały przeprowadzone w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IBD PAN w Warszawie. Mikroskop TEM JEM 1400 (Jeol Co., Japan, 2008) został zakupiony z funduszy strukturalnych UE w ramach projektu CZT BIM - Wyposażenie Laboratorium Obrazowania Biologicznego i Medycznego.*

In order to obtain information on the location of the  $\text{SiO}_4^{4-}$  ions in Si-HA, the  $^{29}\text{Si}$  NMR experiments were performed (FIG. 6). The spectra were measured using two different techniques: conventional pulse-acquire (BD) and cross-polarization (CP) pulse sequences. Generally, the BD lines are from all the  $^{29}\text{Si}$  nuclei in the samples, while the CP lines come from the  $^{29}\text{Si}$  nuclei located close to protons. In the BD spectrum, two signals at ca. -78.3 and -85.7 ppm are observed, with the area ratio 9:1 (curve-fitting not shown). According to the literature, the signal at ca. -78.3 ppm originates from silicates substituted for phosphates into the apatite crystal lattice [28,29]. The assignment of the -85.7 ppm peak is not trivial. Consider that in the CP spectrum this line is relatively stronger than in the BD spectrum and shifted to -83.7 ppm. Thus we can assume that this signal corresponds to the silicon nuclei located at the crystal surface. Such species cross-polarize from protons of adsorbed water, so they give enhanced peaks in the CP spectrum.

## Summary and conclusions

We have carried out comprehensive structural examination of nanoapatites, regular (HA) and Si-doped (Si-HA), both synthesized using the combined NanoSpray™ - CCVC method. The main conclusions of our studies can be summarized as follows:

- The HA and Si-HA samples were morphologically similar. They contained regular spherical crystals of the 20-120 nm size. The crystals in both apatites were agglomerated into dense grains.
- The measured silicon content in the Si-HA sample (2.42 wt%) was in good agreement with the specification value.
- In Si-HA, silicate ions were present on the crystal surface (ca. 10%) and were incorporated into the crystal lattice.
- The HA and Si-HA samples were poorly crystalline; the crystallinity (reflecting crystal size and lattice order) decreased with the silicate substitution.
- The concentrations of the structural hydroxyl groups in the HA and Si-HA samples were estimated at 40 and 10%, respectively, in reference to stoichiometric hydroxyapatite.
- The silicate substitution for phosphates significantly reduced concentration of the structural hydroxyl groups. This was probably caused by the requirement to maintain electric charge balance in the crystal lattice, disturbed by such substitution.
- The HA sample contained carbonate ions, while in Si-HA they were practically absent. Carbonates may compete with silicates for the phosphate sites.
- Both studied materials contained moderately acidic hydrogenphosphate groups (proton chemical shifts in the range 7.2-7.6 ppm).
- The water content in Si-HA was higher than in HA.

## Acknowledgements

*The authors are grateful to dr Marzenia Kuras (WUM) and to dr Mirosław Salamończyk (UW) for their help in the ICP-OES and XRD analyses, respectively. This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education: grant number 1270/B/H03/2009/37. The TEM studies were performed in the Laboratory of Electron Microscopy, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland. We used equipment installed within the project sponsored by the EU Structural Funds: Centre of Advanced Technology BIM – Equipment purchase for the Laboratory of Biological and Medical Imaging.*



## Piśmiennictwo

- [1] Dorozhkin S.V.: Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, *Materials*, 2, 2009, 399-498.
- [2] Ślósarczyk A.: Bioceramika hydroksyapatytowa, *Biuletyn Ceramiczny* 13, *Ceramika*, 51, Polskie Towarzystwo Ceramiczne, Kraków, 1997.
- [3] Boanini E., Gazzano, M., Bigi, A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomaterialia*, 6, 2010, 1882-1894.
- [4] Cazalbou S., Eichert D., Ranz X., Drouet C., Combes C., Harmand M.F., Rey C., Ion exchanges in apatites for biomedical applications, *J Mater Sci Mater Med*, 16, 2005, 405-409.
- [5] Veiderma M., Tonsuaadu K., Knubovets R., Peld M., Impact of anionic substitutions on apatite structure and properties, *J Organomet Chem*, 690, 2005, 2638-2643.
- [6] Carlisle E.M., The nutritional essentiality of silicon, *Nutr Rev*, 40(7), 1982, 193-198.
- [7] Schwarz K., Significance and function of silicon in warm blooded animals. Review and outlook. In: Bendz G., Lindqvist I., editors. *Biochemistry of silicon and related problems*, Plenum Press, New York, 1978.
- [8] Gibson I.R., Best S.M., Bonfield W., Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res*, 44, 1999, 422-428.
- [9] Kim S.R., Lee J.H., Kim Y.T., Riu D.H., Jung S.J., Lee Y.J., Chung S.C., Kim Y.H., Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors, *Biomaterials*, 24, 2003, 1389-1398.
- [10] Bianco A., Cacciotti I., Lombardi M., Montanaro L., Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sinterability, *Mater Res Bull*, 44, 2009, 345-354.
- [11] Palard M., Champion E., Foucaud S., Synthesis of silicate hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ , *J Solid State Chem*, 181, 2008, 1950-1960.
- [12] Swihart M.T., Vapor-phase synthesis of nanoparticles, *Curr Opin Colloid Interf Sci*, 8, 2003, 127-133.
- [13] Chang W., Skandan G., Danforth S.C., Kear B.H., Hahn H., Chemical vapor processing and applications for nanostructured ceramic powders, *Nanostruct Mater*, 4, 1994, 507-520.
- [14] Loher S., Stark W.J., Maciejewski M., Baiker A., Pratsinis S.E., Reichardt D., Maspero F., Krumeich F., Günter D., Fluoroapatite and calcium phosphate nanoparticles by flame synthesis, *Chem Mater*, 17, 2005, 36-42.
- [15] Koutsopoulos S., Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods, *J Biomed Mater Res*, 62(4), 2002, 600-612.

## References

- [16] Rey C., Shimizu M., Collins B., Glimcher M.J., Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the epsilon 4 PO4 domain, *Calcif Tissue Int*, 46(6), 1990, 384-394.
- [17] Termine J.D., Posner A.S., Infra-red determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates, *Nature*, 211, 1966, 268-270.
- [18] Tian T., Jiang D., Zhang J., Lin Q., Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite by a wet mechanochemical method, *Mater Sci Eng C*, 28, 2008, 57-63.
- [19] Brown P.W., Brent C., *Hydroxyapatite and related materials*, CRC press, Boca Raton, 1994.
- [20] Clasen A.B.S., Ruyter I.E., Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier Transform Infrared Spectrometry, *Adv Dent Res*, 11(4), 1997, 523-527.
- [21] Jarlbring M., Sandström D.E., Antzutkin O.N., Forsling W., Characterization of active phosphorus surface sites at synthetic carbonate-free fluorapatite using single-pulse  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ , and  $^{31}\text{P}$  CP MAS NMR, *Langmuir*, 22, 2006, 4787-4792.
- [22] Kolmas J., Ślósarczyk A., Wojtowicz A., Kolodziejki A., Estimation of the specific surface area of apatites in human mineralized tissue using  $^{31}\text{P}$  MAS NMR, *Solid State NMR*, 32, 2007, 53-58.
- [23] Kafak-Hachulska A., Samoson A., Kolodziejki W.,  $^1\text{H}$  MAS and  $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$  CP/MAS NMR study of human bone mineral, *Calcif Tissue Int*, 73(5), 2003, 476-486.
- [24] Wilson E.E., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W., Three structural roles of water in bone observed by solid-state NMR, *Biophys J*, 90(10), 2006, 3722-3731.
- [25] Kolmas J., Kolodziejki W., Concentration of hydroxyl groups in dental apatites: a solid state  $^1\text{H}$  MAS NMR study using inverse  $^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$  cross polarization, *Chem Comm*, 2007, 4390-4392.
- [26] Wopenka B., Pasteris J.D., A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Mater Sci Eng C*, 25, 2005, 131-143.
- [27] Young R.A., Holcomb D.W., Role of acid phosphates in hydroxyapatite lattice expansion, *Calcif Tissue Int*, 36(1), 1984, 60-63.
- [28] Gillespie P., Wu G., Sayer M.J., Si complexes in calcium phosphate biomaterials, *J Mater Sci Mater Med*, 21, 2010, 99-108.
- [29] Gasqueres G., Bonhomme C., Maquet J., Babonneau F., Hayakawa S., Kanaya T., Osaka A., Revisiting silicate substituted hydroxyapatite by solid state NMR, *J Mag Res Chem*, 46(4), 2008, 432-346.

# ZASTOSOWANIE PARYLENU C JAKO POWŁOKI OCHRONNEJ NA POWIERZCHNI IMPLANTU METALOWEGO

M. CIEŚLIK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersYTET Jagielloński,  
INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLSKA

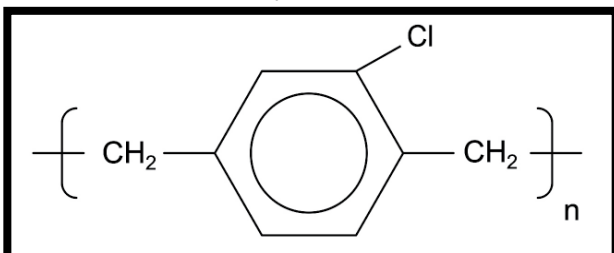
<sup>2</sup> INSTYTUT METALURGII I INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, PAN,  
W. REYMONTA 25, 30-059 KRAKÓW, POLSKA  
E-MAIL: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 62-64*]

## Wstęp

Stal nierdzewna (SS) jest jednym z najczęściej stosowanych ortopedycznych materiałów implantacyjnych ze względu na swoje własności mechaniczne, zdolność do nadawania kształtów oraz relatywnie niską cenę [1]. Jednak, posiada ona również kilka niekorzystnych wad, z których najpoważniejszą jest możliwość wystąpienia powierzchniowej korozji. Podczas długotrwałego kontaktu z tkankami ludzkimi następuje niepożądany proces uwalniania toksycznych jonów metali (żelazo, chrom i nikiel). Może to powodować wszelkiego rodzaju alergię [2]. Dlatego też odpowiednia obróbka powierzchniowa implantów jest tak ważna w celu zminimalizowania procesu uwalniania jonów. Obecnie, strategie badawcze skoncentrowane są zarówno na zastosowaniu konwencjonalnych metod obróbki powierzchni jak i na zastosowaniu powłok polimerowych. Jednym z rodzajów polimerów, który obecnie znalazł zainteresowanie jako powłoka ochronna na stali jest parylen C (RYS. 1). Polimer ten wykazuje wysoką biokompatybilność i możliwość wytworzenia cienkiej, ciągłej i inertej powłoki [3]. Często też stosuje się silan A174 jako warstwę adhezyjną ułatwiającą związanie powłoki parylenowej z powierzchnią stali. Większość prowadzonych badań nad powłokami polimerowymi ma na celu zwiększenie odporności korozyjnej powierzchni metalowych implantów przy jednoczesnym ograniczeniu procesu uwalniania jonów metali. Inną ważną cechą powłok na implantach jest odporność na zarysowanie. W celu monitorowania procesów zachodzących na powierzchni implantów metalowych w środowisku biologicznym wykorzystywane są zarówno pomiary elektrochemiczne i testy *in vitro*. Dodatkowo właściwości mechaniczne powłok są badane przy użyciu scratch testów.

Celem przeprowadzonych badań była analiza właściwości ochronnych powłoki polimerowej (silan+parylen C) osadzonej na powierzchni stali implantacyjnej 316L w kontakcie z sztucznym płynem fizjologicznym Hanksa oraz pomiar odporności na zarysowania.



RYS. 1. Struktura chemiczna parylenu C [2].  
FIG. 1. Chemical structure of parylene C [2].

# PARYLENE C COATING AS A PROTECTIVE LAYER ON METAL IMPLANT SURFACE

M. CIEŚLIK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY,  
INGARDENA 3, 30-060 KRAKOW, POLAND,

<sup>2</sup> INSTITUTE OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCE, PAS,  
W. REYMONTA 25, 30-059 KRAKOW, POLAND  
E-MAIL: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 62-64*]

## Introduction

Stainless steel (SS) is one of the most used orthopedic implant material due to its mechanical strength, the capability to bend and shape and relatively low cost [1]. However, SS does have some significant disadvantages; the most common is surface corrosion. Upon prolonged contact with human tissue harmful corrosion products (iron, nickel and chromium) are released to human body. This in turn may result in allergy and dangerous diseases [2]. For that reason appropriate surface engineering of the metal implant is of critical importance when attempting to limit the metal ions release. Nowadays, strategies of investigation concentrate on conventional surface preparations and application of polymer coatings. One of the polymers that draw the attention nowadays as a potential steel coating is parylene C (FIG. 1). This polymer exhibits excellent biocompatibility and forms continuous, thin films on metallic substrates [3]. However, pre-treatment with the organic silane A174 as an adhesion promoter to parylene coating is the recommended surface preparation of steel surface. Most investigations on coatings used for medical devices aim at increasing the corrosion resistance while decreasing the release of metal ions into the body. Another important characteristic of the coatings on metal implants involves its mechanical properties, such as friction. For monitoring the processes taking place on metal implant surfaces in biological environments the electrochemical methods and *in vitro* tests are often used. Additionally, the mechanical properties of the coatings are determined with the use of scratch tests.

The aim of the present study was to evaluate protective function of polymer coating (silane+parylene C) on SS (316L) upon exposure to artificial body fluids of Hanks solution and test its scratch resistance.

## Experimental

Samples of SS 316L grade with bright annealed (BA) surface finishing and Ra value of 0.03-0.1  $\mu\text{m}$  were cleaned, pickled and coated with a 2  $\mu\text{m}$  of parylene C by means of Chemical Vapour Deposition (CVD) (ParaTech) described in elsewhere [3]. Prior to covering by parylene the samples were coated by adhesive glue, silane A174, via a dipping method. Cleaned uncoated SS samples were used as references. All samples were investigated by means of metal ions release tests, electrochemical measurements and scratch test. *In vitro* release tests were performed for 28 days in darkness using a shaking incubator at a temperature of 37°C. Samples of the solution after the 28-days exposure period were analyzed for the concentrations of the released metals (Fe, Cr, Ni) by Atomic Absorption Spectrometer Perkin-Elmer Model 3110.

## Materiały i metodyka badań

Próbki stali nierdzewnej 316L z obróbką powierzchni BA (*bright annealed*) i chropowatością Ra 0,03-0,1  $\mu\text{m}$  były przemyte, wytrawione oraz pokryte 2  $\mu\text{m}$  powłoką parylenową przy użyciu metody osadzania z fazy gazowej (CVD) (ParaTech) opisaną w [3]. Przed pokryciem próbek stali parylenem została nałożona cienka warstwa silanu A 174 za pomocą metody zanurzeniowej. Próbki stali bez powłok wykorzystywane były jako próbki referencyjne. Wszystkie próbki analizowano w testach uwalniania jonów metali ciężkich, pomiarach elektrochemicznych oraz scratch testach. Testy uwalniania jonów *in vitro* wykonane były przez 28 dni w inkubatorze z wytrząsaniem, w temperaturze 37°C. Próbki płynów po testach były analizowane pod kątem ilości uwolnionych jonów (Fe, Cr, Ni) z wykorzystaniem spektrometru absorpcji atomowej Perkin-Elmer Model 3110. Pomiar elektrochemiczny przy użyciu elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (ESI) prowadzone były w celi z trzema elektrodami (elektroda pracująca, Pt elektroda zliczająca i Ag/AgCl elektroda odniesienia). Elektrody były podłączone do 1287 Electrochemical Interface połączonego z analizatorem częstotliwości Solartron 1250. Wszystkie pomiary elektrochemiczne wykonywano w odniesieniu do wcześniej zmierzonego potencjału korozyjnego, z amplitudą napięcia 50 mV, w zakresie częstotliwości od 0,01 Hz do 10 kHz i przy akwizycji 10 punktów na dekadę. Pomiary przeprowadzone były w czasie 1 godziny. Otrzymane spektra analizowane były za pomocą diagramów Nyquista i Bode. Wartości otrzymanych impedancji zdominowane były przez wartość odporności badanego układu powiązaną z właściwościami izolacyjnymi powłoki polimerowej. W tym przypadku, w celu dopasowania modelu matematycznego otrzymanych danych zastosowano prosty model elektryczny składający się z równoległe połączonego opornika ( $R_1$ ) i kondensatora ( $C_1$ ), połączonych z opornikiem przedstawiającym opór elektrolitu ( $R_s$ ). Zarówno testy *in vitro* jak i pomiary elektrochemiczne wykonywane były w sztucznym płynie fizjologicznym Hanksa, który jest mieszaniną sztucznych soli fizjologicznych (pH = 7,4). Scratch testy wykonano z wykorzystaniem MicroCombi Tester (CSM). W pomiarach wykorzystano diamentowy wgłębnik Rockwella C o kącie 120° i średnicy zaokrąglenia 200  $\mu\text{m}$  [4].

## Wyniki i dyskusja

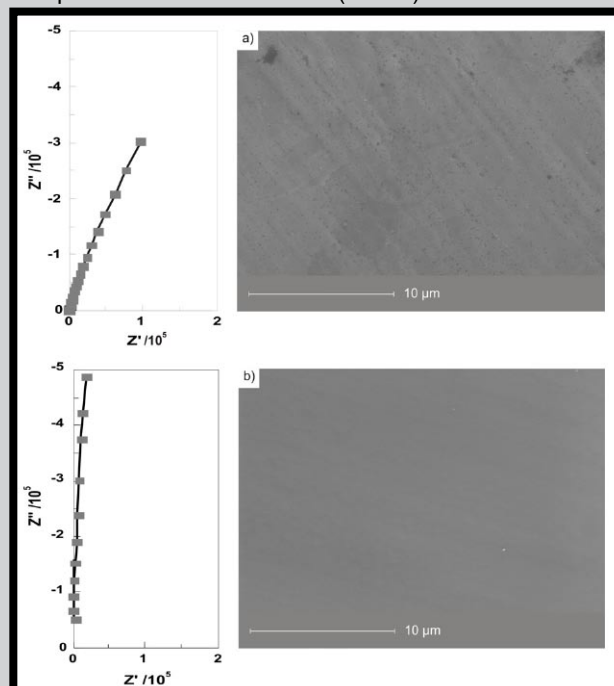
Typowe zdjęcia mikroskopowe (SEM) powierzchni stali implantacyjnej bez i z powłoką silanowo-parylenową C wraz z odpowiadającymi im widmami ESI uzyskane po 1 godzinie kontaktu z płynem Hanksa przedstawiono na RYS. 2. Wykazują one, że zastosowany układ polimerowy tworzy gładką i jednorodną warstwę ochronną na powierzchni stali nierdzewnej. ESI spektra dla próbki niepokrytej przedstawiają typowe wyniki o wartości całkowitej impedancji  $10^6 \Omega\text{cm}^2$ . Z drugiej strony, dla próbek pokrytych powłoką parylenową wykres przedstawia linię prostą o wartości całkowitej impedancji równej  $10^9 \Omega\text{cm}^2$  - co świadczy o bardzo dobrej ochronie powierzchni stali (RYS. 3).

Wyniki z testów *in vitro* pokazują, że zastosowanie powłoki parylenu C skutecznie redukuje uwalnianie jonów z powierzchni stali 316L. Ilość jonów metali, które przeszły z powierzchni pokrytej powłoką, po miesięcznej inkubacji w płynie Hanksa, są na poziomie błędów detekcji analizatora, podczas gdy dla próbek niepokrytych ilość jonów żelaza, chromu i niklu wynosiła odpowiednio 1,074; 0,223; 0,260  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

The Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) were performed in 1h using a typical three electrode set-up consisted of a sample work electrode, Ag/AgCl reference electrode and a Pt mesh counter electrode. The electrodes were connected to a 1287 Electrochemical Interface coupled with a Solartron 1250 Frequency Response Analyzer. All impedance measurements were performed at the open circuit potential with alternating current amplitude of 50 mV and the applied frequencies range varied from 0.01 Hz to 10 kHz with an acquisition rate of 10 points per decade. The impedance spectra of the samples were analyzed in terms of Nyquist and Bode plots. The impedance response is dominated by a capacitance due to the dielectric property of the polymer coating. In this case, the simple equivalent circuit, consisting of a parallel resistance ( $R_1$ ) and capacitance ( $C_1$ ), in serial connection with a solution resistance ( $R_s$ ), was used for spectra fitting. All exposure tests and electrochemical investigations were performed in Hanks solution, which is an artificial salts mixture (pH = 7.4). Scratch test was performed with the use of MicroCombi Tester (CSM). A Rockwell C spherical diamond stylus with cone apex angle of 120° and tip radius of 200  $\mu\text{m}$  was used [4].

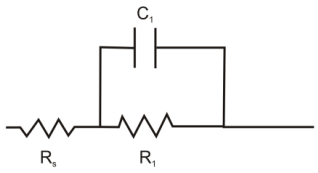
## Results and discussion

The typical SEM pictures together with the corresponding EIS spectra obtained after 1 h exposure to Hanks solution for uncoated (reference) and silane-parylene C coated samples are presented in FIG. 2. From the microscopic observations it can be inferred that the parylene coating composed a smooth uniform layer at the SS surface. The EIS spectra represented typical results for uncoated steel samples of total impedance of  $10^6 \Omega\text{cm}^2$ . On the other hand in the spectra for parylene C coated samples a well defined line points to a high impedance value of  $10^9 \Omega\text{cm}^2$  - characteristic for a well protected metallic surface (FIG. 3).

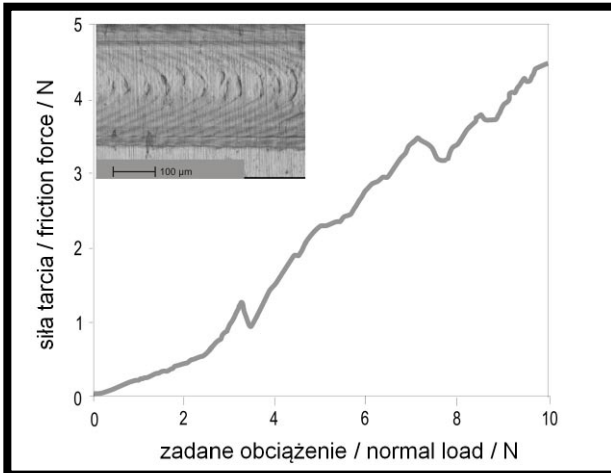


RYS. 2. Wykresy Nyquista i powiązane z nimi obrazy SEM po 1 godz. testów w płynie Hanksa dla: niepokrytej (a) i pokrytej silan + parylen C (b) powierzchni stali.

FIG. 2. Nyquist plots and the corresponding SEM after 1 h exposure to Hanks solution for: uncoated (a) and double-layer (silane + parylene C) coated SS surface (b).

	Rodzaj próbek / Kind of sample	
	Stal niepokryta / Uncoated steel	Stal pokryta powłoką silan+parylen C / Steel coated by silane+parylene C
$R_s$ ( $\Omega\text{cm}^2$ )	19.29	2356.01
$C_1$ ( $\text{F cm}^2$ )	CPE <sub>1-T</sub>	1.09
	n	0.944
$R_1$ ( $\Omega\text{cm}^2$ )	$1.10 \times 10^6$	$8.30 \times 10^9$

**RYS. 3. Zastosowany model elektryczny oraz wartości dopasowania parametrów zastosowanego modelu.**  
**FIG. 3. Electrical model and values of fit parameters for analyzed samples.**



**RYS. 4. Wyniki ze scratch testów oraz zdjęcie powstałej rysy.**  
**FIG. 4. Result of scratch test and the corresponding microscopic picture.**

Wyniki z scratch testów przedstawione są na RYS. 4. Liniowa zależność siły tarcia do zadanej siły związana jest z wartości współczynnika tarcia równego  $0,22 \pm 0,02$ . Dla niskich zadanych sił ( $F_n < 2$  N) przebieg siły tarcia prezentuje klasyczne oddziaływanie między wgłębniakiem a powłoką polimerową. Obserwowany wzrost siły tarcia przy zadanych wyższych siłach związany jest z tworzeniem się na czole wgłębniaka nawarstwień powłoki polimerowej. Dla wyższych wartości ( $F_n > 3$  N) obserwowany był ostry przebieg interpretowany jako tworzenie się nawarstwień na froncie wgłębniaka. Świadczy to o plastycznym charakterze parylenu C. Materiał ten łatwiej ulega deformacji niż pękaniu co świadczy o dobrej odporności na zarysowania.

## Wnioski

Testy uwalniania jonów metali oraz pomiary elektrochemiczne są uzupełniającymi i właściwymi metodami analizy odporności korozyjnej i właściwości ochronnych powłok polimerowych na implantach stalowych. Długoterminowe testy w sztucznych płynach fizjologicznych wykazały, że parylenowa powłoka polimerowa może skutecznie służyć do ochrony antykorozyjnej. Pomiary elektrochemiczne i scratch test wykazały, że zastosowana powłoka stanowi dobrą barierę ochronną. Parylen C może być zatem właściwym materiałem do stosowania jako powłoka ochronna na płaskich płytkach metalowych stosowanych w implantologii.

## Podziękowania

Projekt realizowany w ramach programu Ventures Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej – Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

The results from *in vitro* tests clearly shows that the metal release from SS 316L can be effectively reduced by parylene C coating. The quantity of metal ions released from the parylene C coated SS samples, after one month of exposure to Hanks solution, was practically within the detection limit ( $< 5$  ng/cm<sup>2</sup>), whereas for uncoated reference samples, the release rates were 1.074; 0.223; 0.260 µg/cm<sup>2</sup> for Fe, Cr and Ni, respectively.

The results from scratch test are presented in FIG. 4. Linear behavior of friction force with the applied load resulting in friction coefficient within the experimental limit equals to  $0.22 \pm 0.02$ . For low applied loads ( $F_n < 2$  N) the value of friction force results from classic interaction between the indenter and the polymer coating. The observed rise of friction force for higher loads is caused by buckling and ploughing mechanisms. At higher loads ( $F_n > 3$  N), sharp dependence interpreted in terms of the formation of a larger groove in front of the indenter was observed. This indicated elastic character of parylene C. This kind of material easier undergoes deformation than cracking and exhibits high scratch resistance.

## Conclusions

Metal ions release tests and electrochemical measurements are suitable and complementary methods for investigations of the corrosion resistance and protective properties of the polymeric coating on SS implant surface. Long term exposure tests in simulated body fluid (Hanks solution) revealed that the parylene C coating can be successfully used for corrosion protection of stainless steel 316L. The EIS measurements showed that the applied polymer is a good barrier coating. Results from scratch tests shows that parylene C is suitable for application as a protective coating on metal stabilization plates used in implantation.

## Acknowledgements

Project operated within the Foundation for Polish Science Ventures Programme, co-financed by the EU European Regional Development Fund.

## Piśmiennictwo

- [1] Donglu Shi, Introduction to Biomaterials, Tsinghua University Press, 2006.
- [2] G. Herting, I. O. Wallinder, Ch. Leygraf, Factors that influence the release of metals from stainless steels exposed to physiological media, Corros. Sci., 48 (2006) 2120.
- [3] M. Cieślak, K. Engvall, J. Pan, A. Kotarba, Silane-parylene coating for improving corrosion resistance of stainless steel 316L implant material, Corros. Sci., 53 (2011) 296.
- [4] H. Jiang, R. Browning, J. D. Whitcomb, M. Ito, M. Shimouse, T. A. Chang, H.-J. Sue, Mechanical Modeling of Scratch Behavior of Polymeric Coatings on Hard and Soft Substrates, Tribol. Lett., 37 (2010) 159.

## References

# WSTĘPNE BADANIA BIOKOMPATYBILNOŚCI POLIURETANÓW OTRZYMANYCH Z UDZIAŁEM SYNTETYCZNEGO POLIHIDROKSYMAŚLANU

JOANNA BRZESKA<sup>1\*</sup>, HELENA JANIK<sup>2</sup>, MAREK KOWALCZUK<sup>3</sup>,  
MARIA RUTKOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AKADEMIA MORSKA W GDYNI,  
KATEDRA CHEMII I TOWAROZNAWSTWA PRZEMYSŁOWEGO,  
UL. MORSKA 83, 81-225 GDYNIA

<sup>2</sup>POLITECHNIKA GDAŃSKA, KATEDRA TECHNOLOGII POLIMERÓW,  
UL. NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK

<sup>3</sup>POLSKA AKADEMIA NAUK,  
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
UL. SKŁODOWSKA-CURIE 34, 41-800 ZABRZE

\* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

## Streszczenie

Zastosowanie w syntezie poliuretanów niemal zupełnie amorficznego ataktycznego poli([R,S]-3-hydroksymaślanu), bliskiego stanu, w jakim polihydroksymaślan naturalnie występuje w komórce, prowadzi do otrzymania biokompatybilnego i biodegradowalnego materiału dla zastosowań medycznych.

Celem pracy było oznaczenie sorpcji oleju, ekstrakcja wodą i heksanem poliuretanów otrzymanych z udziałem poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) oraz ich wpływu na parametry krwi. Wysoka sorpcja oleju roślinnego przez próbki poliuretanów otrzymane z udziałem PTMG i poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) oraz przebieg widm FTIR po ekstrakcji heksanem wskazują na potencjalną podatność tych polimerów na działanie tłuszczu w organizmie żywym. Nieznaczny tylko wpływ na parametry krwi, oznaczony przez porównanie wartości parametrów hematologicznych pełnej krwi po kontakcie z próbkami polimerów z próbką kontrolną, wskazuje na celowość dalszych badań w kierunku oznaczenia potencjalnej hemokompatybilności otrzymanych poliuretanów.

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 65-72]

## Wprowadzenie

Materiały polimerowe są powszechnie stosowane w medycynie ze względu na ich wyjątkowe właściwości. Poliuretany (PUR) – to jedna z najważniejszych grup polimerów, charakteryzująca się unikalną, segmentową (domeny giętkie i sztywne) strukturą [1-4]. Regularność i uporządkowanie domen oraz mikrofazowa separacja segmentów giętkich i sztywnych determinują właściwości mechaniczne i fizyczne poliuretanów, a także ich biokompatybilność. Od wczesnych lat 80-tych ubiegłego wieku prowadzone są badania oddziaływania poliuretanów na krew.

Biokompatybilność jest jednym z głównych parametrów, określających funkcjonalność materiału w medycynie. Jedną z metod otrzymania materiału kompatybilnego z ustrojem jest zastosowanie w jego syntezie związków, naturalnie występujących w organizmie lub też degradujących do produktów naturalnych, np. polihydroksymaślanu [5,6].

# PRELIMINARY INVESTIGATIONS OF BIOCOMPATIBILITY OF POLYURETHANES BASED ON SYNTHETIC POLYHYDROXYBUTYRATE

JOANNA BRZESKA<sup>1\*</sup>, HELENA JANIK<sup>2</sup>, MAREK KOWALCZUK<sup>3</sup>,  
MARIA RUTKOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GDYNIA MARITIME UNIVERSITY, DEPARTMENT OF CHEMISTRY,  
83 MORSKA STREET, 81-225 GDYNIA, POLAND

<sup>2</sup>GDAŃSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF POLYMER TECHNOLOGY,  
11/12 NARUTOWICZA STREET, 80-952 GDAŃSK, POLAND

<sup>3</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 SKŁODOWSKA-CURIE STREET, 41-800 ZABRZE, POLAND

\* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

## Abstract

Using in polyurethanes synthesis almost completely amorphous, atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) which is close to its original state in the cell, ought to let to obtain biocompatible and biodegradable material useful for medical application.

The aim of work was to measure of oil sorption by obtained polyurethanes, based on poly([R,S]-3-hydroxybutyrate), and their water and hexane extraction and the estimation of their influence on blood parameters. The high oil sorption by polyurethane samples synthesized with polyoxytetramethylene diol and poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) in soft segments and FTIR spectra of dry residue after hexane extraction indicate on potential susceptibility of those polyurethanes to lipids in living organism. Insignificant influence on blood parameters, estimated by comparison of values of hematologic parameters of whole blood contacted to polymers' samples and control probe indicate on purposefulness of further tests to verify the hemocompatibility of obtained polyurethanes.

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 65-72]

## Introduction

Polymeric materials are widely used in biomedical applications due to their desired properties. Among these, polyurethanes (PUR) are one of the most important classes of polymers because of their unique segmented (hard and soft domains) structure [1-4]. Regularity and ordering of domains determine the mechanical and physical properties of PURs. It is known that blood compatibility is related to microphase separated structure of hard and soft segment. The first significant studies on the blood response characteristics of polyurethanes were reported in the early 1980s.

The biocompatibility is the major parameter which determined the functional quality. One of the methods of obtaining biocompatible material is using substrates, which naturally exist in human organism or degrade into natural products, like polyhydroxybutyrate (PHB) [5,6].

Polihydroksymaślan jest biokompatybilnym poliestrem, naturalnie syntezowanym przez wiele mikroorganizmów, jako materiał zapasowy. Produkt jego degradacji – kwas 3-hydroksymaślowy – powszechny metabolit krwi ludzkiej, produkowany jest w ciałach ketonowych ssaków podczas przedłużającej się głodówki [7]. Kwas 3-hydroksymaślowy należy do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, wykazujących właściwości antybakteryjne [8]. Chemicznie otrzymanym substytutem naturalnego polihydroksymaślanu jest ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan) (a-PHB).

Zastosowanie w syntezie poliuretanów niemal zupełnie amorficznego a-PHB, bliskiego stanu, w jakim polihydroksymaślan naturalnie występuje w komórce, prowadzić może do otrzymania biokompatybilnego i biodegradowalnego materiału dla zastosowań medycznych.

Jest ogólnie przyjęte, że powtarzalne i niedrogi testy *in vitro* stanowią istotny etap poprzedzający badania *in vivo*. Obejmują one testy cytotoxyczności (wpływ biomateriału na morfologię, żywotność oraz funkcjonalność komórek) i oznaczenie hemokompatybilności materiału.

Celem pracy było oznaczenie sorpcji oleju, ekstrakcja wodą i heksanem poliuretanów otrzymanych z udziałem a-PHB oraz ich wpływu na parametry krwi.

## Część doświadczalna

### Synteza poliuretanów

Syntezę poliuretanów prowadzono metodą dwuetapową [9]. W etapie pierwszym prepolimer otrzymano w reakcji oligomerodioli z 4,4'-diizocyjanianem dicykloheksylometanu ( $H_{12}$ MDI, Alfa Aesar), wobec katalizatora – dibutylo-dilaurynianu cyny (DBTDL, Akra Chem.), przy obniżonym ciśnieniu. W syntezie użyto oligomerodioli: ataktycznego poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) (a-PHB,  $M_n=2000$ , CMPiW PAN, Zabrze), polikaprolaktonodioli (PCL,  $M_n=1900$ , Aldrich) oraz polioksytetrametylenodioli (PTMG,  $M_n=2000$ , Aldrich). Stosunek molowy grup NCO:OH wynosił 3,7:1 i 2:1. Reakcja prowadzona była przy ciągłym mieszaniu w temperaturze 60-70°C w czasie 2 godz. Następnie do 40% roztworu prepolimeru w N,N-dimetyloformamidzie (DMF, Labscan Ltd) dodano przedłużacza łańcuchów – 1,4-butanodioli (1,4-BD, Aldrich), uzyskując równomolowy stosunek grup NCO:OH. Reakcję prowadzono w temperaturze 60°C w czasie 1,5 godz.

Folie poliuretanów formowano przez wylanie roztworów na płytki teflonowe i odparowanie rozpuszczalnika w 80°C. Następnie folie wygrzewano w 105°C przez 5 godz. pod próżnią i - po kilku tygodniach sezonowania w temperaturze pokojowej – umyto zimnym heksanem przez 5 godz. w aparacie Soxhleta dla usunięcia nieprzereagowanych resztek monomeru i katalizatora.

Skład poliuretanów przedstawiono w TABELI 1.

Polyhydroxybutyrate is biodegradable polyester, naturally synthesized by many microorganisms as a resource of carbon and energy. Product of its degradation – 3-hydroxybutyric acid - a common metabolite in human blood, is produced in ketone bodies of mammals during the prolonged starvation [7]. 3-hydroxybutyric acid belongs to short-chain fatty acids and reveals antibacterial activity [8]. The chemically synthesized substitute of natural PHB is atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB). Using in polyurethanes synthesis almost completely amorphous a-PHB, which is close to its original state in the cell, ought to let to obtain biocompatible and biodegradable material useful for medical application.

It is generally accepted that reproducible and inexpensive tests *in vitro* are essential prior to conducting *in vivo* trials. *In vitro* testing procedures are a fundamental part of biocompatibility estimation. They include cytotoxicity tests (effect of biomaterial on cell morphology, viability or function) and hemocompatibility evaluation.

The aim of work was to estimate the oil sorption by polyurethanes based on a-PHB, their water and hexane extraction and the estimation their influence on blood parameters.

## Experimental

### Synthesis of polyurethanes

Synthesis of polyurethanes was carried out in a two-step reaction, as reported previously [9]. First, the prepolymer was prepared from polyols and 4,4'-methylene dicyclohexyl diisocyanate ( $H_{12}$ MDI, Alfa Aesar), in a presence of catalyst - dibutyltindilaurate (DBTDL, Akra Chem.), at reduced pressure. Atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB,  $M_n=2000$ , CMPiW PAS, Zabrze), polycaprolactone diol (PCL,  $M_n=1900$ , Aldrich) or polyoxytetramethylene diol (PTMG,  $M_n=2000$ , Aldrich) were used as polyols. The molar ratio of NCO:OH groups in prepolymer was 3.7:1 and 2:1. The mixture was stirred at temperatures 60-70°C for 2 h. Then the prepolymer was dissolved in N,N-dimethylformamide (DMF, Labscan Ltd) to solid mass concentration of 40%. The chain extender 1,4-butanediol (1,4-BD, Aldrich) was added to obtain equimolar ratio NCO to OH groups and reaction proceeded at 60°C for 1.5 h.

Solution of polyurethane was poured on Teflon plates and heated at 80°C for solvent evaporation. Next, the foils were heated at 105°C in vacuum dryer for 5 h. After few weeks of seasoning at room temperature, foils were washed for 5 h in cold hexane in Soxhlet extractor for removing unreacted monomers and the rest of catalyst.

Composition of obtained polyurethanes is presented in TABLE 1.

TABELA 1. Skład poliuretanów.  
TABLE 1. Composition of polyurethanes.

PUR	Skład segmentów giętkich / Composition of soft segment	Segmenty sztywne / Hard segment	NCO:OH w prepolimerze / in prepolymer
PUR-A	23% a-PHB + 77% PTMG	$H_{12}$ MDI+1,4-BD	3.7:1
PUR-B	23% a-PHB + 77% PCL		3.7:1
PUR-C	100% a-PHB		3.7:1
PUR-D	23% a-PHB + 77% PTMG		2:1
PUR-E	23% a-PHB + 77% PCL		2:1
PUR-F	100% a-PHB		2:1

## Metody

Sorpcję oleju otrzymanych poliuretanów oznaczono przez umieszczenie próbek polimerów w oleju słonecznikowym [10]. Próbki poliuretanów suszono do stałej masy w temp. 70°C w suszarce próżniowej, po czym zanurzono w oleju i umieszczano w cieplarni w temp. 37°C (temperatura fizjologiczna ciała ludzkiego) na 24 godziny. Oznaczano procentowy przyrost masy próbek ważonych bezpośrednio po odciśnięciu oleju między płatkami bibuły.

Wyciągi heksanowe przygotowano wg Farmakopei Polskiej [11]: 1,0 g badanego poliuretanu umieszczono w 50 ml heksanu i utrzymywano w temperaturze wrzenia przez 4 godziny. Oznaczono masę suchej pozostałości po odparowaniu 25 ml wyciągu. Strukturę wymytych cząstek zbadano spektrometrem FTIR - Bruker IFS 66, przy 16-krotnym skanowaniu.

Wyciągi wodne przygotowano wg wymagań Farmakopei Polskiej [11], używając proporcjonalnie 100 ml wody dejonizowanej na próbkę folii o obu stronach powierzchni 600 cm<sup>2</sup> i inkubując ją w czasie 24 godzin w temperaturze 70°C. Zmętnienie oraz pH wyciągów wodnych oznaczono, porównując z równoległe przygotowaną ślepą próbą (dejonizowana woda termostatowana w tych samych warunkach). Masę suchej pozostałości oznaczono po odparowaniu 50 ml wyciągu wodnego.

Hemokompatybilność otrzymanych poliuretanów oznaczono przez obserwację zmian parametrów morfologicznych i koagulacji pełnej krwi po jej inkubacji z próbkami PUR. Sterylne próbki folii poliuretanów (sterylizowane plazmą gazu generowanego nad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o powierzchni 8,5 cm<sup>2</sup>, umieszczono w świeżo pobranej od trzech zdrowych kobiet krwi i poddano inkubacji w cieplarni przez 15 minut oraz 4 godziny w temperaturze fizjologicznej dla ludzkiego organizmu (37°C).

Parametry morfologiczne oznaczono, pobierając (bepośrednio przed badaniem) krew do probówek o pojemności 3 ml, zawierających EDTA jako antykoagulant. Po umieszczeniu próbki polimeru wewnątrz probówki i inkubowaniu w określonym czasie w cieplarni wykonano analizę morfologiczną metodą cytometryczną, na analizatorze hematologicznym Cell Dyn 3500.

Czas kaolinowo-kefalinowy (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji) (APTT) w osoczu oraz stężenie fibrynogeny (parametry krzepliwości krwi) oznaczono testem fotoptycznym autoanalizatorem ACL9000 (osocze otrzymano po odwirowaniu 2 ml krwi pobranej na cytrynian sodu).

## Wyniki i dyskusja

Implantowany materiał, umieszczony wewnątrz organizmu, narażony jest na działanie otaczającego go środowiska. Istotną rolę w procesie degradacji polimerów pełnią tłuszcze. Przyspieszają one kalcyfikację oraz naprężeniowe pękanie powierzchni materiału. Wpływ związków tłuszczowych na poliuretany zbadano przez pomiar sorpcji oleju roślinnego. Wyniki sorpcji oleju przedstawiono w TABELI 2. Wprowadzenie a-PHB do struktury poliuretanów spowodowało zmniejszenie sorpcji oleju przez próbki poliuretanów, zawierające PTMG w strukturze segmentów giętkich. Nie wpłynęło natomiast na sorpcję oleju przez poliuretany z półkryształicznym PCL [9]. Wartości zebrane w TABELI 2 wskazują wyraźnie, iż podatność PURs z PTMG (PUR-A i PUR-D) w segmencie giętkim na sorpcję oleju jest znacznie wyższa niż przy zastosowaniu PCL w syntezie prepolimeru (PUR-B i PUR-E).

## Methods

The oil sorption of obtained polyurethanes was estimated by immersing of polymer samples in sunflower oil [10]. The polymer samples were vacuum dried at 70°C, weighted and immersed in sunflower oil at 37°C (physiological temperature of human body) for 24 hours. Subsequently the investigated samples were taken away from oil and after cleaning with paper sheets – weighted.

Hexane extracts were prepared according to Polish Pharmacopea [11]: 1 g of investigated polyurethane samples were immersed in 50 mL of boiling hexane for 4 hours. The dry mass of residue was estimated after solvent evaporation from 25 mL of hexane solution. The structure of solid residue was performed using Fourier transform infrared spectrometer Bruker IFS 66 in the range of 4000-400 cm<sup>-1</sup> for an accumulated 16 scans.

Water extracts were prepared according to Polish Pharmacopea [11] using 100 mL of deionized water for polymer sample squared 600 cm<sup>2</sup> at temperature 70°C during 24 hours of incubation. Turbidity and pH of water extracts were estimated in comparison to control probe (deionized water incubated in the same conditions). Solid residues of water extracts were estimated for 50 ml of extracts after solvent evaporation.

Hemocompatibility of obtained polyurethanes was estimated by observations of changes in morphology and coagulation parameters of whole blood after direct contact with polymer samples. The polyurethane samples (sterilized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma) squared 8.5 cm<sup>2</sup> were immersed in separate test tubes containing fresh blood taken from three, healthy women, and incubated at 37°C for 15 minutes and 4 hours. Morphologic parameters, using flow cytometry method (hematologic Cell Dyn 3500 analyzer), were estimated for blood taken to 3 mL tubes with EDTA. Whereas coagulation parameters were estimated by measuring of APTT and fibrinogen concentration (photooptical method, ACL 9000 analyzer) in blood plasma (obtained by centrifugation of 2 mL of citric blood).

## Results and discussion

Material immersed in living body is exposed on acting of surrounded environment. Lipids play the very important role in degradation process of polymer material. They accelerate calcification and environmental stress cracking of polymer surface. Influence of lipids compounds on polyurethane sample was investigated by sorption of vegetables oil. The results of oil sorption are shown in TABLE 2. Introducing of a-PHB into soft segments caused the reducing of oil sorption by PURs with PTMG. There was no such influence in the case of PURs with semi-crystalline PCL [9]. The oil sorption by polyurethane samples based on PTMG (PUR-A and PUR-D) is much higher than for PURs with PCL in soft segments (PUR-B and PUR-E).

**TABELA 2. Sorpcja oleju roślinnego przez poliuretany otrzymane z udziałem a-PHB.**

**TABLE 2. The sunflower oil sorption by polyurethanes based on a-PHB.**

PUR	PUR-A	PUR-B	PUR-C	PUR-D	PUR-E	PUR-F
Sorpcja oleju (wartość±SD) [%] / Oil sorption (mean±SD) [%]	6.9±0.28*	0.7±0.01*	1.1±0.27	9.6±0.66	0.3±0.04	1.2±0.29

\* dane przedstawione w [9], SD – odchylenie standardowe, n=3

\* data presented in [9], SD – standard deviation, n=3

Znajdująca się we krwi albumina (adsorbowana na ściankach implantu stanowi jego naturalny łącznik z ustrojem) jest białkiem występującym we krwi w formie kompleksu z tłuszczami [12]. Zatem duża podatność na sorpcję oleju sprzyjać może także adsorpcji albumin, zwiększając tym samym hemokompatybilność poliuretanów z PTMG.

Próbki poliuretanu PUR-A (syntezowanego przy stosunku molowym NCO:OH = 3,7:1 w prepolimerze) zaabsorbowały mniej oleju niż próbki PUR-D (NCO:OH = 2:1). Analiza struktury otrzymanych poliuretanów wskazuje, że przy wyższym stosunku molowym NCO:OH w prepolimerze powstało więcej wiązań wodorowych [13]. Zatem wnikanie oleju w głąb polimeru było utrudnione [14].

Wyciągi wodne otrzymane z poliuretanów były bezbarwne i bez wyraźnego zapachu i nie wykazywały, w porównaniu z wodą, różnicy zmętnienia.

Masę suchej pozostałości po oddziaływaniu na próbki poliuretanów wodą i heksanem oraz pH wyciągów wodnych przedstawiono w TABELI 3.

$\Delta pH$ , wyznaczone względem pH czystej wody termostatowanej w tych samych warunkach ( $pH_{\text{wody}} = 7,1$ ), wskazują, że wiązania estrowe a-PHB<sub>tel</sub> oraz PCL uległy hydrolizie. Wartość przesunięć ( $\Delta pH$ ) jest podobna do wartości uzyskanej dla handlowego, o stwierdzonej biokompatybilności, poliuretanu Pellethane 80A, która wynosi 2,14 [15].

Masa suchej pozostałości, uzyskana po odparowaniu wyciągu wodnego z PUR-A, jest wyższa od dopuszczalnej przez Farmakopeę Polską wartości 15 mg, co świadczy o częściowej degradacji polimeru, przyspieszonej podwyższoną temperaturą. Może to wskazywać na podatność poliuretanu PUR-A na degradację hydrolytyczną.

Sucha pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika z wyciągu heksanowego pozwala wnioskować o ilości niskocząsteczkowych substancji (niezwiązanych w masie polimeru), jakie mogą ulec wymywaniu przez tłuszcze w organizmie żywym.

Na widmach FTIR otrzymanych poliuretanów zaobserwowano, przy 3400-3300  $cm^{-1}$ , pasma drgań rozciągających, wskazujących na obecność grup -NH związanych wiązaniem wodorowym. Stwierdzono także obecność I pasma amidowego w zakresie 1740-1690  $cm^{-1}$  oraz II pasma amidowego przy 1530-1510  $cm^{-1}$  (dane nie prezentowane). Szczegółowy opis pasm charakterystycznych przedstawiono w [13]. Stwierdzono też powstanie wiązań wodorowych między grupami NH ugrupowania uretanowego, a grupą karbonylową estru i uretanu, a także między NH, a tlenem grupy eterowej. Więcej wiązań wodorowych między ugrupowaniami uretanowymi zaobserwowano dla poliuretanów otrzymanych przy stosunku NCO:OH = 3,7:1 w prepolimerze niż dla NCO:OH = 2:1. Ponadto stwierdzono, że wprowadzenie a-PHB do struktury poliuretanów zwiększyło nieco liczbę wiązań wodorowych typu uretan-uretan [13]. Widma FTIR suchych pozostałości po ekstrakcji poliuretanów heksanem przedstawiono na RYS. 1.

Przebieg widma FTIR suchej pozostałości PUR-A (z a-PHB i PTMG w segmencie giętkim) wskazuje na dużą podatność tego poliuretanu na działanie heksanu. Potwierdza to największa spośród wszystkich poliuretanów ilość suchej pozostałości z wyciągu heksanowego (TABELA 3). Szerokie pasmo, w obszarze 3550-3200  $cm^{-1}$  odpowiadać może wiązaniom NH ugrupowania uretanowego lub aminowego, a także grupom OH oraz COOH powstałym po degradacji wiązań uretanowych i estrowych. Obecność zaś intensywne pasma przy 1100  $cm^{-1}$  potwierdza obecność w ekstrakcie ugrupowania eterowego polioksytetrametylenodiolu.

Albumina is a peptide which is absorbed on implant surface and cause the natural junction with natural environment of living body [12]. This peptide exists in organism as lipid-complex so higher oil sorption could improve the hemocompatibility of polyurethanes based on PTMG.

Samples of PUR-A (synthesized with NCO:OH = 3.7:1 in prepolymer) absorbed less oil amount than PUR-D (NCO:OH=2:1). According to structure analysis of obtained polyurethanes (presented in [13]) it was concluded that in PURs with higher NCO:OH ratio more hydrogen bonds had been formed. In this case the oil penetration into polymer structure was difficult [14].

The water extracts of investigated polyurethanes were colourless and without any fragrance. Flocculation of deionized water and extracts of polyurethanes were not differing.

The solid residues of water and hexane extracts and pH of water extract are presented in TABLE 3.

**TABELA 3. Masa suchej pozostałości z ekstraktów wodnych i heksanowych oraz pH wyciągów wodnych poliuretanów z a-PHB w segmencie giętkim.**

**TABLE 3. The solid residues of the water and hexane extracts from PUR and pH of water extracts.**

PUR	Wyciąg wodny / Extraction in water		Wyciąg heksanowy / Extraction in hexane	
	pH	$\Delta pH^{**}$	sucha pozostałość / dry residue [mg]	sucha pozostałość / dry residue [mg]
PUR-A	4.1	-3.0	16.4	7.50*
PUR-B	6.0	-1.1	1.9	0.60*
PUR-C	-	-	-	0.35
PUR-E	-	-	-	0.80
PUR-F	4.3	-2.8	-	0.20

\* dane przedstawione w [9], \*\*  $\Delta pH = pH_{\text{ekstraktu}} - pH_{\text{wody}}$   
\* data presented in [9], \*\*  $\Delta pH = pH_{\text{extract}} - pH_{\text{water}}$

$\Delta pH$  measured in comparison to deionized water, thermostated in the same conditions ( $pH_{\text{water}} = 7.1$ ) indicate on hydrolysis of a-PHB and PCL ester bonds.  $\Delta pH$  of water extracts of investigated polyurethanes are similar to  $\Delta pH$  (2.14) of commercial, biocompatible polyurethane Pellethane 80A [15].

The mass of solid residue, obtained after water evaporation from PUR-A extracts, is higher than allowed in Farmacopea (15 mg), what suggests that degradation of polymer material is accelerated by high temperature. It also

predicts the degradability of this polyurethane.

The solid residue of hexane extracts indicate on the presence of low molecular chains in polymer structure, which could be eroded by lipids in living organism.

At FTIR spectra of obtained polyurethanes the band characteristic for stretching vibrations of NH (from urethane) groups in the region of 3400-3300  $cm^{-1}$ , the amide I band in the region 1740-1690  $cm^{-1}$  and the amide II band in the region of 1530-1510  $cm^{-1}$  are observed (data not shown). Detailed discussion about the characteristic band groups are presented in reference [13]. There was also concluded that the NH groups, coming from urethane groups, were forming the hydrogen bonds with carbonyl groups of ester and urethane groups and the hydrogen bonds with ether groups. In the case of the greater NCO:OH ratio in prepolymer (NCO:OH = 3.7:1), the more urethane-urethane hydrogen bonds were formed. Furthermore an addition of a-PHB caused the slight increase in number of urethane-urethane hydrogen bonds [13]. FTIR spectra of solid residues after extraction in hexane are presented in FIG. 1.

FTIR spectra of PUR-A (based on a-PHB and PTMG) dry residue indicates on susceptibility of that polyurethane to hexane. It is confirmed by the high amount of mass residue (TABLE 3). The wide band at 3550-3200  $cm^{-1}$  suggests presence of the NH bonds (from urethane or amine groups) or OH and COOH, which were formed during degradation of urethane or ester groups. However the intensive band at 1100  $cm^{-1}$  indicates on the presence of ether bonds (of PTMG) in solid residue.



Większa ilość suchej pozostałości po ekstrakcji poliuretanów heksanem oraz przebieg widm FTIR wskazują, że PUR z mniejszą zawartością segmentów sztywnych (NCO:OH = 2:1) – PUR-E – jest bardziej podatny na degradację i wymywanie krótkich łańcuchów polimeru niż PUR-B (NCO:OH = 3,7:1).

Niespodziewanie poliuretany, których segment giętki zbudowany był tylko z  $\alpha$ -PHB (PUR-C and PUR-F), okazały się bardzo odporne na działanie wrzącego heksanu. Jest to wynik tym bardziej zaskakujący, że polimery te są nieodporne na działanie wyższych temperatur (szybko miękną) oraz łatwo rozpuszczają się w innych rozpuszczalnikach organicznych.

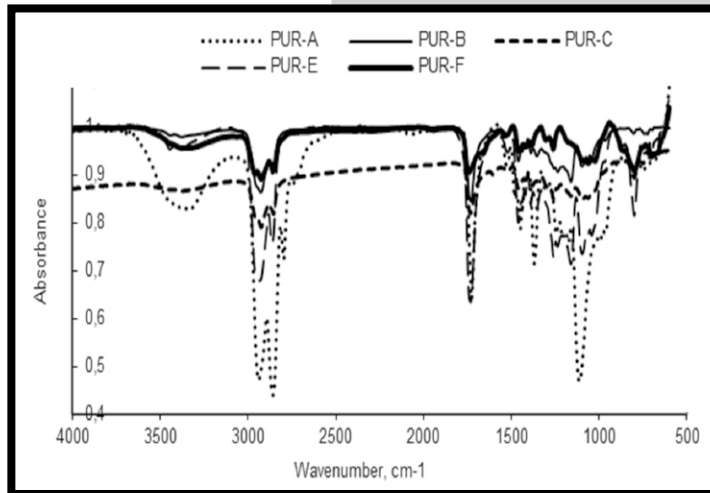
Materiał polimerowy, umieszczony w organizmie żywym, ma bezpośredni lub pośredni kontakt z komórkami krwi. Hemokompatybilność zaś jest jednym z podstawowych warunków, kwalifikujących materiał do dalszych badań nad jego bezpiecznym użytkowaniem dla celów medycznych.

Wpływ wybranych poliuretanów na wartości parametrów krwi: stężenie białych krwinek (WBC, leukocyty), stężenie czerwonych krwinek (erytrocytów) (RBC), hemoglobiny (HGB), hematokrytu (HCT) i płytek krwi (PLT) oznaczono przez porównanie z próbką kontrolną (krew nie kontaktująca się z próbką polimeru, inkubowana w takich samych warunkach). Wyniki badania oddziaływania poliuretanów na parametry krwi, po 15 minutach i 4 godzinach inkubacji w 37°C, przedstawiono na RYSUNKACH 2-6. Wartości średnie przedstawiono w postaci kolumn  $\pm$  odchylenie standardowe (n=9). Czarne linie oznaczają wartości referencyjne parametrów krwi.

Wartości parametrów hematologicznych zarówno próbek kontrolnych, jak i po kontakcie z poliuretanami, mieszczą się w zakresach wartości referencyjnych i są porównywalne dla wszystkich badanych próbek. Nie odnotowano istotnych różnic między wartościami w badanych próbkach, a próbkach kontrolnych, co wskazuje na brak hemolizy wywołanej obecnością materiału polimerowego.

Nieznaczne obniżenie stężenia białych krwinek po 4 godzinach inkubacji we wszystkich badanych próbkach może być związane z ich naturalnym rozpadem oraz adhezją do powierzchni próbki polimeru i próbówki. W pracy [16] autorzy, rejestrując zmiany kształtu krwinek pod mikroskopem elektronowym, stwierdzili ich wydłużenie i łączenie się w agregaty leukocyt – leukocyt i leukocyt – płytka krwi po kontakcie krwi z dzianiną poliestrową. Świadczy to o aktywacji białych krwinek, co jest pierwszym etapem „przystosowywania” wprowadzonego sztucznego materiału do krwi.

Jednym z najważniejszych wskaźników biogodności polimeru jest jego wpływ na liczbę płytek krwi. Obniżenie liczby płytek krwi jest częstym powikłaniem, występującym przy wprowadzeniu materiału polimerowego do organizmu [12]. Płytki krwi odpowiedzialne są za prawidłowe krzepnięcie krwi i biorą udział w początkowym etapie tworzenia układu komplementu, prowadzącego do tworzenia skrzeplin. Aktywacja komplementu, wywołana obecnością polimeru we krwi, powoduje adhezję komórek na powierzchni materiału oraz agregację i aktywację płytek krwi.



**RYS. 1. Widma FTIR suchych pozostałości po ekstrakcji poliuretanów heksanem.**  
**FIG. 1. FTIR spectra of solid residue of hexane extracts from polyurethanes.**

The higher amount of solid residue and observation of FTIR spectrum suggest that polyurethane with less amount of hard segments (NCO:OH = 2:1) – PUR-E - is more susceptible to degradation and erosion of low molecular chains, than PUR-B (NCO:OH = 3.7:1).

Unexpectedly polyurethanes with soft segments built only with  $\alpha$ -PHB (PUR-C and PUR-F) are resistant to boiling hexane. It is surprising because of their susceptibility to temperature growth (they are softening) and solubility in other organic solvents.

Polymer material, implanted into living organism, is directly or indirectly contacting with blood cells. Hemocompatibility is one of major parameters qualified material to further investigations for its safe using for medicine.

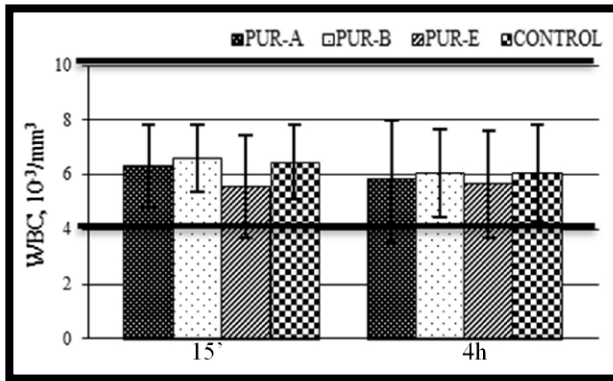
The influence of investigated polyurethanes on blood parameters: white blood cells (WBC, leucocyte), red blood cells (RBC, erythrocyte), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT) and platelets (PLT) was compared with control probe (blood sample, incubated in the same conditions, but has not been contacted with polymer). The results after 15 minutes and 4 hours of polymers incubation in blood are presented in FIGs 2-6. Columns represent average  $\pm$  standard deviation (n = 9). Black lines means references range.

Values of hematologic parameters before and after incubation of polyurethanes samples are in reference ranges, and are similar for all PURs. Significant differences in comparison to control probe are not observed what suggests lack of hemolysis activated by polyurethane samples presence.

Negligible decreasing of white blood cells concentration after 4 hours of incubation for all samples is connected probably with their natural breaking-up and with adhesion to surface of the polymer sample and tube. It confirmed the literature data [16], where authors observed that white cells were elongated and joined into leucocyte-leucocyte and leucocyte-platelet aggregates after contact with polyester knit fabric. They concluded that it was the first stage of adapting of implanted polymer material to plasma environment.

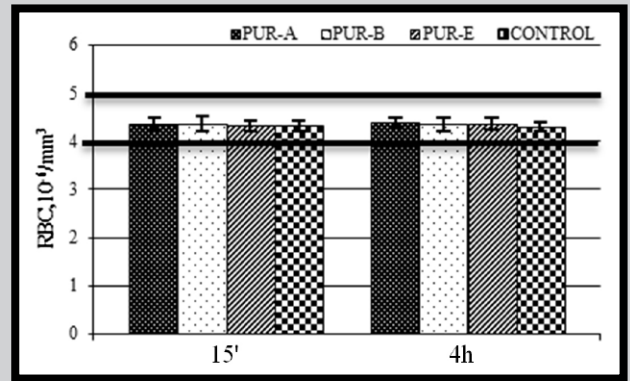
The influence of polymer on platelet number is one of the most important biocompatibility coefficients. Decreasing of platelet concentration is a common complication of polymer material inserting in organism [12]. Platelets are responsible for correct blood coagulation and participate in the first stage of constituting of complement for creation of thrombus. Complement activation, connected with polymer presence in blood, causes cell adhesion on surface of material and platelet activation.

In FIG. 6 the influence of PURs samples on platelet concentration is presented. No significant changes in platelet concentration during incubation were observed. They were similar to control probe. It is supposed that complement was not activated, what was confirmed by only small decreasing of white blood cell [17].



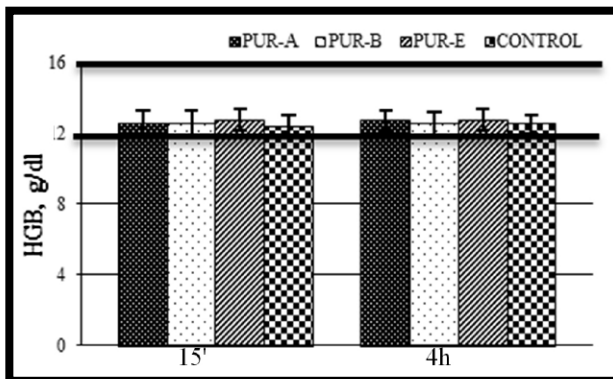
RYS. 2. Wpływ poliuretanów na stężenie białych krwinek (WBC).

FIG. 2. Influence of PURs sample on white blood cells (WBC) concentration.



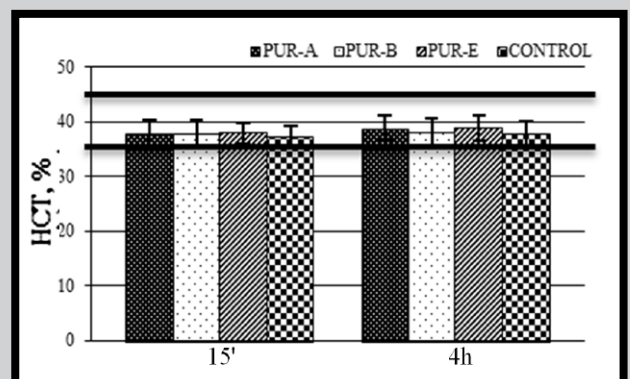
RYS. 3. Wpływ poliuretanów na stężenie czerwonych krwinek (RBC).

FIG. 3. Influence of PURs sample on red blood cells (RBC) concentration.



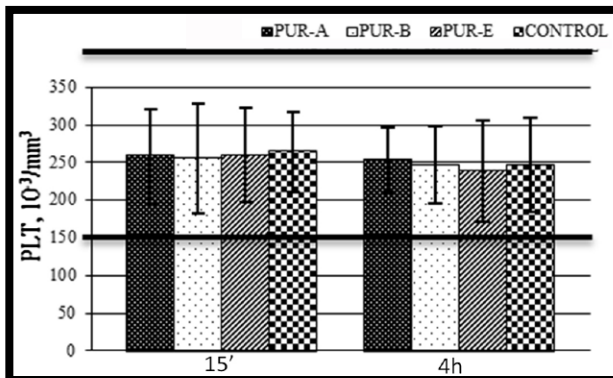
RYS. 4. Wpływ poliuretanów na stężenie hemoglobiny (HGB).

FIG. 4. Influence of PURs sample on hemoglobin (HGB) concentration.



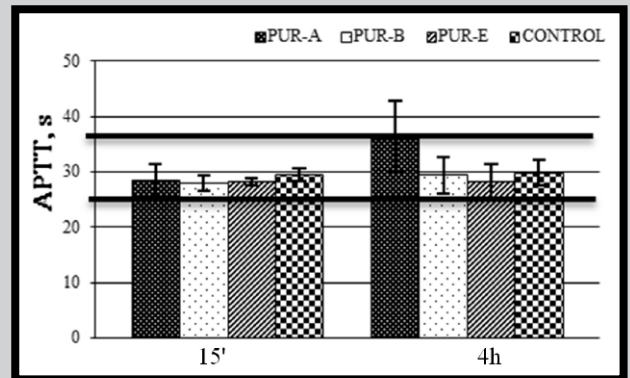
RYS. 5. Wpływ poliuretanów na stężenie hematokrytu (HCT).

FIG. 5. Influence of PURs sample on hematocrit (HCT) concentration.



RYS. 6. Wpływ poliuretanów na stężenie płytek krwi (PLT).

FIG. 6. Influence of PURs sample on platelets (PLT) concentration.



RYS. 7. Wpływ poliuretanów na czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT).

FIG. 7. Influence of PURs sample on APTT.

Na RYS. 6 przedstawiono wpływ poliuretanów na stężenie płytek krwi. Stężenie trombocytów w badanych próbkach w nieznanym stopniu uległo obniżeniu w czasie inkubacji w cieplarni. Są to jednak niewielkie zmiany, nieodlegające od zmian w ilości płytek krwi w próbce kontrolnej. Pozwala to przypuszczać, że nie doszło do aktywacji komplementu, co jest potwierdzone brakiem znacznego obniżenia stężenia białych krwinek [17].

During the first minutes after the implant immersion in living organism proteins are adsorbed on material surface and next the platelets undergo adhesion. Only small reduction of platelet concentration in comparison to control probe suggests the potential biocompatibility of polyurethanes. However it is necessary to carry out the investigations in dynamic conditions, which involve the rheologic parameter [12].

Już w czasie pierwszych minut od wprowadzenia ciała obcego do krwi dochodzi do adhezji białek na powierzchni materiału, a zaraz potem - do adhezji płytek krwi. Niewielki ubytek trombocytów w całej objętości badanych próbek krwi pozwala przypuszczać, że poliuretany mogą być biokompatybilne. Niezbędne są jednakże dalsze, wnikliwsze badania w tym zakresie, przeprowadzone zwłaszcza w warunkach dynamicznych, uwzględniających wpływ czynnika reologicznego [12].

Czas częściowej trombolastyny po aktywacji (czas kaolinowo-kefalinowy) (APTT) oznaczany jest dla oszacowania wewnętrznego, typowego szlaku koagulacji. APTT oznacza ilość sekund niezbędnych do powstania włókien fibryny w plazmie, po działaniu na nią czynnika częściowej trombolastyny (aktywny) i  $\text{CaCl}_2$  [18].

Na RYSUNKACH 7 i 8 przedstawiono wpływ poliuretanów na czas częściowej trombolastyny po aktywacji (APTT) oraz na stężenie fibrynogenu po 15 minutach i 4 godzinach inkubacji krwi w  $37^\circ\text{C}$ . Żaden z badanych polimerów w sposób istotny nie zmienił krzepliwości krwi po 15 minutach inkubacji. Wartości zarówno APTT, jak i FIB zbliżone były do wartości próby kontrolnej. Obecność poliuretanów PUR-B i PUR-E nie wpłynęła na czas koagulacji krwi oraz stężenie fibrynogenu również po 4 godzinach inkubacji.

Nieznaczne zmiany wywołane obecnością pozostałych poliuretanów w stężeniu fibrynogenu oraz w czasie częściowej trombolastyny po aktywacji sugerują, że otrzymane poliuretany z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) mogą być atrombogeniczne. Wskazane są jednak dalsze badania, zwłaszcza nad wpływem PUR-A na wydłużenie czasu koagulacji krwi.

Kolejnym etapem po badaniach statycznych *in vitro*, przy oznaczaniu hemokompatybilności, będą testy *ex vivo* i *in vivo*, które pozwolą zweryfikować wpływ warunków (kontakt z powierzchnią próbki, warunki inkubacji) prowadzenia doświadczenia, mogących indukować zmiany parametrów krwi.

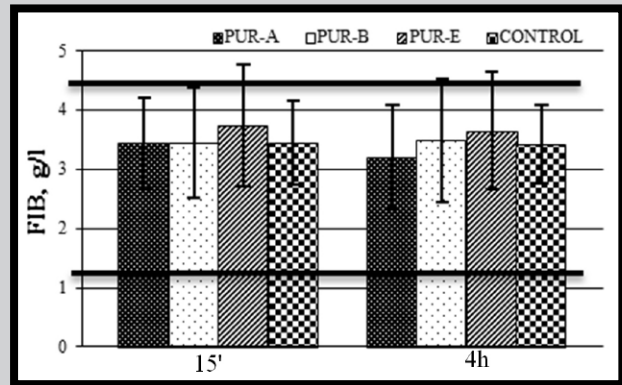
## Wnioski

W pracy badano nowe poliuretany z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) w aspekcie zastosowań medycznych.

Sorpcja oleju przez próbki poliuretanów otrzymane z udziałem PTMG i a-PHB jest znacznie większa niż w przypadku poliuretanów z PCL i a-PHB w segmencie giętkim. Poliuretany z dużą ilością segmentów sztywnych absorbują mało oleju roślinnego. Masa suchej pozostałości i pH roztworów wodnych wskazują na hydrolizę wiązań estrowych a-PHB i PCL. Obserwacje widma FTIR suchej pozostałości i jej masa po ekstrakcji heksanem wskazują na podatność poliuretanu PUR-A (z PTMG i a-PHB) na działanie heksanu.

Wartości parametrów hematologicznych zarówno próbek kontrolnych, jak i po kontakcie z poliuretanami, mieszczą się w zakresach wartości referencyjnych i są porównywalne dla wszystkich badanych próbek, co wskazuje na brak hemolizy wywołanej obecnością materiału polimerowego. Nieznaczne zmiany wywołane obecnością pozostałych poliuretanów w stężeniu fibrynogenu oraz w czasie częściowej trombolastyny po aktywacji sugerują, że otrzymane poliuretany z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) mogą być atrombogeniczne.

Wyniki badań oddziaływania otrzymanych poliuretanów na parametry krwi wskazują na celowość dalszych badań w kierunku oznaczenia ich potencjalnej hemokompatybilności.



RYS. 8. Wpływ poliuretanów na stężenie fibrynogenu (FIB).

FIG. 8. Influence of PURs sample on FIB concentration.

Activated Partial Thromboplastin Time (APPT) is measured for inert coagulation path estimation and means the minutes quantity necessary for fibrin formation in plasma (after actin and  $\text{CaCl}_2$  treatment) [18].

APPT and fibrinogen (FIB) concentration after incubation with polyurethanes are presented in FIGS 7 and 8.

After 15 minutes of incubation in blood there was no influence on blood coagulation. Values of APPT and FIB concentration are similar to control probe in all cases. PUR-B and PUR-E did not influence on investigated parameters even after 4 hours of incubation.

Insignificant changes in fibrinogen concentration and in APPT during incubation with direct contact with polymers samples suggest that obtained polyurethanes based on synthetic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) could be atrombogenic. In the case of PUR-A influence on the time extension of blood coagulation ought to be investigated in details.

The next stage of hemocompatibility investigations should be *ex vivo* and *in vivo* tests which could help to verify influence of conditions, like contact with tube surface or parameters of incubation.

## Conclusion

The preliminary investigation of biocompatibility of polyurethanes based on synthetic atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) were done.

It was stated that the oil sorption by polyurethane samples based on PTMG and a-PHB is much higher than for PURs with PCL and a-PHB in soft segments. Polyurethane with high content of hard segments absorbed low amount of vegetable oil. Solid residues and pH of water extract indicate on hydrolysis of a-PHB and PCL ester bonds of soft segments. In the case of PUR-A (based on a-PHB and PTMG) amount of the solid residue and its FTIR spectra indicate on susceptibility of that polyurethane to hexane.

For all polyurethanes values of hematologic parameters before and after incubation of polyurethanes samples in blood are in reference ranges. Differences in comparison to control probe are not observed what suggests the lack of hemolysis activated by polyurethane presence. Insignificant changes in platelet and fibrinogen concentration and in APPT during direct contact of blood with polymers samples suggest that polyurethanes based on synthetic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) could be atrombogenic.

The results of influence of polyurethanes on blood parameters obtained for whole blood indicate on purposefulness of further tests to verify their hemocompatibility.

## Piśmiennictwo

- [1] Adhikari R., Gunatillake P.A., Moore T.G., Biodegradable polyurethane and polyurethane ureas, Int. Patent, (2005) No. WO 2005/089778.
- [2] Gogolewski S., Biocompatible, biodegradable polyurethane materials with controlled hydrophobic to hydrophilic ratio, Pat. Int. (2006) WO 2006/010278.
- [3] Marcos Fernández M. Á A., San Roman del Barrio J., Abraham G.A., Non-toxic biodegradable polyurethanes which are intended for the controlled release of pharmaceuticals and for tissue engineering, Int. Patent, (2005) No. WO 2005/111110.
- [4] Woodhouse K.A., Skarja G.A., Biodegradable polyurethanes, US Patent (2001) No. US 6,221,997.
- [5] Lligadas G., Ronda J.C., Galiá M., Cádiz V.: Poly(ether urethane) networks from renewable resources as candidate biomaterials: synthesis and characterization. *Biomacromolecules*, 8 (2007) 686.
- [6] Pan J., Li G., Chen Z., Chen X., Zhu W., Xu K.: Alternative block polyurethanes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials*, 30 (2009) 2975.
- [7] Foster L.J.R., Tighe B.J., Centrifugally spun polyhydroxybutyrate fibres: accelerated hydrolytic degradation studies, *Polymer Degradation and Stability*, 87 (2005) 1.
- [8] Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (new) bio-control agents for a sustainable animal production, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 680.
- [9] Brzeska J., Dacko P., Janeczek H., Kowalczyk M., Janik H., Rutkowska M., Wpływ syntetycznego polihydroksymaślanu na wybrane właściwości nowych, otrzymanych z jego udziałem, poliuretanów do zastosowań medycznych. cz.II. Poliuretany z cykloalifatycznym diizocyjanianem w segmencie sztywnym, *Polimery*, 1 (2011) 27.

## References

- [10] Masiulianis B., Brzeska J., Tercjak A., Polyurethane elastomers from cycloaliphatic diisocyanate and polyols with participation of castor oil, *Elastomery*, 4, (2000) 3.
- [11] Farmakopea Polska, Wyd. VI, 2002.
- [12] Jurkowski P., Ocena wpływu modyfikacji biopolimeru poli(uretano-mocznikowego) z wbudowanymi bocznymi łańcuchami alifatycznymi na biogodność z krwią, (2001) Rozprawa Habilitacyjna, Akademia Medyczna w Bydgoszczy, Bydgoszcz.
- [13] Brzeska J., Dacko P., Gębarowska K., Janik H., Kaczmarczyk B., Kasperczyk J., Kowalczyk M., Rutkowska M. The structure of novel polyurethanes containing synthetic poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate], *Journal of Applied Polymer Science*, in press.
- [14] Thomas V., Jayabalan M., The effect of virtual cross linking on the oxidative stability and lipid uptake of aliphatic poly(urethane urea), *Biomaterials* 23 (2002) 273.
- [15] Szelest-Lewandowska A., Skupień A., Masiulianis B., Syntezy i właściwości nowych poliuretanów dla medycyny, *Elastomery* 6 (2002) 3.
- [16] Paluch D., Szymonowicz M., Pielka S., Rutowski R., Badania in vitro wpływu materiałów poliestrowych o różnym stopniu zwilżalności powierzchni na parametry hematologiczne krwi oraz na parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy, *Polimery w Medycynie*, 1-2 (2002) 41.
- [17] Thomas V., Kumari T.V., Jayabalan M.: In vitro studies on the effect of physical cross-linking on the biological performance of aliphatic poly(urethane urea) for blood contact applications, *Biomacromolecules* 2 (2001) 588.
- [18] Kainthan R.K., Janzen J., Levin E., Devine D.V., Brooks D.E., Biocompatibility testing of branched and linear polyglycidol, *Biomacromolecules* 7 (2008) 703.

# WPLÝW POLIURETANÓW Z SYNTETYCZNYM POLIHIDROKSYMAŚLANEM NA WZROST MIKROORGANIZMÓW

JOANNA BRZESKA<sup>1\*</sup>, HELENA JANIK<sup>2</sup>, MAREK KOWALCZUK<sup>3</sup>,  
MARIA RUTKOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AKADEMIA MORSKA W GDYNIA,  
KATEDRA CHEMII I TOWAROZNAWSTWA PRZEMYSŁOWEGO,  
UL. MORSKA 83, 81-225 GDYNIA, POLSKA

<sup>2</sup>POLITECHNIKA GDAŃSKA, KATEDRA TECHNOLOGII POLIMERÓW,  
UL. NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK, POLSKA

<sup>3</sup>POLSKA AKADEMIA NAUK,  
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
UL. SKŁODOWSKA-CURIE 34, 41-800 ZABRZE, POLSKA

\* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

## Streszczenie

*W pracy przedstawiono wyniki badań oddziaływania nowych alifatycznych poliuretanów (PUR), otrzymanych z udziałem ataktycznego poli([R,S]-3-hydroksyasmałanu (a-PHB), na wzrost Staphylococcus aureus, Escherichia coli i Candida albicans wokół próbek polimerów. Strefa zahamowania wzrostu mikroorganizmów oznaczona została także dla handlowego, biomedycznego poliuretanu - ChronoThane T oraz dla czystego rozpuszczalnika, użytego do syntezy poliuretanów (N,N-dimetyloformamidu).*

*Najbardziej wrażliwym na działanie materiału poliuretanowego w warunkach prowadzenia doświadczenia był szczep Staphylococcus aureus, najmniej zaś - Candida albicans. Wykluczono wpływ czystego rozpuszczalnika na wzrost mikroorganizmów. Natomiast ChronoThane T tylko w niewielkim stopniu ograniczył ich wzrost. Stwierdzono więc, że obecność poli([R,S]-3-hydroksyasmałanu w strukturze poliuretanów wpłynęła na ich właściwości biostatyczne.*

**[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 73-78]**

## Wprowadzenie

Poliuretany (PUR) to materiały bardzo często stosowane w medycynie [1-4]. Ich właściwości mogą być łatwo modyfikowane, zatem PUR może być otrzymany, jako tworzywo o cechach odpowiednich zarówno dla degradowalnych, jak i niedegradowalnych implantów [5-7]. Materiał na wszczepy sztuczne może być biostatyczny dzięki użyciu odpowiednich substratów podczas syntezy (chemicznie lub fizycznie związanych z polimerem) albo przez modyfikacje powierzchni (wprowadzając wydzielane lub związane biocydy [8-10] lub antybiotyki [11] lub też pokrywając powierzchnię bakteriostatyczną powłoką [12]).

Jedną z metod otrzymania biokompatybilnych poliuretanów jest użycie w syntezie substratów, naturalnie występujących w organizmie (jak fosfatydylocholina [13]) lub też ulegających degradacji do produktów naturalnych, jak poli([R]-3-hydroksyasmałan) (PHB) [14-17].

Produkt degradacji PHB – kwas 3-hydroksyasmałowy - należy do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, charakteryzujących się właściwościami przeciwbakteryjnymi [18]. Główną przyczyną zahamowania wzrostu bakterii przez kwasy tłuszczowe jest ich wnikanie przez błony komórkowe, a następnie dysocjacja na aniony i kationy w cytoplazmie komórki bakterii.

# INFLUENCE OF POLYURETHANES BASED ON SYNTHETIC POLY([R,S]- 3-HYDROXYBUTYRATE) ON MICROORGANISMS GROWTH

JOANNA BRZESKA<sup>1\*</sup>, HELENA JANIK<sup>2</sup>, MAREK KOWALCZUK<sup>3</sup>,  
MARIA RUTKOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GDYNIA MARITIME UNIVERSITY, DEPARTMENT OF CHEMISTRY,  
83 MORSKA STREET, 81-225 GDYNIA, POLAND

<sup>2</sup>GDAŃSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF POLYMER TECHNOLOGY,  
11/12 NARUTOWICZA STREET, 80-952 GDAŃSK, POLAND

<sup>3</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 SKŁODOWSKA-CURIE STREET, 41-800 ZABRZE, POLAND

\* E-MAIL: ASIAB@AM.GDYNIA.PL

## Abstract

*In the present study the influence of novel aliphatic polyurethanes (PUR), based on atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB), on growth of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans in the area around polymer samples has been estimated. For comparison measurement of zone of inhibition was also performed for ChronoThane T – the medical grade aliphatic polyurethane and for pure solvent - N,N-dimethylformamide used in the synthesis of polyurethanes.*

*Staphylococcus aureus was the most sensitive microorganism to polymer material in conditions of investigation whereas Candida albicans – the most resistant. The influence of pure solvent on microorganisms growth was excluded and ChronoThane T only in small degree restricted bacterial vitality so it was concluded that presence of poly([R,S]-hydroxybutyrate) in polymer structure was responsible for biostatic properties of obtained polyurethanes.*

**[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 73-78]**

## Introduction

Polyurethanes (PURs) belong to materials which are very often used in medicine [1-4]. Their properties can be easily modified, so PURs can be produced as material with appropriate features for degradable or non-degradable implants [5-7]. Material for artificial grafts can be designed as biostatic by using proper substrates during synthesis (bonded by chemical or physical interactions), or by surface modification (by using of leachable or non-leachable biocides [8-10] or antibiotics [11] or surface covering by bacteriostatic cover [12]).

One of the methods of obtaining biocompatible polyurethanes is using substrates, which naturally exist in human organism (like phosphatidylcholine [13]), or degrade into natural products, like poly([R]-3-hydroxybutyrate) (PHB) [14-17].

Product of PHB degradation - 3-hydroxybutyric acid - belongs to short-chain fatty acids and reveals antibacterial activity [18]. The major mechanism of growth inhibition caused by short-chain fatty acids is its passing by bacteria cells and dissociating into anions and protons in cytoplasm.

Dla utrzymania pH cytoplazmy na odpowiednim poziomie, nadmiar protonów jest usuwany kosztem dużych strat energii komórki bakterii. Ponadto niskocząsteczkowe kwasy tłuszczowe zaburzają przepuszczalność błon komórkowych i transport substancji odżywczych [18].

Syntetycznym odpowiednikiem PHB jest chemicznie otrzymany ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan) (a-PHB), którego oligomery są biokompatybilne [19].

Białka ulegają adsorpcji na powierzchni materiału w ciągu kilku sekund od umieszczenia implantu w organizmie żywym. Natychmiast składniki krwi (trombocyty, komórki endotelium i fibroblasty), oraz bakterie i grzyby przyczepiają się do warstwy białkowej i – mimo profilaktyki antybiotykowej – wywołując infekcję miejsca operowanego. Zatem istotna jest zdolność materiału do selektywnej adsorpcji białek i przeciwdziałania adhezji mikroorganizmów.

Mimo, że przy szeroko rozwiniętej profilaktyce antyseptycznej oraz zalecanej przy wszystkich zabiegach i operacjach z wprowadzeniem materiałów syntetycznych antybiotykoterapii profilaktycznej rzadko dochodzi do zakażeń, to jednak zainfekowanie rany pooperacyjnej ciągle może być przyczyną odrzucenia implantu lub wywołać ogólnoustrojową infekcję. Zakażenia protez naczyniowych obejmują 1-5% operowanych chorych [11], zaś 13,2% pacjentów zostaje zainfekowanych podczas cewnikowania [20]. Zakażenie materiału polimerowego nastąpić może wskutek niewłaściwego przechowywania implantu lub niesterylnych warunków operacji. Mikroorganizmy mogą też być przeniesione z zainfekowanych miejsc w organizmie, jak zęby lub gardło.

Do mikroorganizmów, będących najczęstszą przyczyną zakażeń wczesnych, które pojawiają się do kilku tygodni po operacji, należą: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* i *Klebsiella species*. Zakażenia późne (ujawniające się nawet po kilku miesiącach lub latach od zabiegu) wywoływane są najczęściej przez *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas species* i *Staphylococcus epidermidis* [11]. W chirurgii ortopedycznej, ze względu na stosowane tam syntetyczne wszczepy, 55% to zakażenia wywołane przez *Staphylococcus epidermidis*, 10-20% przez *Staphylococcus aureus*, zaś pozostałe przez *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* i grzyby *Candida* [21]. Natomiast infekcje cewników wewnątrznaczyniowych (intravascular catheter-associated infections) wywoływane są przez koagulazoujemne *Staphylococci* (40%), *Staphylococcus aureus* (20%) i grzyby, zwłaszcza przez *Candida albicans* (10%) [22].

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) to bardzo oporny na leki przedstawiciel bakterii Gram-dodatnich. *Staphylococcus aureus* jest często przyczyną infekcji ran pooperacyjnych (20% przypadków sepsy wywołanych jest przez gronkowca złocistego [23]), z powodu łatwego przylegania do powierzchni naturalnych organów, jak i wprowadzonych implantów sztucznych. Jest jedną z nielicznych bakterii, posiadającą receptory rozpoznające i przyczepiające się do fibronektyny [20,23].

Pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*) (bakterie Gram-ujemne) stanowi fizjologiczną florę układu pokarmowego człowieka i zwierząt. Jednakże bakterie *Escherichia coli*, które są nieszkodliwe w jelcicie, mogą powodować schorzenia innych układów. *Escherichia coli* jest najczęstszym bakteryjnym patogenem u człowieka oraz jedną z głównych bakterii wywołujących sepsę ogólnoustrojową (powoduje ok. 15% przypadków sepsy szpitalnej) [23].

Pleśniawka (*Candida albicans*) jest przedstawicielem drożdżaków (przedstawiciel grzybów Gram-dodatnich), które naturalnie bytują w organizmie ludzkim, nie wywołując zakażenia. Jeśli jednak dostaną się do organizmu żywego o obniżonej odporności (spowodowanej ciężką,

For maintaining of constant pH of cytoplasm excess protons must be exported, what is the reason of depletion of cellular energy. What more short-chain fatty acids interfere nutrient transport, damage cytoplasmic membrane and disrupt of outer membrane permeability of bacterial cells [18].

The synthetic alternative of PHB is chemically synthesized atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB), which oligomers are known as biocompatible [19].

It is known that proteins are adsorbed on surface of material only a few seconds after immersion an implant into living organism. Immediately blood elements (thrombocytes, endothelium cells, and fibroblasts), bacteria and fungi are adhered to protein layer, and despite of antibiotic prophylactic, surgery wound infects repeatedly. So, the ability of material to selective protein adsorption and to non-adhesion of microorganism is very important.

Despite of antiseptic prophylactic and antibiotic therapy during surgery with polymeric implanted material, the bacterial or fungal infection still can be a reason of graft refusing or even sepsis of the whole organism. The vessels prosthesis infection appears in 1-5% of medical operations [11] and 13.2 % of patients are infected during catheterization [20]. Polymeric materials can be seeding by no sterility conditions either of implant preserving or during surgery. Microorganisms can also derive from a distant side, like infected tooth or throat.

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* and *Klebsiella species* are the microorganisms which cause the early infection (appearing up to few weeks after surgery). The late infection (appearing after few months or even years after operation) is caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas species* and *Staphylococcus epidermidis* [11]. In orthopedic surgery, because of synthetic grafts, 55% of infections are evoked by *Staphylococcus epidermidis*, 10-20% by *Staphylococcus aureus*, and the rest by *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* and fungi - *Candida sp.* [21]. Intravascular catheter-associated infections are caused by coagulase-negative *Staphylococci* (40%), *Staphylococcus aureus* (20%) and fungi, specially by *Candida albicans* (10%) [22].

*Staphylococcus aureus*, belonging to gram-positive bacteria, is very often the reason of surgery infection because of adhere ability to natural tissue and synthetic material surface. 20% of hospital sepsis is evoking by *Staphylococcus aureus* [23]. It is also one of not numerous bacteria, which possess fibronectin – recognize receptors what causes that they are especially dangerous [20,23].

*Escherichia coli* (gram-negative bacteria) naturally exist in alimentary tract, but can infect other systems and tissues. *Escherichia coli* is one of bacterium caused sepsis (15% of hospital sepsis is evoking by it [23]).

Also *Candida albicans* physiologically lives in human organism and can induce an infection only in the case of weaknesses or decreases of natural organism immunology (caused by pregnancy, lack of vitamins, diabetes, AIDS or surgery operation). *Candida albicans* (belongs to gram-positive fungi) can produce toxins and enzymes, destructing the cell walls of living organism. Generally fungi are more resistance on environmental factors than bacteria, because of much complicated eukaryotic fungal cell structure in comparison to prokaryotic bacterial cells [23].

The aim of the present study was to estimate the influence of novel aliphatic polyurethanes, based on atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate), on growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* in the area around polymer samples. For comparison the measurement of zone of inhibition was also performed for ChronoThane T – the medical grade aliphatic polyurethane and for pure solvent.

wiekim podeszłym, niedoborem witamin, lub interwencją chirurgiczną) mogą wywołać infekcję, zwaną potocznie kandydozą. Organizmy te zdolne są do produkcji wielu toksyn, a także enzymów, niszczących ściany komórkowe. Wyjątkowa oporność grzybów na działanie czynników zewnętrznych wynika też ze znacznie bardziej złożonej budowy eukariotycznej komórki grzyba niż prokariotycznej komórki bakterii [23].

Celem pracy było oznaczenie wpływu nowych alifatycznych poliuretanów, zawierających w swej strukturze ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan), na wzrost *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* dookoła próbek polimerów. Dla porównania oznaczono też strefę zahamowania wzrostu mikroorganizmów dla handlowego, biomedycznego poliuretanu ChronoThane T oraz dla rozpuszczalnika, użytego w syntezie poliuretanów.

## Część doświadczalna

### Materiały

Syntezę poliuretanów prowadzono metodą dwuetapową [24,25]. Segment giętki zbudowany jest z poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) (a-PHB, Mn=2000, otrzymany z CMPIW PAN, Zabrze) i polikaprolaktonodiolu (PCL, Mn=1900, Aldrich) lub polioksytetrametylenodiolu (PTMG, Mn=2000, Aldrich). Segment sztywny zaś otrzymano w wyniku reakcji 4,4'-diizocyjanian dicykloheksylometanu ( $H_{12}$ MDI, Alfa Aesar) i 1,4-butanodiolu (1,4-BD, Aldrich). Stosunek molowy grup NCO:OH w prepolimeryze wynosił 3,7:1 oraz 2:1. Jako rozpuszczalnika użyto N,N-dimetyloformamidu (DMF, Labscan Ltd). Skład poliuretanów przedstawiono w TABELI 1.

Alifatyczny polieteruretan - ChronoThane T, otrzymany dzięki uprzejmości AdvanSource Biomaterials Corporation w Wilmington, USA, uformowano w folie (przez rozpuszczenie granulatu poliuretanowego w DMF, a następnie odparowanie rozpuszczalnika).

Folie badanych poliuretanów oraz ChronoThane T ogrzewano próżniowo w temp. 50°C przez 20 godz., a następnie po pocięciu na krążki – sterylizowano plazmą generowaną z  $H_2O_2$  w aparacie STERRAD\*50 (Johnson & Johnson), przez 45 minut w 50°C. Część próbek sterylizowano bez uprzedniego wygrzewania (w 50°C przez 20 godz.).

### Strefa zahamowania wzrostu

Strefę zahamowania wzrostu mikroorganizmów wokół próbek poliuretanów badano dla oznaczenia wpływu badanych polimerów na mikroorganizmy. Do badania wybrano szczepy bakterii i grzyba, typowe dla zakażeń w implantologii, tj. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) oraz *Candida albicans* (pochodzącego z materiału klinicznego).

Trzy sterylne krążki poliuretanu (8 mm<sup>2</sup> średnicy) umieszczono na podłożu Müller – Hinton Agar, po wcześniejszym rozprowadzeniu mikroorganizmów (0,5 McF). Płytkę z krążkami polimeru preinkubowano w temperaturze pokojowej, przez ok. 15 minut, a następnie inkubację kontynuowano w 37°C, przez 24 godziny. Po inkubacji płytki wyjęto z cieplarki. Wynik odczytano, mierząc strefę zahamowania wzrostu kolonii mikroorganizmów od krawędzi krążków.

Dla porównania badanie wykonano również dla ChronoThane T oraz dla krążków bibuły zwilżonych DMF (bezpośrednio po zwilżeniu oraz po odparowaniu rozpuszczalnika).

## Experimental

### Materials

Synthesis of polyurethane was carried out in a two-step reaction, as reported previously [24,25]. Soft segments were built from atactic, hydroxyterminated poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) (a-PHB, Mn=2000, supplied from CMPIW PAS, Zabrze) and polycaprolactone diol (PCL, Mn=1900, Aldrich) or polyoxytetramethylene diol (PTMG, Mn=2000, Aldrich). Hard segments contained 4,4'-methylene dicyclohexyl diisocyanate ( $H_{12}$ MDI, Alfa Aesar) and 1,4-butanediol (1,4-BD, Aldrich). The molar ratio of NCO:OH groups in prepolymer was 3.7:1 and 2:1. N,N-dimethylformamide (DMF, Labscan Ltd) was used as a solvent. Composition of obtained polyurethane is presented in TABLE 1.

Aliphatic polyetherurethane - ChronoThane T, kindly supplied from AdvanSource Biomaterials Corporation in Wilmington, USA, was formed into foil (by dissolving in DMF and then its evaporation).

**TABELA 1. Skład poliuretanów.**  
**TABLE 1. Composition of obtained polyurethanes.**

PUR	Skład segmentów giętkich / Composition of soft segment	Segmenty sztywne / Hard segment	NCO:OH w prepolimeryze / in prepolymer
PUR-B	23% a-PHB + 77% PCL	$H_{12}$ MDI+1.4-BD	3.7:1
PUR-C	100% a-PHB	$H_{12}$ MDI+1.4-BD	3.7:1
PUR-D	23% a-PHB + 77% PTMG	$H_{12}$ MDI+1.4-BD	2:1
PUR-E	23% a-PHB + 77% PCL	$H_{12}$ MDI+1.4-BD	2:1

Foils of investigated polyurethanes and ChronoThane T were heated at temp. 50°C for 20 h in vacuum dryer, and after cutting into circum samples, they had been plasma ( $H_2O_2$ ) sterilized in STERRAD\*50 apparatus (Johnson & Johnson), for 45 minutes at 50°C. Some polyurethanes samples were sterilized without additional heating (at 50°C for 20 h).

### Zone of inhibition measurements

Zone of inhibition measurements [9] were performed on polyurethanes samples, to evaluate their influence on typical for biomaterial infections microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Becton Dickinson Diagnostic), *Escherichia coli* (ATCC 25922, Becton Dickinson Diagnostic) and *Candida albicans* (derivated from clinical material).

Three sterile circle samples of the material (8 mm of diameter) were carefully placed onto the surface of Müller-Hinton agar after the plate was inoculated with microorganisms (0.5 McFarland). Plates with polymer samples were pre-incubated at room temperature for 15 minutes and then were incubated at 37°C for 24 hours. After incubation the plates were removed from incubator and inspected for regions surrounding the polymer samples in which microorganisms growth was absent or reduced. The average distance between the edges of the polymer material and the beginning of the bacterial and fungal lawn was determined.

The influence on microorganisms growth around ChronoThane T samples and around paper samples wetted with DMF (with and without evaporation of solvent) was estimated as well.

Wyniki obserwacji strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów, mierzone jako odległość między krawędzią próbki poliuretanu, a żywymi koloniami przedstawiono w TABELI 2 i 3.

Badane poliuretany, a także handlowy ChronoThane T nie zawierają w swojej strukturze wymywanych biocydów, zatem nie spodziewano się, że wzrost mikroorganizmów dookoła próbek polimerów zostanie zahamowany.

Dane przedstawione w TABELI 2 wskazują, że *Staphylococcus aureus* jest najbardziej wrażliwym, spośród badanych szczepów, mikroorganizmem na kontakt z próbką poliuretanu. Znacznie mniejsze odsunięcia wokół krążków polimerów, umieszczonych na płytce z wysianym szczepem *Escherichia coli*, wynikają ze złożoności budowy ścian komórkowych komórek bakterii. Zewnętrzną ochronę bakterii gram-ujemnych stanowi wielowarstwowa, złożona ściana komórkowa, gdy tymczasem struktura ściany komórkowej bakterii gram-dodatnich (do których należy *Staphylococcus aureus*) jest znacznie prostsza [23,26]. Wysoka odporność komórek *Candida albicans* na działanie czynników zewnętrznych wynika z ich dimorfizmu (czyli wzrostu w fazie drożdżowej w postaci blastospor lub w fazie nitkowatej) oraz z wydzielania przez komórki grzyba śluzowej otoczki, szczelnie chroniącej komórki.

Aby wykluczyć wpływ rozpuszczalnika na wzrost mikroorganizmów na podłożu Müeller – Hinton Agar umieszczono trzy krążki bibuły (8 mm<sup>2</sup>) nasączone DMF (badanie powtórzone dla bibuły przed i po odparowaniu rozpuszczalnika). W żadnym wypadku nie zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu *Escherichia coli* and *Candida albicans*, podobnie jak dla *Staphylococcus aureus* [27]. Wskazuje to na brak właściwości biostatycznych czystego DMF.

Jednocześnie oznaczono wpływ zahamowania wzrostu bakterii dookoła próbek poliuretanów przed i po wygrzewaniu w 50°C przez 20 godzin. Biorąc pod uwagę, że mikrostruktura poliuretanów ulega reorganizacji podczas ogrzewania, przypuszcza się, że mobilne łańcuchy segmentów giętkich, wzbogacone w a-PHB (wykazujący prawdopodobne działanie przeciwbakteryjne), przesuwają się na powierzchnię poliuretanu. Zahamowanie wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* wokół poliuretanów PUR-B i PUR-D wynosiło odpowiednio 8 i 10 mm od krawędzi próbek (TABELA 2). Wyniki doświadczenia powtórzonego dla próbek poliuretanów dodatkowo ogrzanych wskazują, że strefy odsunięcia zmniejszyły się do 6 i 8 mm. Podobną zależność zaobserwowano badając zahamowanie wzrostu bakterii *Escherichia coli* (TABELA 2).

Segmenty giętkie zawierające a-PHB, zlokalizowane są prawdopodobnie na powierzchni próbek poliuretanów hamując wzrost mikroorganizmów. W przypadku PUR o niskiej gęstości ruchliwość łańcuchów powinna być wysoka ułatwiając tym samym ich przemieszczanie się na powierzchnię. Potwierdzają to obserwacje strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów wokół próbek polimerów (TABELA 2). Poliuretany z większą zawartością segmentów giętkich (NCO:OH = 2:1 w prepolimerze) – PUR-D i PUR-E – mają większy wpływ na żywotność bakterii i grzybów niż PUR-B i PUR-C (NCO:OH = 3,7:1 w prepolimerze). Poliuretany te mają najmniejszą gęstość, gdy tymczasem PUR-C – największą [28]. Wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* dookoła PUR-C był tylko nieznacznie zahamowany w porównaniu do pozostałych poliuretanów (TABELA 2). Nie zaobserwowano natomiast strefy odsunięcia wokół próbek umieszczonych na płytkach z *Escherichia coli* i *Candida albicans*.

The observation of zones of microorganism growth inhibition measured as the average distance between the edges of the polymer material and the beginning of the bacterial and fungal lawn are shown in TABLE 2 and 3.

No inhibition zone of the microorganisms growth around the polymer samples was expected for PURs and ChronoThane T samples, because they did not contain leachable biocides in their structure. It was surprising that bacterial growth around the polyurethane was inhibited (TABLE 2, 3).

Data shown in TABLE 2 indicate that *Staphylococcus aureus* was the most sensitive microorganism to polymer material in conditions of investigation. Much smaller influence of synthetic material on *Escherichia coli* colony was resulting from the more complicated (than for gram-positive) structure of gram-negative bacteria cells' wall [23,27]. The very high resistance of *Candida albicans* on outside factors was connected with a fungi dimorphism (growth as blastospore or as thread phase) and ability to matrix produce.

For excluding of the pure solvent influence on microorganisms growth the circle tissue-paper samples (8 mm of diameter), wetted previously with DMF (with and without an evaporation of solvent), were immersed in seeded agar plate. No zones of inhibition of *Escherichia coli* and *Candida albicans* microorganisms were observed around paper samples with DMF in all cases. It was in agreement with the results of investigation of *Staphylococcus aureus* growth in contact with that solvent [26]. It is proving the lack of bacterio- and fungistatic properties of pure DMF.

Simultaneously the observations of zones of bacterial growth inhibition around samples of polyurethanes before and after additional vacuum heating at 50°C for 20 hours were performed. Taking under consideration that microstructure of polyurethanes is reorganized during heating, it was stated that possible is that the mobile chains of soft segments, enriched in a-PHB (probably revealing antibacterial activity), had moved to the polymer surface. The inhibition of *Staphylococcus aureus* bacteria growth was observed in 8 and 10 mm from edge of PUR-B and PUR-D samples (TABLE 2). The zone of inhibition decreased to 6 and 8 mm for samples of those polyurethanes, which were additionally heated. The similar observations were done during the estimation of zone of inhibition on *Escherichia coli* bacteria (TABLE 2).

Soft segments of polyurethanes containing a-PHB were probably located on surface of polymer samples what restrained microorganisms growth. In the case of low density PURs mobility of chains was high what facilitated their migration to the sample surface. It was confirmed by observations of zones of microorganisms growth around PURs samples (TABLE 2). Polyurethanes with higher amount of soft segments (NCO:OH = 2:1 in prepolymer) – PUR-D and PUR-E – had the higher influence on bacteria and fungi vitality than PUR-B and PUR-C (NCO:OH = 3.7:1 in prepolymer). Those polymers revealed the smallest density among obtained polyurethanes, whereas the density of PUR-C was the highest [28]. The growth of *Staphylococcus aureus* bacteria around PUR-C samples was slightly inhibited in comparison to other polyurethanes (TABLE 2), and no zone of inhibition was observed around samples on plates inoculated with *Escherichia coli* and *Candida albicans*.



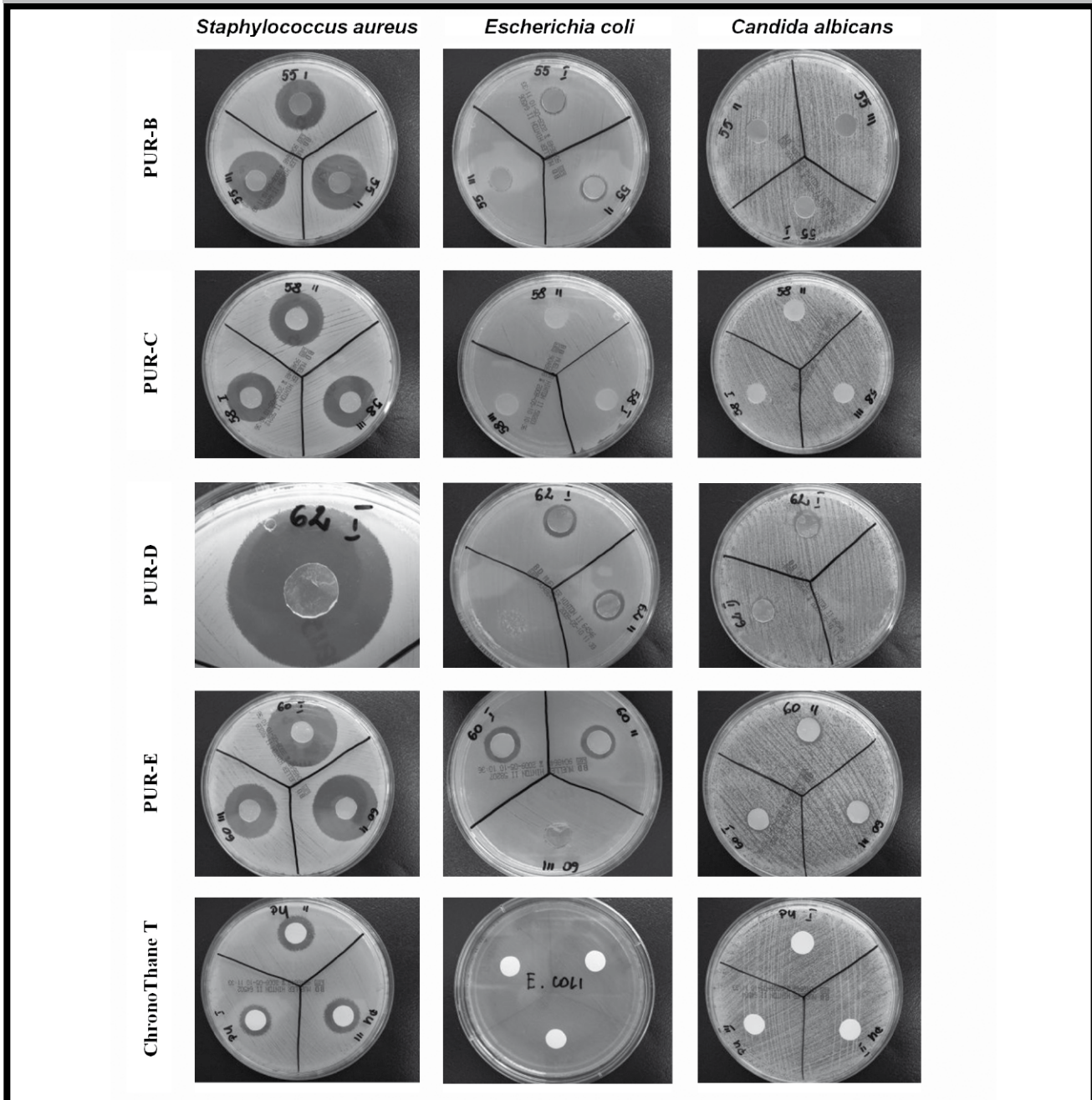
**TABELA 2.** Strefa zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*, mierzona jako odległość od krawędzi próbki poliuretanu do żywych bakterii i grzybów ( $\pm$ odchylenie standardowe).  
**TABLE 2.** Zone of growth inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, measured as the average distance between the edges of the polymer material and the beginning of the bacterial and fungal lawn ( $\pm$ standard deviation).

PUR	Strefa zahamowania wzrostu / Zone of inhibition [mm]		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
PUR-B	$(8\pm 1.0^* / 6\pm 2.0)^{**}$	$1.5\pm 0.5^* / 0.5\pm 0.1$	0
PUR-C	$6\pm 1.0$	0	0
PUR-D	$10\pm 2.0^* / 8\pm 1.5$	$2\pm 1.0^* / 1\pm 0.5$	$0.5\pm 0.1$
PUR-E	$7.5\pm 2.5$	$2\pm 1.0$	$0.5\pm 0.1$
ChronoThane T	$2.5\pm 1.0$	0	0

\* strefa zahamowania wzrostu bakterii oznaczona przed dodatkowym wygrzewaniem ( $50^\circ\text{C} / 20$  godz.), \*\* dane publikowane w [27]  
 \* zone of growth inhibition of bacteria before additional heating ( $50^\circ\text{C} / 20$  h), \*\* data presented in [27]

**TABELA 3.** Zdjęcia płytek agarowych z próbkami poliuretanów (ogrzewanych dodatkowo w  $50^\circ\text{C}$  przez 20 godz. przed badaniem) z utworzonymi strefami zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* po inkubacji w  $37^\circ\text{C}$  przez 24 godz.

**TABLE 3.** Pictures of plates with the zone inhibition, resulting from contact of polyurethanes samples (additionally heated at  $50^\circ\text{C}$  for 20 h before experiment) with agar plates inoculated with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h.



Oznaczenie wpływu nowych alifatycznych poliuretanów, zawierających w swej strukturze ataktyczny poli([R,S]-3-hydroksymaślan), na wzrost *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans* dookoła próbek polimerów wskazuje na ich właściwości biostatyczne. *Staphylococcus aureus* jest najbardziej wrażliwym, spośród badanych szczepów, mikroorganizmem na kontakt z próbką poliuretanu. Wiedząc, że kwas 3-hydroksymaślowy należy do kwasów tłuszczowych, charakteryzujących się działaniem przeciwbakteryjnym, stwierdzono, że obecność poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) ma wpływ na zahamowanie wzrostu mikroorganizmów dookoła próbek polimerów. Istotne znaczenie ma także gęstość poliuretanów. Próbkę PUR o małej gęstości wyraźnie wpłynęły na zahamowanie rozwoju bakterii i grzybów. Przypuszcza się, że podczas ogrzewania próbek poliuretanów ich struktura uległa reorganizacji i mobilne segmenty giętkie z poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) migrowały na powierzchnię próbek, co było przyczyną zahamowania rozwoju mikroorganizmów. Wyniki badań nie wskazują jednoznacznie na biobójcze lub biostatyczne właściwości otrzymanych poliuretanów, lecz planowane badania adhezji bakterii do powierzchni poliuretanów mogą pomóc w ich jednoznacznej ocenie.

Biorąc pod uwagę wyniki badań hemokompatybilności otrzymanych poliuretanów z syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem) oraz ich wpływ na zahamowanie wzrostu mikroorganizmów chorobotwórczych można przyjąć, że jest to materiał, nadający się do dalszych badań nad zastosowaniem w medycynie.

## Conclusion

The determination of the influence of novel aliphatic polyurethanes, based on atactic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate), on growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* indicated on the biostatic properties of these polyurethanes. The microorganisms growth was the most inhibited in the case of *Staphylococcus aureus*. Knowing that 3-hydroxybutyrate belonging to fatty acids, revealed antibacterial activity, it was also concluded that poly([R,S]-hydroxybutyrate) was responsible for the decrease of microorganism growth around polymer samples. Moreover the density of polymers seemed to matter in that case. The polyurethanes with low density revealed the distinct influence on bacteria and fungi vitality. It is possible that during heating of PURs samples the structure was reorganized and mobile segments with poly([R,S]-3-hydroxybutyrate) migrated to the polymer surface, what was the probably reason of microorganisms growth restrain. The obtained results not clearly suggested the biocidal or biostatic properties of resultant polyurethanes, but the future determination of bacterial adhesion onto polymer surface might help to estimate their bactericidal or bacteriostatic properties.

Taking under consideration the previous results of hemocompatibility estimation of obtained polyurethanes, and their influence on growth of pathogenic microorganisms it could be concluded that PURs with poly([R,S]-hydroxybutyrate) are the promising material for medical application.

## Piśmiennictwo

- [1] Masiulanis B.: Biodegradowalne poliuretany dla medycyny. *Elastomery*, 2 (2003) 3.
- [2] Frost M., Meyerhoff M.E.: In Vivo Chemical Sensors: Tackling Biocompatibility. *Analytical Chemistry*, 1 (2006) 7371.
- [3] Balas A., Rajkiewicz M., Grzywa E., Janik H., Lisowska R., Gęsiak M., Wojtyńska E., Polit-Wilson D.: Materiały opatrunkowe stosowane w ortopedii i traumatologii. Cz. II. Qasi-prepolimery uretanowe – chemoreaktywne składniki opatrunków z kompozytów poliuretanowo-tkaninowych. *Polimery*, 10 (2001) 715.
- [4] Gogolewski S.: Biocompatible, biodegradable polyurethane materials with controlled hydrophobic to hydrophilic ratio. *Pat. Int.*, WO 2006/010278 A1.
- [5] Pierce B.F., Brown A.H., Sheares V.V.: Thermoplastic Poly(ester urethane)s with Novel Soft Segments. *Macromolecules*, 41 (2008) 3866.
- [6] Tatai L., Moore T.G., Adhikari R., Malherbe F., Jayasekara R., Griffiths I., Gunatillake P.A.: Thermoplastic biodegradable polyurethanes: The effect of chain extender structure on properties and in-vitro degradation. *Biomaterials*, 28 (2007) 5407.
- [7] Aksoy A.E., Hasirci V., Hasirci N.: Surface Modification of Polyurethanes with Covalent Immobilization of Heparin. *Macromolecular Symposia*, 269 (2008) 145.
- [8] Flemming R.G., Capelli C.C., Cooper S.L., Proctor R.A.: Bacterial colonization of functionalized polyurethanes. *Biomaterials*, 21 (2000) 273.
- [9] Kébir N., Campistron I., Laguerre A., Pilard J.-F., Bunel C., Jouenne T.: Use of telechelic cis-1,4-polyisoprene cationomers in the synthesis of antibacterial ionic polyurethanes and copolyurethanes bearing ammonium groups. *Biomaterials*, 28 (2007) 4200.
- [10] Hetric E.M., Shoensfish M.H.: Antibacterial nitric oxide-releasing xerogels: Cell viability and parallel plate flow cell adhesion studies. *Biomaterials*, 28 (2007) 1948.
- [11] Pupka A., Abrahamowicz A., Szyber P.: Biomateriały i materiał tkankowy w leczeniu zakażeń protez naczyniowych. *Polimery w Medycynie*, 2 (2005) 41.
- [12] Gray J.E., Norton P.R., Alnoun R., Marolda C.L., Valvano M.A., Griffiths K.: Biological efficacy of electroless-deposited silver on plasma activated polyurethane. *Biomaterials*, 24 (2003) 2759.
- [13] Nakaya T., Yujun L.: Recent progress of phospholipids polymers, Designed Monomers and Polymers, 4 (2003) 309.
- [14] Ligadas G., Ronda J.C., Galiá M., Cádiz V.: Poly(ether urethane) Networks from Renewable Resources as Candidate Biomaterials: Synthesis and Characterization. *Biomacromolecules*, 8 (2007) 686.
- [15] Pan J., Li G., Chen Z., Chen X., Zhu W., Xu K.: Alternative block polyurethanes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials*, 30 (2009) 2975.

## References

- [16] Zhao Q., Cheng G., Li H., Ma X., Zhang L.: Synthesis and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers. *Polymer*, 46 (2005) 10561.
- [17] Foster L.J.R., Tighe B.J., Centrifugally spun polyhydroxybutyrate fibres: accelerated hydrolytic degradation studies, *Polymer Degradation and Stability*, 87 (2005) 1.
- [18] Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P.: Short-chain fatty acids and poly-β-hydroxyalkanoates: (New) Bio-control agents for a sustainable animal production, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 680.
- [19] Piddubniak V., Kurcok P., Matuszowicz A., Głowała M., Fiszer-Kieszkowska A., Jedliński Z., Juzwa M., Krawczyk Z., Oligo-3-hydroxybutyrate as potential carriers for drug delivery, *Biomaterials*, 25 (2004) 5271.
- [20] Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 2 (2002) 167.
- [21] Bartoszewicz M., Rygiel A.: Biofilm jako podstawowy mechanizm zakażenia miejsca operowanego – metody prewencji w leczeniu miejscowym. *Chirurgia Polska*, 8, 3 (2006) 171.
- [22] Piozzi A., Francolini I., Occhiperti L., Venditti M., Marconi W.: Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: a new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization. *International Journal of Pharmaceutics*, 280 (2004) 173.
- [23] Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M.: *Mikrobiologia Lekarska*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2007.
- [24] Brzeska J., Rutkowska M., Janik H., Dacko P., Kowalczyk M.: Biodegradowalne poliuretany i sposób ich wytwarzania. *Patent Application*, No P385530 (2008).
- [25] Brzeska J., Dacko P., Janeczek H., Kowalczyk M., Janik H., Rutkowska M.: Wpływ syntetycznego poli(3-hydroksymaślanu) na wybrane właściwości nowych, otrzymanych z jego udziałem, poliuretanów do zastosowań medycznych. Cz.II. Poliuretany z cykloalifatycznym diizocyjanianem w segmencie sztywnym, *Polimery*, 1 (2011) 27.
- [26] Grapski J.A., Cooper S.L.: Synthesis and characterization of non-leaching biocidal polyurethanes. *Biomaterials*, 22 (2001) 2239.
- [27] Brzeska J., Janik H., Steinka I., Kukułowicz A., Rutkowska M.: Comparison of disk and tube method for estimation of biostatic properties of polyurethanes based on synthetic poly([R,S]-3-hydroxybutyrate). *Joint Proceedings 23* (2010) 55.
- [28] Brzeska J.: Wpływ syntetycznego poli(3-hydroksymaślanu) na właściwości nowych materiałów poliuretanowych dla celów medycznych. *Ph.D. Thesis* (2010) Gdynia Maritime University.

## BADANIA MECHANIZMU DEGRADACJI IN VIVO TERPOLIMERÓW Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU

ANNA JAROS<sup>1\*</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>, JERZY STOJKO<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, ANNA SMOLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ W SOSNOWCU, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup> CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH, POLSKA AKADEMIA NAUK, UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

\* E-MAIL: DYLANKA@WP.PL

### Streszczenie

*W pracy przedstawiono wyniki badań degradacji in vivo trzech różnych terpolimerów LL-laktydu, glikolidu i węglanu trimetyleny z pamięcią kształtu. Polimery charakteryzowano wykorzystując analizę DSC (właściwości termiczne), GPC (masy cząsteczkowe) i NMR (skład i mikrostruktura). Badano sterylne matryce polimerowe przed wszczepieniem oraz po określonym czasie inkubacji w organizmie królika. Oceniono przydatność badanych materiałów do zastosowania w produkcji biogodnych polimerowych resorbowlanych chirurgicznych systemów z pamięcią kształtu.*

**Słowa kluczowe:** terpolimery, degradacja, mikrostruktura, implant, pamięć kształtu

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 79-84]

### Wprowadzenie

Do celów medycznych wciąż poszukiwane są nowe materiały wielofunkcjonalne [1-4]. Niedawno opisane terpolimery laktydu, glikolidu i węglanu trimetyleny (TMC) otrzymywane przy użyciu acetyloacetonienu cyrkonu jako inicjatora [3-5], można z powodzeniem zaliczyć do tej grupy materiałów. Materiały te oprócz dobrych właściwości mechanicznych, biokompatybilności, zdolności do degradacji w organizmach żywych wykazują nowo odkrytą bardzo interesującą właściwość: efekt pamięci kształtu [1-3]. Podobnie jak w wielu innych materiałach polimerowych z pamięcią kształtu, bodźcem wyzwalającym zmianę kształtu tymczasowego do trwałego, w przypadku badanych terpolimerów, jest temperatura. Powrót do kształtu trwałego z tymczasowego następuje po podgrzaniu materiału powyżej temperatury zeszklenia zlokalizowanej w pobliżu temperatury ciała ludzkiego [5]. Taka właściwość omawianych terpolimerów umożliwia zaprojektowanie z nich urządzeń medycznych charakteryzujących się powrotem do kształtu trwałego po zaimplantowaniu do organizmu człowieka [1-6].

Synteza przy użyciu niskotoksycznego inicjatora skutkuje brakiem w otrzymanym materiale polimerowym wysokotoksycznych pozostałości, które mogłyby być uwalniane do organizmu z implantu i działać toksycznie oraz powodować stan zapalny w miejscu implantacji [3,5,7,8]. Kolejną cechą zapobiegającą długotrwałej odpowiedzi komórkowej i innym późniejszym niepożądanym interakcjom organizm-implant [9] opisywanych terpolimerów jest zdolność do resorpcji, która zachodzi po okresie potrzebnym do wyleczenia zmiany chorobowej (od 1 do kilku miesięcy).

## THE MECHANISM OF SHAPE MEMORY TERPOLYMERS' IN VIVO DEGRADATION

ANNA JAROS<sup>1\*</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>, JERZY STOJKO<sup>1</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, ANNA SMOLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE, THE SCHOOL OF PHARMACY AND DIVISION OF LABORATORY MEDICINE IN SOSNOWIEC, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLAND

\* E-MAIL: DYLANKA@WP.PL

### Abstract

*The hereby work presents the result of the in vivo studies on the mechanism of degradation of three different lactide-co-glicolide-co-TMC shape memory terpolymers. The polymers were characterized by using DSC (thermal properties), GPC (molecular weights) and NMR (composition and microstructure) method. Sterile polymeric matrices were analyzed before implantation and after a determined period of time, after incubation in vivo in a rabbit body. The suitability of the tested materials in the production of polymeric biocompatible resorbable surgical systems with shape memory effect was determined.*

**Keywords:** terpolymers, degradation, microstructure, implant, shape memory

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 79-84]

### Introduction

New multifunctional materials for medical applications have been researched [1-4]. Recently described terpolymers of lactide, glycolide, and trimethylene carbonate (TMC), synthesized with the use of zirconium acetylacetonate as initiator, can be successfully classified to that group of polymers [3-5]. In addition to good mechanical properties, biocompatibility and ability to degrade in living organisms, these materials exhibit novel interesting property: shape memory effect [1-3]. Similarly to many other polymeric materials with shape memory effect, designed for medical applications, the tested terpolymers are stimulated to recover their temporary shape from permanent shape with temperature. The permanent shape recovery from temporary shape occurs after heating the material above the temperature  $T_g$ , close to human body temperature [5]. This allows to design medical devices which recover their permanent shape after implantation into human body [1-6].

The terpolymer structure obtained in the process of synthesis initiated with low toxic  $Zr(Acac)_4$  lacks highly toxic residual reaction products which could be transferred from the polymer into the body and have a toxic impact to the organism of the patient or cause inflammation in the place of implantation [3,5,7,8].

Another feature of the described terpolymers which prevents the long-term cellular response and other subsequent undesirable interaction of organism-implant [9] is the resorption ability which occurs after the period of time needed to cure the disease (from 1 up to several months).

Znajomość kinetyki i mechanizmu degradacji umożliwia zachowanie ścisłej kontroli procesu degradacji projektowanego implantu medycznego [10].

Celem pracy była ocena mechanizmu i tempa degradacji implantów polimerowych posiadających własność pamięci kształtu wykonanych z terpolimerów laktidu, glikolidu i węglanu trimetylenu. Wiedza ta jest niezbędna do zaprojektowania nowych materiałów biomedycznych do celów krótkoterminowej małoinwazyjnej chirurgii, ponieważ ich zastosowanie pozwoli wyeliminować konieczność dodatkowego zabiegu chirurgicznego związanego z usunięciem implantu.

## Materiały i metody

Badania przeprowadzono na 3 różnych materiałach polimerowych z pamięcią kształtu otrzymanych w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze: MAT1 będący terpolimerem laktidu/glikolidu/TMC o udziale molowym odpowiednio 74/15/11, MAT2 - terpolimer laktid/glikolid/TMC o udziale molowym odpowiednio 73/14/13, MAT3 - (laktid/glikolid/TMC 63/10/27) zawierający w swej strukturze długie bloki węglanowe. Z materiałów tych formowano okrągłe matryce polimerowe. Następnie otrzymane materiały poddano sterylizacji wiązką elektronów. Szczegółowy opis formowania sterylnych matryc zamieszczono w publikacji [11].

Sterylnie matryce polimerowe zostały wszczepione królikom rasy New Zealand w Centralnej Zwierzętarni Doświadczalnej w Katowicach. Implantacji dokonano w głęboką warstwę podskórną. Matryce przszyto do mięśnia grzbietowego królików. Średnia masa zwierząt wynosiła ok. 3,2 kilograma. W czasie wykonywanego zabiegu króliki podane były znieczuleniu ogólnemu (podawano im atropinę, ketaminę i thiopental). Po 1, 2 i 4 tygodniach dla MAT1 i po 1, 2, 4, 11, 13, 15 i 17 tygodniach dla MAT2 i MAT3 zwierzęta wprowadzono ponownie w stan znieczulenia ogólnego i wycinano im wszczepione matryce wraz z otaczającymi je tkankami. Usunięte wszczepy oddzielano od przylegających do nich tkanek, płukano kolejno: w 0,9% roztworze NaCl i w wodzie do wstrzykiwań, a następnie przed przekazaniem do analiz suszono pod zmniejszonym ciśnieniem 80 mBa przez 48 godzin.

Skład i budowę łańcuchów badanych polimerów wyznaczano na podstawie widm NMR otrzymanych przy użyciu spektrometru magnetycznego rezonansu jądrowego o wysokiej rozdzielczości 600 MHz BRUKER Ultrashield Avance II w roztworze osuszonego DMSO-d<sub>6</sub> w temperaturze 80°C, stosując TMS jako standard wewnętrzny. Analizę otrzymanych widm NMR przeprowadzono dzięki procedurom zamieszczonym we wcześniejszej publikacji [12]. Średnią liczbową masę cząsteczkową ( $M_n$ ), wagowo średnią masę cząsteczkową ( $M_w$ ) oraz rozrzut mas cząsteczkowych ( $D$ ) próbek oznaczono przy pomocy wysokosprawnej chromatografii żelowej GPC Viscotek RImax (kolumny: Viscotek 3580, temp. 350°C, faza ruchoma: chloroform o przepływie równym 1 ml/min, detektor refrakcyjny) przed i po wszczepieniu w mięsień grzbietowy królika. Analizę termiczną materiałów przeprowadzono z użyciem kalorymetru różnicowego DSC 2010 (TA Instruments).

## Wyniki i dyskusja

We wstępnym badaniu degradacji analizowano MAT1 przez 4 tygodnie. Na skutek degradacji *in vivo* już po 2 tygodniach od implantacji liczbowa średnia masa cząsteczkowa spadła praktycznie o połowę, a po upływie 4 tygodni zaobserwowano jej aż 77% spadek (RYS. 1).

The knowledge of degradation kinetics and mechanism allows precise control of the process of designed medical implant degradation [10].

The aim of this study was to analyze the degradation mechanism and rate of shape memory terpolymer implants made of lactide, glycolide and trimethylene carbonate. This knowledge is essential to design new biomedical materials used for short-term minimally invasive surgery resulting in elimination of subsequent surgical treatment necessary to remove the implant.

## Materials and methods

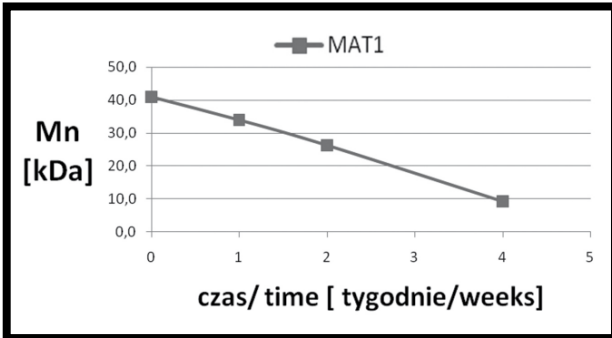
The testing was conducted on 3 different polymer materials with shape memory effect synthesized at the Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences in Zabrze. MAT1 was lactide/glycolide/tmc with molar ratio 74/15/09, MAT2 with the initial molar ratio of lactide to glycolide to TMC: 73:14:13, which was very similar to MAT1, and terpolymer MAT3 (lactide/glycolide/TMC 63/27/10) containing in its chains long carbonate blocks. Round polymeric matrices were obtained from these terpolymers. Then, the obtained materials were sterilized by highly accelerated electron beam radiation. The detailed description of the formation of sterile matrices is provided in the publication [11].

The sterile polymeric matrices were implanted in New Zealand rabbits in the Center for Experimental Medicine, Medical University of Silesia in Katowice. The implantation was performed into the deep subcutaneous layer. The matrices were sutured. The average mass of animals was 3.2 kilograms. At the time of the surgical treatment rabbits were placed under general anaesthesia (atropine, ketamine and thiopental). After 1, 2, 4 weeks for MAT1, and after 1, 2, 4, 11, 13, 15 and 17 weeks in the case of MAT2 and MAT3, the animals were generally anaesthetized again and implants with the surrounding tissues were excised. The removed implants were separated from the adherent tissues and rinsed successively in 0.9% NaCl solution and water for injections. Then, before the analysis, they were dried in vacuum under the pressure of 80 mBa for 48 hours.

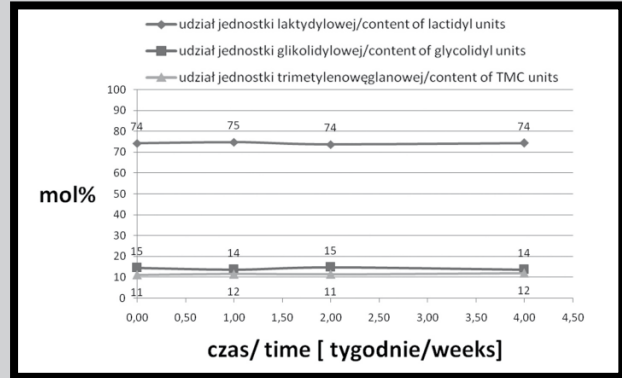
The composition and structure of polymer chains were investigated on the basis of NMR spectra recorded on high-resolution 600 MHz BRUKER Ultrashield Avance II nuclear magnetic resonance spectrometer at 80°C with the use of TMS as the internal standard and DMSO-d<sub>6</sub> as solvent. The analysis of the obtained NMR spectra was conducted according to the procedures described in the earlier publication [12]. The number average molecular weight ( $M_n$ ), the weight average molecular mass ( $M_w$ ) and molecular-mass dispersity ( $D$ ) of samples before and after implantation were determined by means of GPC chromatography (GPC Viscotek Rimax, column: Viscotek 3580, temp. 350°C, mobile phase: chloroform equal flow to 1 ml/min, refractive index detector). Thermal analysis was done using differential scanning calorimeter DSC 2010 (TA Instruments).

## Results and discussion

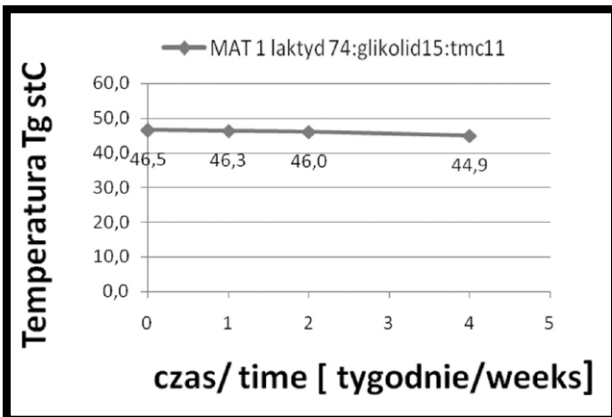
In a preliminary test, the degradation of the MAT1 was analyzed for 4 weeks. As a result of the *in vivo* degradation of implanted matrices, the number average molecular mass decreased by half after 2 weeks. Moreover, 4 weeks after the *in vivo* experiment over 77% drop was observed (FIG. 1).



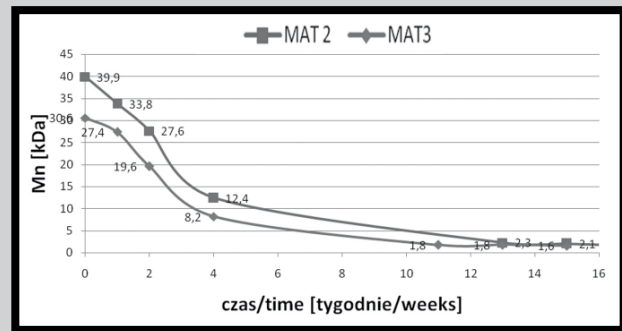
**RYS. 1.** Zmiany liczbowo średniej masy cząsteczkowej Mn dla MAT1 poli(laktyd-ko-glikolid-ko-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  74:15:11) w czasie degradacji in vivo. **FIG. 1.** Changes of Mn for MAT1 of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  74:15:11) during the in vivo degradation process.



**RYS. 2.** Zmiana udziału jednostek komonomerycznych w terpolimerze poli(laktyd-ko-glikolid-ko-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  74:15:11) w czasie degradacji in vivo. **FIG. 2.** The changes of the comonomeric units of terpolymer of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  74:15:11) during the in vivo degradation process.



**RYS. 3.** Zmiana Tg dla terpolimeru poli(laktyd-ko-glikolid-ko-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  74:15:11) w czasie degradacji in vivo. **FIG. 3.** The Tg values for terpolymer of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  74:15:11) during the in vivo degradation process.



**RYS. 4.** Spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej Mn dla terpolimeru poli(laktyd-ko-glikolid-ko-TMC) w czasie degradacji in vivo (MAT2  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  73:14:14) (MAT3  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  63:10:27). **FIG. 4.** The decrease of Mn of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) during the in vivo degradation process (MAT2  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  73:14:14) (MAT3  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  63:10:27).

W tym samym czasie procentowy udział jednostek komonomerycznych w polimerze ulegał tylko nieznacznym wahaniom, co świadczy o równomiernej degradacji sekwencji laktydylowych, glikolidylowych i węglanu trimetylen (RYS. 2). Temperatura zeszczenia MAT1 ulegała regularnemu, nieznacznemu zmniejszeniu (RYS. 3). Następnie poddano degradacji przez okres 17 tygodni materiał MAT2, o budowie zbliżonej do MAT1 oraz terpolimer MAT3. Badanie GPC wykazało, że obydwa te materiały w ciągu 4 miesięcy ulegają wyraźnie degradacji, co potwierdza 95% spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej. Mimo iż wszczepiane matryce polimerowe MAT2 i MAT3 różniły się początkową liczbą średnią masą cząsteczkową aż o 25%, dla obydwu implantów najbardziej gwałtowny spadek Mn (rzędu ok. 70%) zachodził (podobnie jak wcześniej dla MAT1) w pierwszym miesiącu degradacji in vivo (RYS. 4).

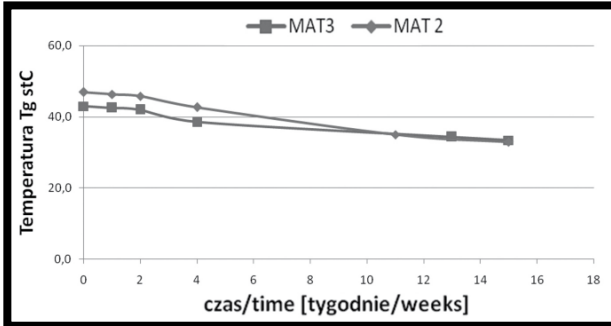
Badanie DSC matryc po określonym okresie inkubacji w organizmie królika z materiałów MAT2 i MAT3 wykazało nieznaczny spadek Tg w ciągu pierwszego miesiąca degradacji in vivo rzędu 5°C i dalej łagodny spadek, aż do końca badanego okresu degradacji o ok. 10-15°C (RYS. 5).

Analiza zmian udziału procentowego jednostek komonomerycznych w MAT2 (RYS. 6), który zawiera w swej strukturze bloki laktydylowe (RYS. 8, sygnały 7,8) pokazuje, że najszybciej degradują jednostki glikolidylowe i trimetylenwęglanowe. Bloki laktydylowe tego polimeru są najbardziej odporne na degradację.

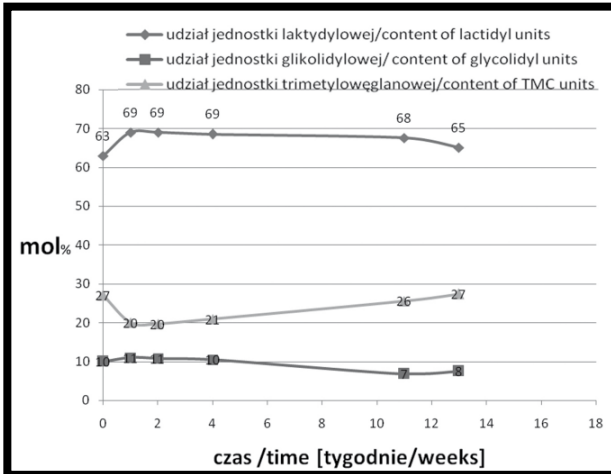
At the same time, the percentage of comonomeric units in a polymer characterized insignificant fluctuations. That shows that sequences of lactide, glycolide and trimethylene carbonate degraded evenly at the same rate (FIG. 2). The Tg of MAT1 reduced constantly and slightly (FIG. 3). In the subsequent degradation test conducted for 17 weeks, MAT2, which was very similar to MAT1, and terpolymer MAT3 containing in its chains long carbonate blocks, was analyzed. The GPC examination showed that both these materials underwent strong 95% reduction in the number average molecular mass within 4 months of degradation. Despite the differences in initial number average molecular mass between implanted MAT2 and MAT3 (as much as 25%), the most significant decrease of Mn in both of them (approx. 70%) was observed during the first month of in vivo degradation (FIG. 4). The same effect was observed for MAT1.

The DSC of the tested MAT2 and MAT3 matrices after in vivo degradation showed slight decrease of Tg (of 5°C) within the first month followed by constant decrease of 10-15°C, until the end of the degradation (FIG. 5).

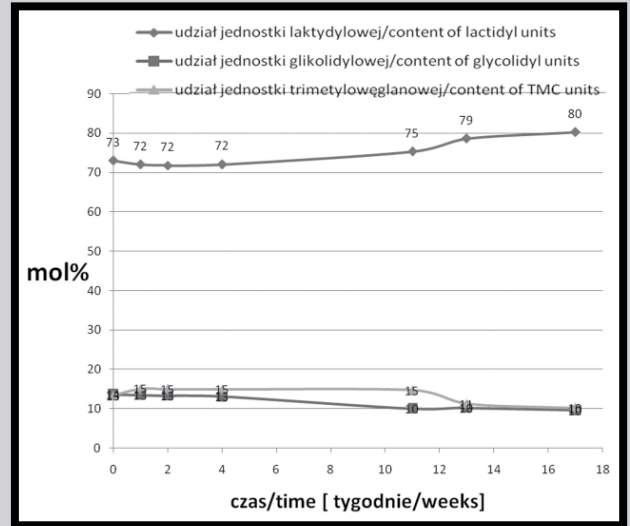
The analysis of the changes in comonomeric units of MAT2 (FIG. 6), which contained long lactidyl blocks in its chains (FIG. 8, signals 7,8), showed that glycolide and TMC subunits were removed from the polymer structure faster. The polymer lactidyl blocks were more resistant to degradation.



RYS. 5. Zmiana Tg dla terpolimeru poli(laktyd-ko-glikolid-ko-TMC) w czasie degradacji in vivo (MAT2  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  73:14:14) (MAT3  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  63:10:27).  
 FIG. 5. The Tg values for terpolymer of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) during the in vivo degradation process (MAT2  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  73:14:14) (MAT3  $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  63:10:27).



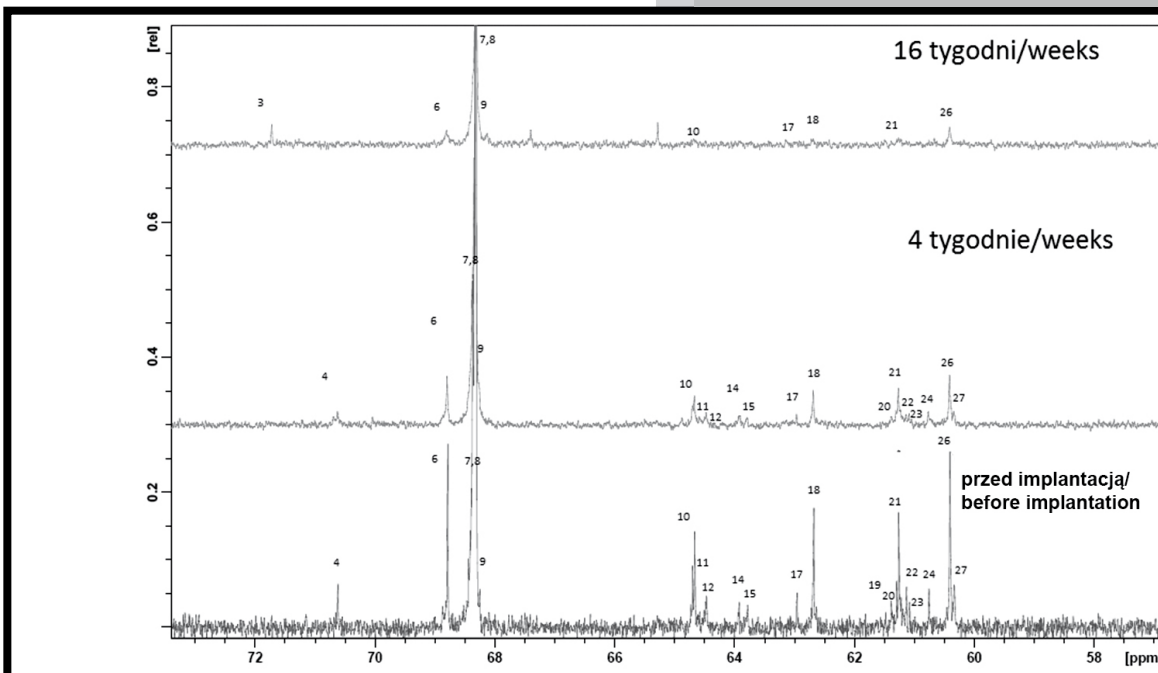
RYS. 7. Zmiana udziału jednostek komonomerycznych w terpolimerze poli(laktyd-ko-glikolid-ko-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  63:10:27) w czasie degradacji in vivo.  
 FIG. 7. The changes of the comonomeric units of terpolymer of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  63:10:27) during the in vivo degradation process.

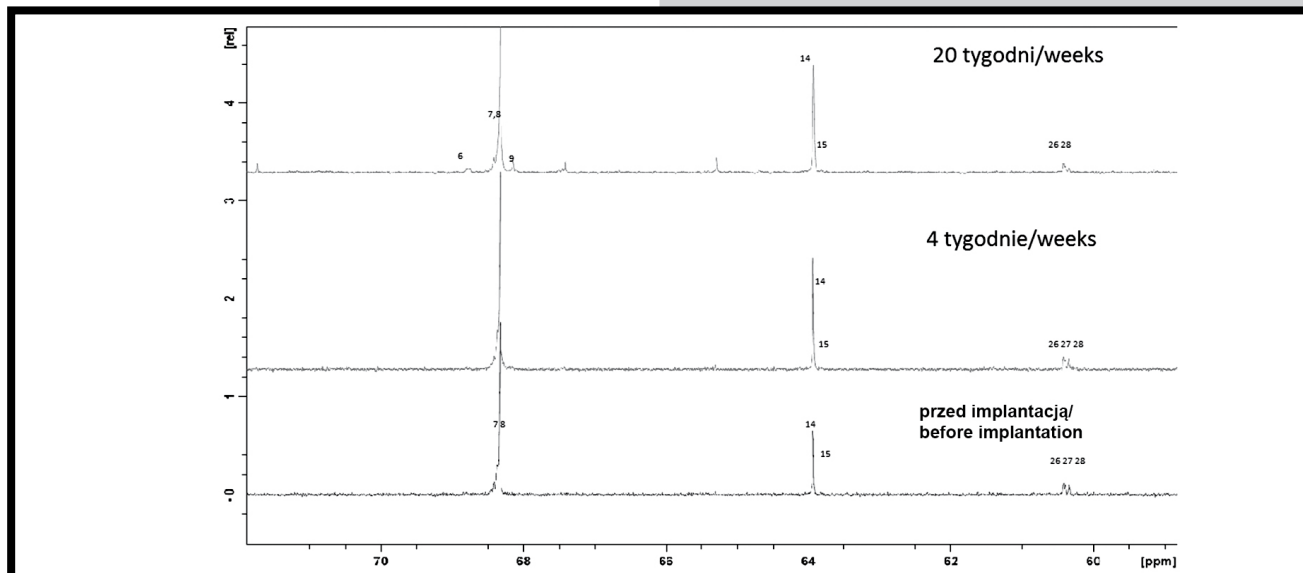


RYS. 6. Zmiana udziału jednostek komonomerycznych w terpolimerze poli(laktyd-ko-glikolid-ko-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  73:14:14) w czasie degradacji in vivo.

FIG. 6. The changes of the comonomeric units of terpolymer of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) ( $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  73:14:14) during the in vivo degradation process.

RYS. 8.  $^{13}\text{C}$  NMR widmo poli(laktydu-ko-glikolidu-co-TMC) zarejestrowane w DMSO w  $80^\circ\text{C}$ ; zakres przesunięcia chemicznego atomów węgla: metinowych laktydu i metylenowych glikolidu i TMC dla MAT2; [ $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  (przed implantacją) 73:14:15; (4 tydzień) 72:13:15; (16 tydzień) 80:10:10 (patrz TABELA 1)] podczas procesu degradacji.  
 FIG. 8.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of poly(lactide-co-glicolide-co-TMC) recorded in DMSO in  $80^\circ\text{C}$ ; range of methine carbons of lactide and methylene carbons of glycolide and TMC for MAT2; [ $n_{LL}:n_{GG}:n_T$  (before implantation) 73:14:15; (4 weeks) 72:13:15; (16 weeks) 80:10:10 (see TABLE 1)]; during the degradation process.





**RYS. 9.**  $^{13}\text{C}$  NMR widmo poli(laktydu-ko-glikolidu-co-TMC) zarejestrowane w DMSO w  $80^\circ\text{C}$ ; zakres przesunięcia chemicznego atomów węgla: metinowych laktydu i metylenowych glikolidu oraz TMC dla MAT3; [ $n_{\text{LL}}:n_{\text{GG}}:n_{\text{T}}$  (przed implantacją) 63:10:27; (4 tydzień) 69:10:21; (20 tydzień) 65:8:27 (patrz TABELA 1)]; podczas procesu degradacji. **FIG. 9.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of poly(lactide-co-glycolide-co-TMC) recorded in DMSO in  $80^\circ\text{C}$ ; range of methine carbons of lactide and methylene carbons of glycolide and TMC for MAT3; [ $n_{\text{LL}}:n_{\text{GG}}:n_{\text{T}}$  (before implantation) 63:10:27; (4 weeks) 69:10:21; (20 weeks) 65:8:27 (see TABLE 1)]; during the degradation process.

**TABELA 1.** Przypisanie sekwencji terpolimeru w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR dla poli(laktydu-ko-glikolidu-ko-TMC) zarejestrowanego w DMSO w  $80^\circ\text{C}$  [według 12].

**TABLE 1.** Determination of terpolymer sequences in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of poly(lactide-co-glycolide-co-TMC) recorded in DMSO in  $80^\circ\text{C}$  [after 12].

Linia rezonansowa / Resonance lines	Sekwencja / Sequences	Przesunięcie chemiczne / Chemical Shift (ppm)
Sekwencje laktydylowe (zakres przesunięcia chemicznego atomów węgla metinowego) Lactide sequences (methine carbon region)		
1	TLT	71.74
2	TLLT	71.07
3	TLLLL	70.73
4	TLLLL+TLLLT	70.70
5	GLLT+GLLLT	68.84
6	TLLLL+LLLLLLT	68.82
7	LLLL	68.48-68.32
8	LLGG	68.3
9	GLG	68.28
Sekwencje węglanowe (zakres przesunięcia chemicznego dla węgla okso-metylenowych węglanu) Carbonate sequences (methylene carbon O-CH <sub>2</sub> region)		
10	TTG+GGTGG+TGTGG	64.78-64.73
11	GGTT	64.72
12	GGTGT+GTGT	64.66
13	GGTGT+TTL+LTT	64.5
14	TTT+TTT+TTG	63.95
15	TTGG	63.82
19	TTL+LTT	61.4
20	LTL+LTL	61.37
21	GGTT	61.28
22	GGTGT+GGTGG	61.22
23	TGTGG+TGTGT	61.1
Sekwencje glikolidylowe (zakres przesunięcia chemicznego atomów węgla metylenowego) Glycolide sequences (methylene carbon region)		
16	TGGGT+TGGGL	63.15
17	TGT+TGGL+TGGT	62.97
18	LGGGT+TGGGT+GGGGT	62.72-62.65
24	TGGGG+TTGG	60.77
25	TGGT	60.72
26	GGLL	60.46-60.38
27	GGGG	60.35
28	LGL	60.3

Proces degradacji MAT3, który zawiera w swej strukturze długie bloki trimetylenowęglanowe zachodzi w nieco odmienny sposób (RYS. 7). Usunięcie w pierwszym tygodniu degradacji krótkich sekwencji węglanowych skutkowało spadkiem udziału jednostek TMC (RYS. 7). Następnie zachodziła degradacja z zachowaniem długich bloków laktydylowych LLLL (RYS. 9, sygnał 7) oraz długich bloków węglanowych TTT (RYS. 9, sygnał 14), przy równomiernej powolnej degradacji sekwencji zawierających jednostki glikolidylowe.

## Wnioski

Przeprowadzono analizę degradacji in vivo biodegradowalnych polimerowych materiałów zbudowanych z jednostek glikolidylowych, laktydylowych i węglanowych o odmiennej mikrostrukturze łańcuchów terpolimerowych. Różnice w mikrostrukturze polegały w pierwszym przypadku na bezładnym, statystycznym rozkładzie jednostek glikolidylowych, laktydylowych i węglanowych w łańcuchu terpolimeru, a w drugim na mikroblokowej strukturze terpolimeru, w którym występują długie bloki jednostek laktydylowych i węglanowych. Degradacja in vivo terpolimeru statystycznego przebiega równomiernie z powolnym ubytkiem jednostek glikolidylowych i węglanowych. Natomiast degradacja in vivo terpolimeru mikroblokowego po usunięciu z materiału polimerowego krótkich segmentów z jednostkami węglanowymi, przebiega również równomiernie z zachowaniem długich bloków laktydylowych i bloku węglanowego z równoczesnym powolnym usuwaniem z materiału jednostek glikolidylowych. Ponadto wraz z szybkim spadkiem ciężarów cząsteczkowych w wyniku postępującej degradacji wartości temperatur zeszklenia  $T_g$  ulegają powolnemu obniżeniu.

Obydwa badane materiały mogą być brane pod uwagę przy projektowaniu mikrouządzeń z pamięcią kształtu do zastosowań w chirurgii małoinwazyjnej, jednakże wydaje się, że materiał o strukturze mikroblokowej w wyniku zachowania długich bloków laktydylowych i węglanowych w dłuższym czasie przebywania w tkance będzie zachowywał efekt pamięci kształtu.

## Podziękowania

Pracę wykonano w ramach projektu rozwojowego „Polimerowe chirurgiczne systemy resorbowalne z pamięcią kształtu” POIG UDA 01-03-123/08-04 współfinansowanego przez Unię Europejską - Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego oraz badaną Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, umowa nr KNW-1-0-071/D/1/0.

The process of degradation of MAT3 (terpolymers with long TMC blocks) occurred in a slightly different way (FIG. 7). After removing short carbonate units in the first week of degradation, resulting in lowering carbonate units content (FIG. 7), degradation with preserving long lactidyl blocks LLLL (FIG. 9, signal 7) and long carbonate blocks TTT (FIG. 9, signal 14) with even and slow degradation of sequences containing glycolidyl units was observed.

## Conclusions

The analysis of in vivo degradation of polymeric materials was performed. The terpolymers of lactide, glycolide and trimethylene carbonate differed in microstructure of polymers chains. In the first case, the differences in microstructures consisted in the statistical distribution of glycolide, lactide and trimethylene carbonate units in the terpolymers chain. There was the difference in microblock structure of terpolymers comprising long blocks of lactidyl and trimethylene carbonate in the second case. The in vivo degradation of the statistical terpolymers runs evenly with the slow decrease of glycolide and trimethylene carbonate units. However, after the removal of short segments of TMC units from the polymer material, the in vivo degradation of the microblock terpolymers proceeded evenly with remaining of long lactidyl blocks and TMC block within the matrices and slow removal of glycolidyl units. Moreover, the values of glass transition temperature  $T_g$  decreased slowly with the rapid decline of the molecular masses as degradation progressed. Both tested materials may be taken into account when designing shape memory microdevices for minimal invasive surgery use. However, it appears that the material which possesses microblock structure maintains shape memory effect as a result of lactidyl and trimethylene carbonate long blocks in the long term tissue residual.

## Acknowledgements

This study has been financially supported by MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-04) co-financed by the European Union, and Medical University of Silesia in Katowice (Grant No KNW-1-0-071/D/1/0).

## Piśmiennictwo

- [1] Ratna D., Karger-Kocsis J.: Recent advances in shape memory polymers and composites: a review. *J. Mater. Sci.* 43 (2008), 254-269.
- [2] Lendlein A., Kelch S.: Shape memory polymers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 2034-2057.
- [3] Zini E., Scandola M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M.: Shape Memory Behavior of Novel (L-Lactide-Glycolide-Trimethylene Carbonate) Terpolymers, *Biomacromolecules*, 8 (2007), 3661-3667.
- [4] A. Smola, P. Dobrzyński, M. Pastusiak, M. Sobota, J. Kasperczyk: New semi-crystalline bioresorbable materials with shape-memory properties. *Engineering of Biomaterials*, 89-91, (2009), 82-87.
- [5] A. Smola, P. Dobrzyński, M. Sobota, M. Pastusiak, B. Kaczmarczyk, J. Kasperczyk: Preliminary tests of forming bioresorbable stent models with shape memory properties intended to use in lower respiratory tract treatment, *Engineering of Biomaterials*, 96-98, (2010), 93-98.
- [6] Behl M., Lendlein A.: Shape-memory polymers, *Mater. Today*, 10 (4) (2007) 20-28.
- [7] F. El Feninat, G. Laroche, M. Fiset, D. Mantovani: Shape Memory Materials for Biomedical Applications [Review], *Adv. Eng. Mater.* vol. 4, no. 3, (2002) 91-104.

## References

- [8] D. F. Williams: On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29 (2008) 2941-2953.
- [9] Vert M.: Polymeric biomaterials: strategies of the past vs. strategies of the future, *Polym. Sci.* 32 (2007) 755-761.
- [10] J. Chłopek, A. Morawska-Chochół, C. Paluszkiwicz, J. Jaworska, J. Kasperczyk, P. Dobrzyński: FTIR and NMR study of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite implant degradation under in vivo conditions. *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1479-1485.
- [11] A. Jaros, Z. Student, K. Jelonek, M. Sobota, K. Gębarowska, J. Kasperczyk, P. Dobrzyński, A. Smola: Changes of the structure and selected properties of shape memory terpolymers induced by injection moulding method manufacturing process and implants sterilization. *Engineering of Biomaterials*, 96-98, (2010), 34-39.
- [12] K. Gębarowska, J. Kasperczyk, P. Dobrzyński, M. Scandola, E. Zini, S. Li: NMR analysis of the chain microstructure of biodegradable terpolymers with shape memory properties. *European Polymer Journal* 47 (2011) 1315-1327.



# ZASTOSOWANIE METODY FT-IRM W BADANIACH ADSORPCJI MUCYNY NA POWIERZCHNI WYBRANYCH BIOMATERIAŁÓW

JOANNA MYSTKOWSKA<sup>1\*</sup>, JOANNA KOLMAS<sup>2</sup>, JAN R. DĄBROWSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA,  
ZAKŁAD INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I BIOMEDYCZNEJ,  
UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK

<sup>2</sup> WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,  
UL. BANACHA 1, 02-097 WARSZAWA

\* E-MAIL: J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

## Streszczenie

*W pracy przedstawiono wyniki badań adsorpcji mucyny zwierzęcej na powierzchni wybranych biomateriałów. Przebadano po dwie próbki każdego z materiałów, których powierzchnie różniły się chropowatością. Badania przeprowadzono za pomocą mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IRM). Wyniki badań wskazują na adsorpcję mucyny do wszystkich testowanych materiałów. Zaobserwowano wpływ rodzaju biomateriału na intensywność adsorpcji testowanej proteiny do jego powierzchni.*

**Słowa kluczowe:** mucyna, mikrospektroskopia w podczerwieni FT-IRM, adsorpcja, ślina, biomateriały

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 85-88]

## Wprowadzenie

Na powierzchni biomateriałów kontaktujących się ze środowiskiem płynów ustrojowych człowieka tworzy się cienka warstewka, zwana biofilmem [1]. Składa się ona ze związków organicznych, nieorganicznych i całego szeregu szczepów bakteryjnych zasiedlających warstewki proteinowe [2]. W zależności od typu płynu, mamy do czynienia z różnymi proteinami. W skład śliny ludzkiej wchodzi glikoproteiny (mucyny MG1 i MG2), odpowiedzialne głównie za jej właściwości lepkościowe [3].

Dostępne na rynku preparaty sztucznej śliny [4] również zawierają mucyny (roślinne i zwierzęce). Brakuje jednak doniesień literaturowych ma temat intensywności adsorpcji mucyn do powierzchni różnego rodzaju biomateriałów. Stąd w niniejszej pracy podjęto się tego zagadnienia. Do badań zastosowano metodę spektroskopii oscylacyjnej [5]. Mikrospektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IRM) pozwala na badanie bardzo małych, często niejednorodnych obiektów (tkanek biologicznych, komórek, a także chemicznych i mikrobiologicznych powłok biomateriałów) dostarczając informacji na temat ich składu chemicznego [6,7]. Technika FT-IRM może być użyta w trybie transmisyjnym lub odbiciowym (tryb odbiciowy to najczęściej odbicie zwierciadlane lub technika osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni ATR) [6]. Technika ATR okazała się bardzo skuteczna w analizie składu i struktury chemicznej różnego rodzaju cienkich warstw, w szczególności biofilmów. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć prace dotyczące wykorzystania ATR do monitorowania tworzenia się biofilmu oraz śledzenia chemicznych zmian w nim zachodzących [8]. Technika odbicia zwierciadlanego jest także odpowiednia do badania cienkich warstw i filmów, szczególnie tworzących się na powierzchniach nieprzezroczystych dla promieniowania podczerwonego.

# THE APPLICATION OF FT-IRM TECHNIQUE IN RESEARCH OF MUCIN ADSORPTION ON SELECTED BIOMATERIALS SURFACE

JOANNA MYSTKOWSKA<sup>1\*</sup>, JOANNA KOLMAS<sup>2</sup>, JAN R. DĄBROWSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY,  
DIVISION OF MATERIAL AND BIOMEDICAL ENGINEERING,  
WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,  
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,  
BANACHA 1, 02-097 WARSAW, POLAND

\* E-MAIL: J.MYSTKOWSKA@PB.EDU.PL

## Abstract

*This work presents results of research of animal mucin adsorption on the surface of selected biomaterials. Two samples of each material with different surface roughness were investigated. The tests were performed using Fourier-transform infrared microspectroscopy (FT-IRM). The results indicate that mucin adsorb to all tested materials surface. The influence of biomaterial type on protein adsorption intensity to material surface was observed.*

**Keywords:** mucin, infrared microspectroscopy FT-IRM, adsorption, saliva, biomaterials

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 85-88]

## Introduction

At biomaterial's surface that directly contact with human body fluid, the thin layer – called biofilm is formed [1]. This layer is composed of organic and inorganic compounds and bacterial strains, which incorporate in protein layers [2]. In relation to fluid type, there occur different proteins. In human saliva there are present glycoproteins (mucins: MG1 and MG2), which are responsible for its viscosity properties [3].

Commercial synthetic saliva substitutes [4] also contain mucins (plant and animal). There is a deficiency of literature data concerned with intensity of mucin adsorption to different biomaterials surfaces. Thus, in this work the problem is considered. The vibrational spectroscopy has been used [5]. Fourier-transform infrared microspectroscopy (FT-IRM) allows to examine very small compartments and provides information on the molecular components in discrete, heterogeneous regions of analysed materials (i.e. biological tissues, cells, chemical and microbiological coatings of biomaterials) [6,7]. The FT-IRM technique can be used in transmission and reflection mode (i.e. specular reflectance or attenuated total reflection ATR) [6]. ATR/FT-IR microspectroscopy has demonstrated efficacy in chemical structure and composition analysis of thin layers, especially of biofilms. This technique can be used to monitor biofilm formation and to evaluate changes during biofilm development [8]. FT-IRM technique in specular reflection mode is also suited to study thin layers and films on IR non-transparent surfaces.

Dzięki sprzężeniu mikroskopu IR z mikroskopem na światło widzialne jest możliwy wybór konkretnego miejsca, a także wielkości obszaru, z którego zbiera się widmo IR. Pomiar techniką zwierciadlanego odbicia są ograniczone tylko do mało chropowatych materiałów [7].

W pracy wykorzystano metodę zwierciadlanego odbicia promieniowania IR w badaniu adsorpcji mucyn i tworzenia cienkiego filmu na powierzchni różnego typu materiałów.

## Materiały i metody

Do badań wykorzystano handlową sproszkowaną mucynę, wyselekcjonowaną ze zwierzęcego żołądka (mucin, M1778, Sigma-Aldrich). Zastosowana mucyna wchodzi w skład kilku preparatów sztucznej śliny dostępnych na rynku. Przygotowano roztwór mucyny o stężeniu 0,5% wag. w redestylowanej wodzie. W roztworze zanurzone handlowe próbki materiałów o różnym: składzie chemicznym i chropowatości Ra. Do badań zastosowano: stal ferrytyczno - perlityczną 45 (stal I) - chropowatość: 4,2  $\mu\text{m}$  i 2  $\mu\text{m}$ , stal implantacyjną 316L (stal II) – 2  $\mu\text{m}$  i 1  $\mu\text{m}$ , komercyjny kompozyt stomatologiczny - 2  $\mu\text{m}$  i 1  $\mu\text{m}$  i fosforanowo-cynkowy cement kostny - 2  $\mu\text{m}$  i 1  $\mu\text{m}$ . Testowane powierzchnie zanurzone w roztworze mucyny na różne okresy czasu (5 min., 15 min., 30 min.; 1 h, 2 h, 4 h, 6 h; 1 dzień, 4 dni i 7 dni). Próbki przetrzymywano w temperaturze 37°C. Po upływie zadanego czasu kontaktu, próbki wyjęto z roztworu, oplukano wodą redestylowaną, osuszono suchym powietrzem i oceniano adsorpcję proteiny do materiału.

Intensywność adhezji mucyny do testowanych powierzchni badano przy zastosowaniu metody spektroskopii w średniej podczerwieni. W tym celu zastosowano mikroskop IR (Autolmage IR, Perkin Elmer) sprzężony ze spektrometrem IR (Spectrum 1000, Perkin Elmer). Mikroskop był wyposażony w konwencjonalny detektor MCT, chłodzony ciekłym azotem, pracujący w dolnym zakresie częstotliwości do 700  $\text{cm}^{-1}$ . Widma IR powierzchni zostały wykonane w trybie odbiciowym (technika odbicia zwierciadlanego) z kwadratowych pikseli 50 x 50  $\mu\text{m}^2$ . Rozdzielczość spektralna wynosiła 1  $\text{cm}^{-1}$ , liczba skanów: 500. Jako wzorca do zebrania widma tła wykorzystano czyste powierzchnie materiałów. Wykonano po 6 widm z różnych miejsc dla każdej próbki i następnie otrzymane wyniki poddano obróbce w programie GRAMS/AI 8.0 (Thermo Scientific).

## Wyniki i dyskusja

Jednym z założeń tej pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania mikrospektroskopii w średniej podczerwieni do detekcji mucyny w formie cienkiego filmu. W tym celu zebrano widma FTIR z powierzchni różnych materiałów zanurzanych w roztworze mucyny (o stężeniu 0,5% wag). Przykładowe widmo filmu wykonane techniką odbicia zwierciadlanego pokazuje RYS. 1. Szerokie pasmo 3700-2400  $\text{cm}^{-1}$  jest złożone. Pochodzi zarówno od grup N-H białek (amid A oraz amid B) jak i od drgań wody. Pasma przy ok. 2955  $\text{cm}^{-1}$  oraz 2917  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadają drganiom asymetrycznym i symetrycznym odpowiednio grup  $-\text{CH}_3$  oraz  $>\text{CH}_2$  (TABELA 1). W obszarze 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  dominują pasma amidowe I oraz II (1637  $\text{cm}^{-1}$  oraz 1547  $\text{cm}^{-1}$ ). W zakresie 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  obecne są pasma świadczące zarówno o obecności białka, jak i węglowodanów.

Wszystkie otrzymane widma dla testowanej mucyny odpowiadają danym literaturowym [9, 10] i zgodne są z widmem sproszkowanej mucyny wykonanym techniką transmisyjną (dane nie przedstawione w pracy). Dlatego też można stwierdzić, że na każdej badanej powierzchni obecna jest mucyna z roztworu w postaci cienkiego filmu wykrywalnego techniką mikrospektroskopii IR.

Thanks to an advantageous IR and light microscopy coupling, the selection of discrete area or larger fragment of studied surface is always possible. However, the measurements are limited by roughness of analysed surface [7].

In this work, we used infrared microspectroscopy in the specular reflection mode to analyse mucin adsorption and film's formation on different types of surface.

## Materials and Methods

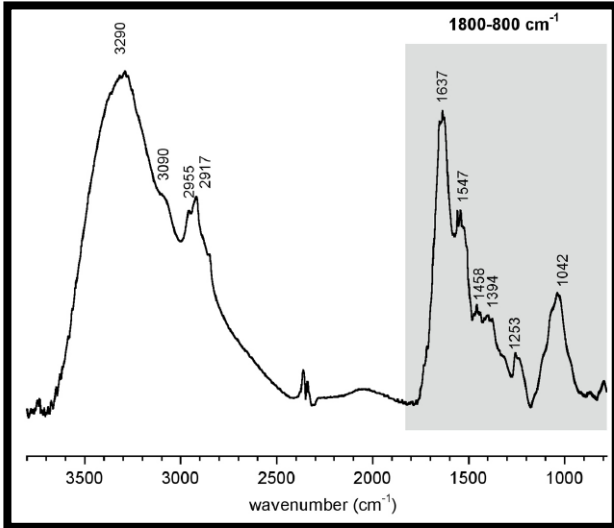
In this work, the commercial powder mucin from porcine stomach (M1778, Sigma-Aldrich) was used. This mucin is a component of some synthetic saliva preparations available on the market. Mucin's solution with concentration of 0.5 wt% in double distilled water was prepared. The samples of commercial materials with different chemical composition and surface roughness Ra were examined. Tested materials were: ferrite-pearlite steel 45 (steel I) - roughness: 4.2  $\mu\text{m}$  and 2  $\mu\text{m}$ , implantation steel 316L (steel II) – 2  $\mu\text{m}$  and 1  $\mu\text{m}$ , commercial dental composite - 2  $\mu\text{m}$  and 1  $\mu\text{m}$  and phosphate-zinc bone cement - 2  $\mu\text{m}$  and 1  $\mu\text{m}$ . All samples were placed into solution of mucin for different time periods (5 min., 15 min., 30 min.; 1 h, 2 h, 4 h, 6 h; 1 day, 4 days and 7 days) and stored at temperature 37°C. After the immersion time the samples were taken out from solution, then rinsed in double distilled water, dried in air and the mucin adsorption to material was tested.

The studied samples were examined by Fourier transform mid-infrared spectroscopy using a Autolmage IR microscope (Perkin Elmer) coupled to a Spectrum 1000 spectrometer (Perkin Elmer). The microscope was equipped with a conventional MCT detector with the low frequency cut-off at 700  $\text{cm}^{-1}$ . The mid-IR surface spectra were recorded in the reflection mode (specular reflectance) from square pixels 50 x 50  $\mu\text{m}^2$ , with 1  $\text{cm}^{-1}$  spectral resolution, using 500 scans. The untreated materials, before immersing in the mucin's solution, were used for recording background spectra. All spectra were collected from 6 different sites and then processed with the GRAMS/AI 8.0 software (Thermo Scientific).

## Results

The first aim of our work was to evaluate the potential using of the mid-infrared microspectroscopy in mucin film detection. In order to achieve that goal, the spectra were recorded from the different surfaces soaked in the mucin's solution. An average spectrum of the analyzed films, recorded in the specular reflection mode, is presented in FIG. 1. The broad 3700-2400  $\text{cm}^{-1}$  band is complex. It originates from proteins (amide A and B) and from water. The bands at ca. 2955  $\text{cm}^{-1}$  and 2917  $\text{cm}^{-1}$  are from  $-\text{CH}_3$  and  $>\text{CH}_2$  asymmetric stretch, respectively. In the 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  region, the amide I and amide II bands at ca. 1637 and 1547  $\text{cm}^{-1}$  are prominent. Spectral region 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  contains the bands originating both from proteins and carbohydrates (TABLE 1).

All collected spectra (from all the surfaces studied in this work) are in accordance with literature data [9, 10] as well as with the transmission spectrum obtained from powdered mucin (data not shown). Therefore, the conclusion could be made that the residues of mucin solution are present at all the surfaces and form thin films detectable by FTIR.

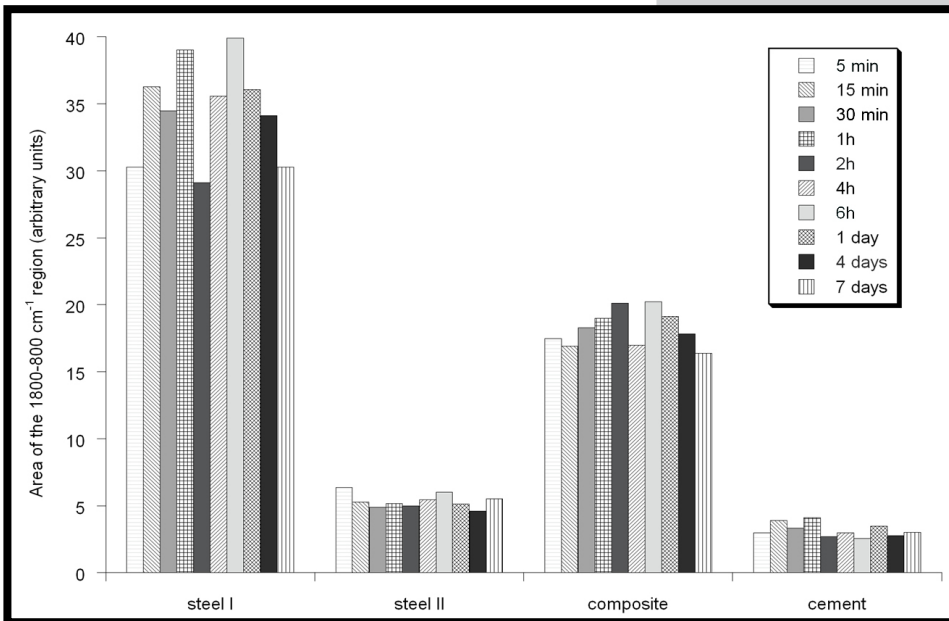


**RYS. 1. Widmo mucyny na przykładowej powierzchni biomateriału.**  
**FIG. 1. Spectra of mucin at example biomaterial's surface.**

**TABELA 1. Położenie i interpretacja pasm w widmie mucyny.**

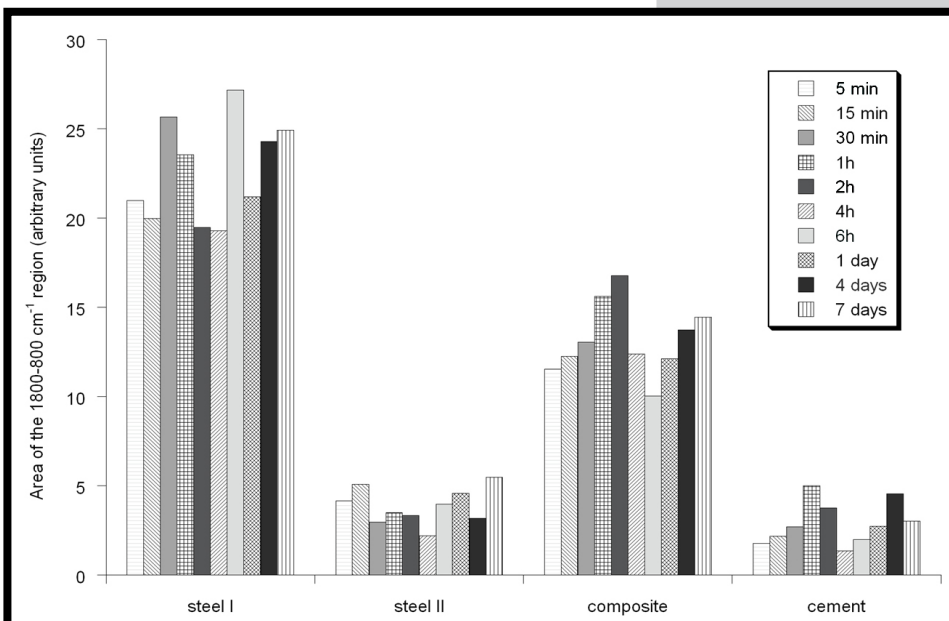
**TABLE 1. Band positions and assignments for mucin film.**

Pasmo / Band (cm <sup>-1</sup> )	Przypisanie / Assignment	Komentarz / Comments
3290	N-H	amid A, woda / amide A and water
3090	N-H	amid B / amide B
2955	C-H	-CH <sub>3</sub> , asymetryczne rozciągające / -CH <sub>3</sub> , asymmetric stretch
2917	C-H	>CH <sub>2</sub> , symetryczne rozciągające / >CH <sub>2</sub> , symmetric stretch
1637	C=O	amidowe I / carbonyl, stretch, amide I
1547	N-H	amidowe II / amide II, N-H deformation
1458	C-H	>CH <sub>2</sub> , deformacyjne / >CH <sub>2</sub> , deformation
1394	C-O	-COO- symetryczne rozciągające / -COO- symmetric stretch
1253	N-H	amidowe III / amide III
1042	C-C-O	pierścień piranozowy, węglowodany / pyranose ring, carbohydrate



**RYS. 2. Pola powierzchni - adsorpcja mucyny na powierzchni materiałów o chropowatościach: stal I – 2 μm, stal II – 1 μm, kompozyt – 1 μm, cement – 1 μm.**

**FIG. 2. Area regions – adsorption of the mucin at material's surface with roughness: steel I – 2 μm, steel II – 1 μm, composite – 1 μm, cement – 1 μm.**



**RYS. 3. Pola powierzchni - adsorpcja mucyny na powierzchni materiałów o chropowatościach: stal I – 4,2 μm, stal II – 2 μm, kompozyt – 2 μm, cement – 2 μm.**

**FIG. 3. Area regions – adsorption of the mucin at material's surface with roughness: steel I – 4.2 μm, steel II – 2 μm, composite – 2 μm, cement – 2 μm.**

Kolejnym etapem pracy było zbadanie intensywności adsorpcji mucyny w różnym czasie jej kontaktu z powierzchnią badanych materiałów, dodatkowo różniących się chropowatością. Wykonano widma FTIR, a następnie zmierzono pola powierzchni pasm w zakresie  $1800-800\text{ cm}^{-1}$ . Wyniki pola powierzchni dla materiałów mniej chropowatych przedstawiono na RYS. 2, a dla bardziej chropowatych na RYS. 3.

Z uzyskanych wyników badań widać, że czas kontaktu roztworu mucyny z biomateriałami nie miał większego wpływu na intensywność jej adsorpcji do ich powierzchni. Zaobserwowano jednakże, że intensywność adsorpcji mucyny zależała od rodzaju materiału. Najwyższą intensywność adsorpcji zanotowano w przypadku stali ferrytyczno-perlitycznej. Wartość analizowanego parametru malała w kolejności: stal ferrytyczno-perlityczna 45 (stal I) > kompozyt stomatologiczny > stal implantacyjna 316L (stal II) > fosforanowo-cynkowy cement kostny. Stąd wniosek, że w przypadku stali intensywność adsorpcji zależy od jej składu fazowego. Stwierdzono również pewne zróżnicowanie w adsorpcji mucyn na powierzchniach o różnych chropowatościach. Zaobserwowano większą intensywność adsorpcji na powierzchni mniej chropowatej w porównaniu do powierzchni bardziej chropowatej. Zjawiska te wydają się być interesujące, jednak ich analiza wykracza poza zakres tego artykułu. Temat będzie rozwijany w przyszłych badaniach naukowych.

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Badania przy wykorzystaniu metody mikrospektroskopii w średniej podczerwieni pozwoliły na zidentyfikowanie obecności warstewki mucyny na powierzchniach wszystkich testowanych biomateriałów.

2. Intensywność adsorpcji mucyny na powierzchni zależała od rodzaju biomateriału i była najwyższa dla stali ferrytyczno-perlitycznej.

3. Nie zaobserwowano wpływu czasu kontaktu biomateriałów z roztworem mucyny na intensywność adsorpcji mucyny do ich powierzchni.

## Podziękowania

Praca naukowa sfinansowana ze środków na naukę w latach 2010-2013 jako projekt badawczy numer N N507 592938.

## Piśmiennictwo

- [1] Bryers J.D.: Medical Biofilms, Biotechn and Bioeng, 2008, Vol. 100, No.1, May 1, 1-18.
- [2] Blankenship J.R., Mitchell A.P.: How to build a biofilm: a fungal perspective, Current Opinion in Microbiol, 2006, 9:588-594.
- [3] Pol J., Buczkowska-Radlińska J., Bończak-Kuleta A., Trusewicz M.: Mucyny śliny ludzkiej- ich rola i znaczenie, Annales Acad Med Stetinensis, Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, 2007, 53, 2, 87-91.
- [4] Park M.S., Chung J.W., Kim Y.K., Chung S.C., Kho H.S.: Viscosity and wettability of animal mucin solutions and human saliva, Oral Diseases, 2007, 13, 181-186.
- [5] Olsztyńska-Janus S., Szyborska K., Komorowska M., Lipiński J., Usefulness of spectroscopy for biomedical engineering, Acta Bioeng Biomech, 10, 2008, 45-49.
- [6] Humecki H.J.(ed.), Practical Guide to infrared microspectroscopy, Marcel Dekker, New York, 1995.

The next step of work was the analyzing of mucin adsorption intensity during various immersion times at tested biomaterials with different surface roughness. In this study we collected the FTIR spectra and then, the area of the  $1800-800\text{ cm}^{-1}$  region was measured. The results of area regions for lower surface roughness are presented in FIG. 2 and for more rough are presented in FIG. 3.

Obtained results show that there is no correlation between immersion time of biomaterials in mucin's solution and mucin adsorption intensity to the tested material's surface. Thus, the mucin adsorption intensity was depended of material's type. The highest adsorption was noticed in case of ferrite-pearlite steel 45. The value of analyzed parameter decreases in order: ferrite-pearlite steel 45 (steel I) > dental composite > implantation steel 316L (steel II) > phosphate-zinc bone cement. Thus, it could be concluded that the mucin adsorption intensity in case of steel depends of phase composition of steel. Also, some difference in adsorption was observed in case of materials with different surface roughness. The higher animal mucin adsorption was noticed in case of surface with lower roughness comparing to surface with higher roughness. These phenomena seem to be interesting, although their analysis goes beyond the scope of this article. Problem will be elaborated in future investigations.

## Summary

On the basis of the performed examinations, the following conclusions have been formed:

1. The Fourier-transform infrared microspectroscopy (FT-IRM) technique allows analysing mucin thin film at all tested biomaterials surfaces.

2. The intensity of mucin adsorption at surface depends of biomaterial's type and was the highest for ferrite-pearlite steel 45.

3. The correlation between biomaterial's immersion time in mucin's solution and mucin adsorption intensity to the material's surface was not observed.

## Acknowledgements

*This work was financed by Polish Ministry of Science and Higher Education as a research project in 2010-2013 years (Grant No N N507 592938).*

## References

- [7] Bhargava R., Levin J.W., Recent development in Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopic methods for biomedical analysis. In: Vo-Dinh T. (ed), Biomedical Photonics Handbook, CRC Press, Boca Raton, 2003.
- [8] Wolf G., Crespo J.G., Reis M.A.M., Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring, Rev Env Sci Biotech, 1, 2002, 227-251 and references therein.
- [9] Patel M.M., Smart J.D., Nevell T.G., Ewen R.J., Eaton P.J., Tsibouklis J., Mucin/Poly(acrylic acid) interactions: a spectroscopic investigation of mucoadhesion, Biomacromol, 4, 2003, 1184-1190.
- [10] Liu F., Wu J.-G., Soloway R.D., Guo H., Martini D.K., Xu N., Xu G.-X., Influence of water of the infrared spectra of mucin, Microchim Acta 1, 1988, 357-359.

# ZASTOSOWANIE TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ W OCENIE MORFOMETRYCZNEJ KRĘGOSŁUPA SZYJNEGO POD KĄTEM BIO-STABILIZACJI

LECHOSŁAW F. CIUPIK, AGNIESZKA KIERZKOWSKA,  
PRZEMYSŁAW JACEK

INSTYTUT BIOINŻYNIERII I MEDYCZNYCH TECHNOLOGII (IBEMT),  
LFC, ZIELONA GÓRA  
E-MAIL: IBEM@LFC.COM.PL

**Słowa kluczowe:** kręgosłup, bio-stabilizacja, masyw boczny, morfometria, tomografia komputerowa

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 89-94*]

## Wprowadzenie

Tkanka kostna jest materiałem kompozytowym ze zróżnicowanymi stałymi i ciekłymi fazami, składającego się z substancji nieorganicznych i składników organicznych. Makroskopowo tkanka kostna występuje w dwóch formach o odmiennych własnościach wytrzymałościowych: twardej i wytrzymałej istoty zbitiej o porowatości do 10% tworzącej zorientowane struktury oraz lekkiej i kruchej istoty gąbczastej o porowatości do 90% zbudowanej z luźno utkanych beleczek kostnych [1-3]. Stosunek obu form w poszczególnych elementach kostnych jest różny i zależy od stanu obciążeń oraz pełnionej funkcji.

W leczeniu dysfunkcji układu kostnego (urazy i schorzenia) stosowane są różnego typu wyroby medyczne/implanty o odmiennej budowie, funkcji, rodzaju oddziaływania na tkanki, które w warunkach biologicznych tworzą bio-stabilizację. W implantologii kręgosłupa wyróżnia się grupy stabilizatorów o odmiennej współpracy z tkanką kostną:

1) bio-stabilizacje mocowane „za kość” z elementami zaczepowymi w postaci haków, obejm, taśmy i drutu ortopedycznego;

2) bio-stabilizacje sytuowane pomiędzy elementami kostnymi, tzw. elementy dystansowe – „spacer”, np. protezy dysków i trzonów;

3) bio-stabilizacje mocowane „w kości” z elementami zaczepowymi w postaci np. śrub, kotwic.

O powodzeniu bio-stabilizacji w znaczącym stopniu decyduje „jakość” tkanki kostnej w obszarze współpracy z implantem powiązana z cechami konstrukcyjnymi implantu i techniką jego instalacji. Jest to czynnik szczególnie trudny do identyfikacji w przypadku kręgosłupa, stanowiącego zróżnicowany system pod względem cech anatomiczno-geometrycznych i właściwości wytrzymałościowych; TABELA 1 i 2 [4-6].

Pewność bio-stabilizacji to odpowiednie powiązanie typu implantu z własnościami kości pod względem mechanicznym i anatomiczno-geometrycznym.

Celem pracy jest ocena/identyfikacja morfometryczna masywów bocznych na preparatach kręgosłupa szyjnego, prowadzona w oparciu o analizy 3D z wykorzystaniem tomografii CT, pod kątem zastosowania implantu w postaci kotwicy w bio-stabilizacji kotwicznej typu „w kość” w metodzie O-C-A-M/DERO; RYS. 1 [7,8].

# APPLICATION OF COMPUTED TOMOGRAPHY IN MORPHOMETRIC EVALUATION OF CERVICAL SPINE IN TERMS OF BIO-STABILIZATION

LECHOSŁAW F. CIUPIK, AGNIESZKA KIERZKOWSKA,  
PRZEMYSŁAW JACEK

INSTITUTE OF BIOENGINEERING AND MEDICAL TECHNOLOGIES (IBEMT),  
LFC, ZIELONA GÓRA  
E-MAIL: IBEM@LFC.COM.PL

**Keywords:** spine, bio-stabilization, lateral mass, morphometry, computed tomography

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 89-94*]

## Introduction

Bone is a composite material with diverse solid and liquid phases, consisting of inorganic and organic substances. Macroscopically bone tissue occurs in two forms, with different strength properties: hard and resistant compact bone with porosity up to 10%, forming oriented structures and a light and fragile trabecular bone with porosity up to 90% built from loosely woven bone trabeculae [1-3]. The ratio of both forms in individual bony elements is different and depends on the state of loads and fulfilled function.

In a treatment of skeletal system (trauma and leisure), many types of medical devices/implants are used, with different constructions, functions, types of influence on tissues, which in biological conditions creates bio-stabilization. In spinal implantology, groups of stabilizers with different cooperation with bone tissue are distinguished:

1) bio-stabilizations fixed “beyond the bone” with anchoring elements in a form of hooks, clips, band and orthopedic rod;

2) bio-stabilizations situated between bony elements, so-called distant elements – “spacer”, e.g. disc and vertebral body prostheses;

3) bio-stabilizations fixed “into the bone” with anchoring elements in a form of screws, anchors.

The success of bio-stability in a large extent determines the “quality” of the bone tissue in the area of cooperation with the implant associated with the construction features of the implant and a technique of its installation. It is a factor particularly difficult to identify in the case of the spine, which is a differentiated system in terms of anatomical-geometrical features and strength properties; TABLE 1 and 2 [4-6].

The reliability of a bio-stabilization is the appropriate connection, in mechanical and anatomic-geometric terms, of the type of the implant with the bone's properties.

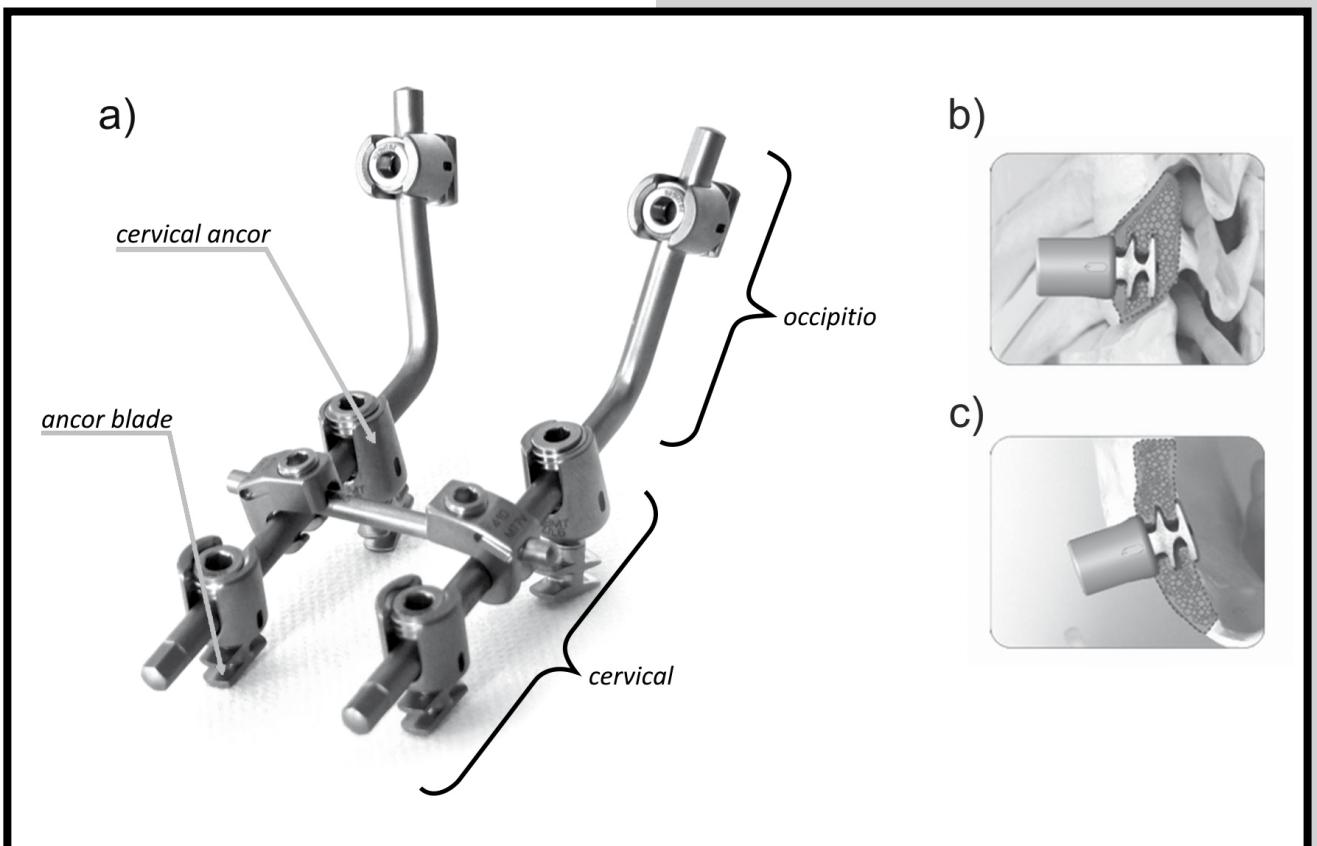
The aim of this paper is morphometric assessment/identification of lateral masses on cervical spine specimens, performed on a basis of 3D analyses using CT tomography, for the application of the implant in a form of an anchor in anchoring stabilization – type “into the bone” in a method O-C-A-M/DERO; FIG. 1 [7,8].

**TABELA 1. Moduł sprężystości struktur kręgosłupa [5].**  
**TABLE 1. Elastic modulus of spinal structures [5].**

	Łuk kręgu / Vertebral arc	Płytką graniczną / Endplate	Kość korowa kręgu (wyodrębniona) / Vertebral cortical bone (isolated)	Kość gąbczasta kręgu (wyodrębniona) / Vertebral cancellous bone (isolated)
Moduł sprężystości / Elastic modulus [GPa]	0.5-1.5	0.5-1	10-20	0.05-0.1

**TABELA 2. Średnie własności wytrzymałościowe kręgów kręgosłupa [5,6].**  
**TABLE 2. Mean strength properties of spinal vertebrae [5,6].**

	Odcinek szyjny / Cervical segment	Odcinek piersiowy / Thoracic segment	Odcinek lędźwiowy / Lumbar segment
Wytrzymałość na rozciągania / Tensile strength [MPa]	3.5	3.75	4.0
Wytrzymałość na ściskanie / Compressive strength [MPa]	12.7	7.55	6.4
Wytrzymałość na skręcanie / Torsional strength [MPa]	-	3.55	3.2



**RYS. 1. Stabilizacja potyliczno-szyjna O-C-A-M/DERO (a), sytuowaniem kotwicy w masywie bocznym kręgu szyjnego (b) oraz zakorówkowo w potylicy (c).**  
**FIG. 1. Occipito-cervical stabilization O-C-A-M/DERO (a), with situating of the anchor in lateral mass of the cervical vertebra (b) and extracortically in the occiput (c).**

## Materiały i metody

Przedmiotem badań były trzy ludzkie szyjne (C1-C7) preparaty kostne (P1, P2 i P3) w stanie „wysuszonym”, z których jeden (P3) z powodu wyraźnych zaburzeń mikroarchitektury kostnej w badaniach morfometrycznych został tylko częściowo wykorzystany. Celem zapobiegnięcia procesowi starzenia, próbki były woskowane; zabieg ten nie miał wpływu na prowadzoną ocenę. Do badań użyto najnowszej generacji tomograf komputerowy CT<sub>i</sub> – dwulampowy: 240 kV, 320 W; 180 kV, 15W, co daje pełny zakres detekcji w skali Hounsfielda oraz 16-bitowy detektor o rozdzielczości 1024x1024 (producent GE). Zastosowany tomograf badawczy (CT<sub>i</sub> 3D) jest narzędziem o znacznie większym niż w praktyce szpitalnej potencjale poznawczym, niemniej jego stosowanie musi się ograniczyć do badań *post mortem* [9].

Obrazy X-ray (rozmiar voxela: 130 i 15 μm) preparatów P1 i P2 analizowano z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania producenta CT<sub>i</sub> pod kątem:

1) oceny jakościowej rozkładu porów o objętości od 0 do 850 mm<sup>3</sup> na całym odcinku kręgosłupa C1-C7 z analizą ilościową porów w przedziałach: 500-850; 100-500; 10-100; 1-10; 0.5-1; 0,25-0,5; 0-0,25 mm<sup>3</sup>;

2) pomiaru rozmiarów nadającej się do bio-stabilizacji kościowej części masywu bocznego kręgu szyjnego (RYS. 2), według zasady pokazanej na RYS. 3;

3) pomiaru gęstości kości poprzez badanie udziału kości w wybranych przekrojach kręgowego masywu bocznego, gdzie At – pole powierzchni masywu bocznego, Ap – powierzchnia zajęta przez pory, Ab (At-Ap) – powierzchnia stanowiąca kość i B<sub>Ab</sub> [%] – udział procentowy tkanki kostnej na danym przekroju, obliczony jako: (At-Ap)/At x 100%.

Analizy 2) i 3) były prowadzone w trzech płaszczyznach przecięcia (strzałkowej – S, czołowej – AP i horyzontalnej – H; jak pokazano na RYS. 2) masywu bocznego na poziomach od C3 do C6 preparatów szyjnych P1 i P2.

## Materials and methods

Subject of the study were three human cervical (C1-C7) bone specimens (P1, P2 and P3) in “dried” state, one of which (P3) due to distinct abnormalities in bone microarchitecture in morphometric studies has been only partially exploited. In order to prevent aging processes, specimens were embedded in a paraffin wax; this procedure didn't affect the performed evaluation. For testing was used the newest generation of double-lamp CT scanner CT<sub>i</sub>: 240 kV, 320 W; 180 kV, 15 W, which gives the full range of detection in Hounsfield scale; 16-bit detector with resolution 1024x1024 (producer GE). Applied tomograph (CT<sub>i</sub>-3D) is a tool with a much greater than in the clinical practice cognitive potential, but its use must be limited to *post mortem* tests [9].

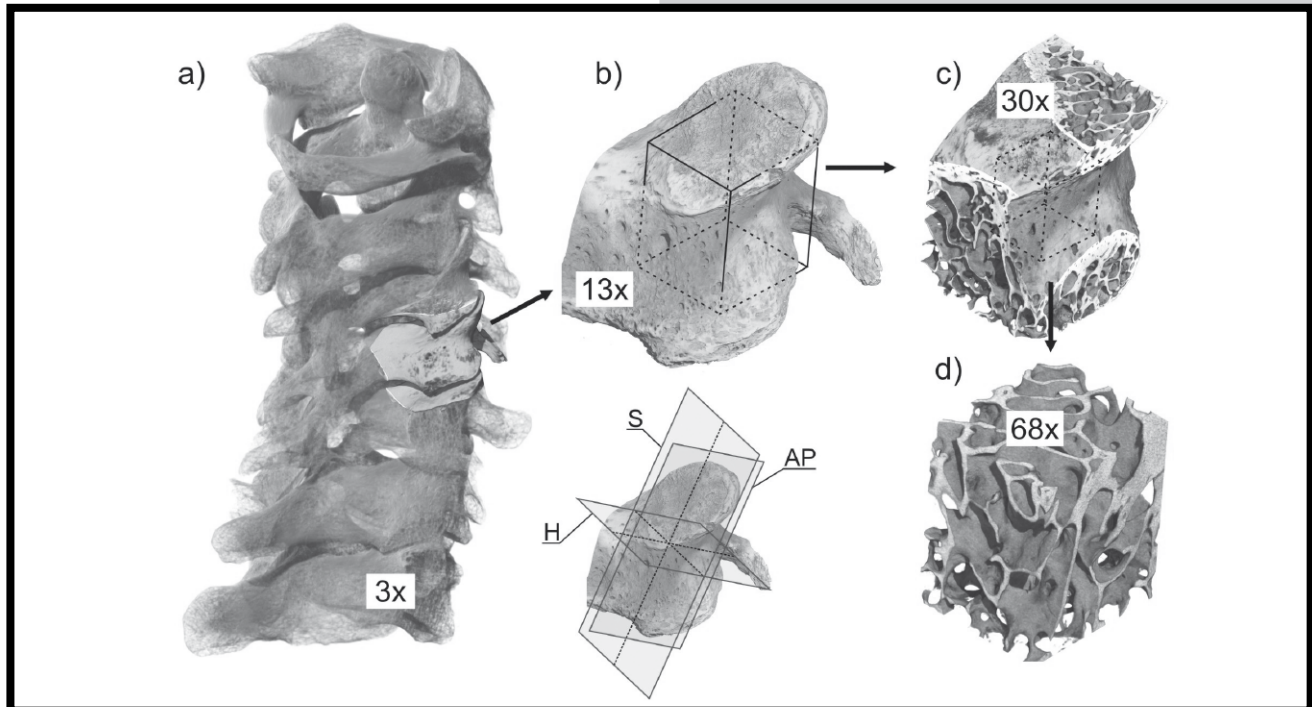
X-ray images (voxel size: 130 and 15 μm) of specimens P1 and P2 were analyzed using special software of the CT<sub>i</sub> producer to:

1) qualitatively assess the arrangement of pores of volume from 0 to 850 mm<sup>3</sup> on the whole C1-C7 spine segment, with quantitative analysis of pores in ranges: 500-850; 100-500; 10-100; 1-10; 0.5-1; 0.25-0.5; 0-0.25 mm<sup>3</sup>;

2) measure dimensions of eligible for the anchoring bio-stabilization part of lateral mass of the cervical vertebra (FIG. 2), according to the rule showed in FIG. 3;

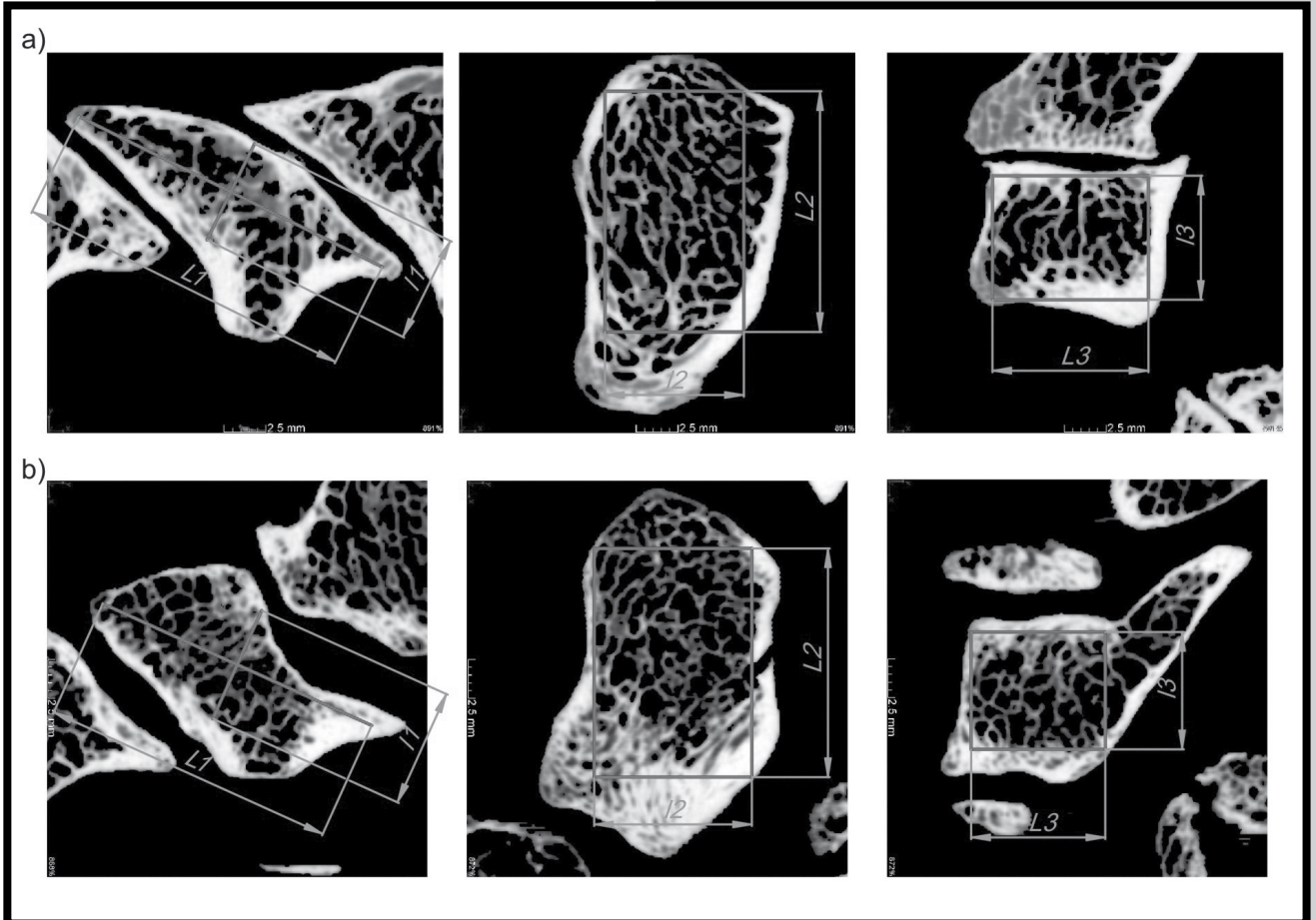
3) measure the bone density by investigating of the participation of the bone in selected cross-sections of the spinal lateral mass, where At – area of the lateral mass, Ap – area occupied by pores, Ab (At-Ap) – area representing a bone and B<sub>Ab</sub> [%] – percentage of the bony tissue in a given cross-section, calculated as: (At-Ap)/At x 100%.

Analyses 2) and 3) were performed in three cutting planes (sagittal – S, coronal – AP and horizontal – H; as shown in FIG. 2) of the lateral mass on levels from C3 to C6 of cervical specimens P1 and P2.



RYS. 2. Obrazy z tomografii komputerowej (CT<sub>i</sub>-3D, rozmiar voxela 15 μm) kręgosłupa szyjnego (a) z przykładami analizy morfometrycznej masywu bocznego, kręgu szyjnego w płaszczyznach S, AP, i H (b) oraz wybrane fragmenty obrazujące układ kostny stanowiący masyw boczny (c) i (d).

FIG. 2. Computed tomography images (CT<sub>i</sub>-3D, voxel size 15 μm) of the cervical spine (a) with examples of morphometric analysis of the lateral mass, cervical vertebra in planes S, AP and H (b), and selected fragments depicting the skeletal system constituting the lateral mass (c) and (d).



**RYS. 3. Metoda pomiaru masywów bocznych w przekrojach dla przykładowego skanu kręgu szyjnego C3 odpowiednio w płaszczyznach: S, AP i H (Rys. 2b) dla: a) preparatu (P1) i b) preparatu (P2).**

**FIG. 3. Method of measurement of lateral masses in cross-sections for exemplary scan of cervical vertebra C3 in planes, respectively: S, AP and H (FIG. 2b) for: a) specimen (P1) and b) specimen (P2).**

## Wyniki

Wyniki rozkładu porów o objętości od 0 do 850 mm<sup>3</sup>, dla preparatu P1 przedstawiono na RYS. 4. Por o największych rozmiarach (500-850 mm<sup>3</sup>) występuje w kręgu C7; kręgu cechuje się najmniejszą gęstością kości. Obniżoną gęstość wykazuje również kręgu C1, częściowo trzon kręgu C2 i wyrostek kolczysty C2, masyw boczny kręgu C2, a także częściowo trzony kręgow C3 oraz C6 i wyrostek kolczysty kręgu C7. Można wnioskować, że najkorzystniejsza stabilizacja może występować dla kręgow C4 i C5.

Z analizy dla preparatu P1 wynika, że największa liczba porów, bo 56 000 ma objętości w zakresie 0-0,25 mm<sup>3</sup>, następnie 186 - objętość 0,25-0,5 mm<sup>3</sup>, 91 - objętość 0,5-1 mm<sup>3</sup>, 80 - objętość 1-10 mm<sup>3</sup>, 30 - objętość 10-100 mm<sup>3</sup>, 8 - objętość 100-500 mm<sup>3</sup> i objętość powyżej 500 mm<sup>3</sup> stwierdzono dla 1 pora, stanowiącą sumę wyodrębniających się i połączonych „pustek”.

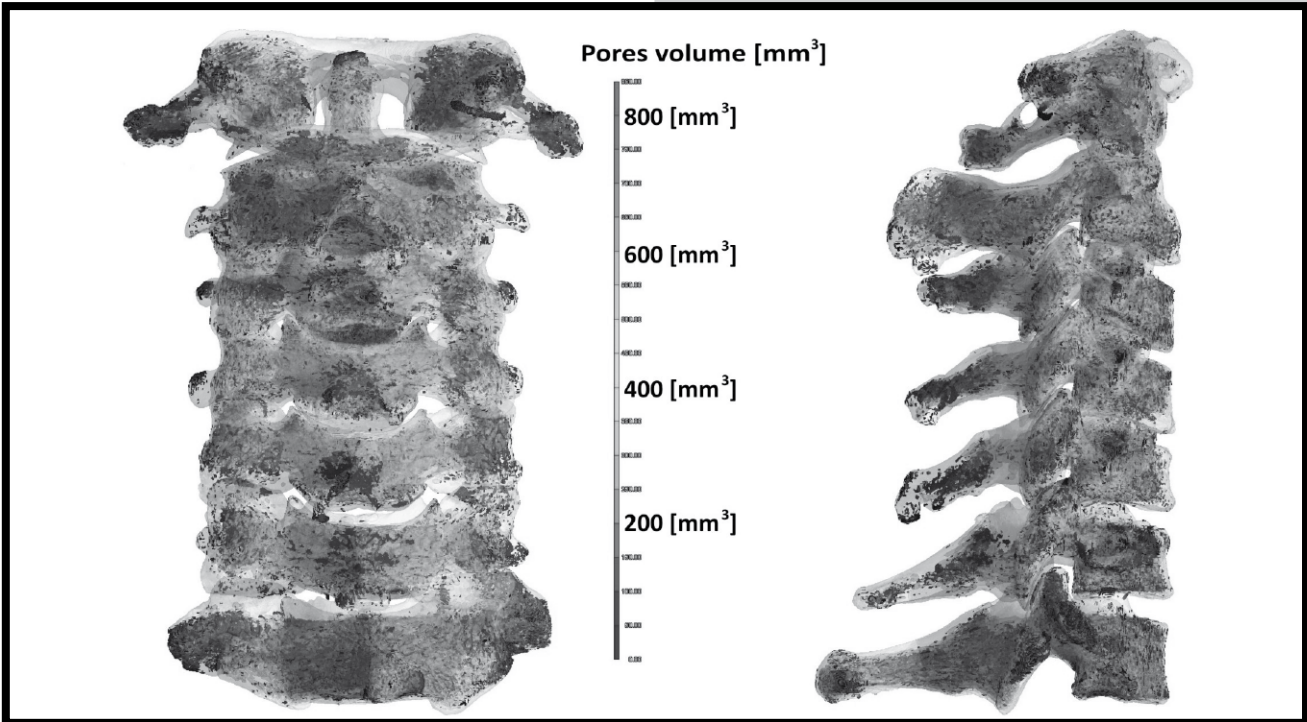
Wyznaczone pod kątem stabilizacji, największe prostopadłe wymiary (L i l) opisujące przekroje masywów bocznych kręgow od C3 do C6 dla preparatów P1 oraz P2 zestawiono w TABELI 3, natomiast wartości pól przekrojów: całkowitego masywów bocznych At, porów Ap oraz udział tkanki kostnej B<sub>Ab</sub> [%] w poszczególnych płaszczyznach cięcia (RYS. 2b) zestawiono w TABELI 4. Wyniki w nawiasach dla C6 preparatu 2 stanowią wartości przybliżone wynikające z ubytków kostnych związanych z jakością preparatu.

## Results

Results of distribution of pores with a volume from 0 to 850 mm<sup>3</sup>, for specimen P1 are presented in FIG. 4. Pore with the greatest dimensions (500-850 mm<sup>3</sup>) are present in C7. This vertebra is characterized with the smallest bone density. Lower density is present also in vertebral body C1, partially in vertebral body C2 and spinous process C2, lateral mass of C2, and partially vertebral bodies C3 and C6 and spinous process C7. It can be concluded, that the most effective stabilization can be observed for C4 and C5.

Analysis for specimen P1 shows, that the greatest amount of pores, because 56 000 has got volumes in a range of 0-0.25 mm<sup>3</sup>, next 186 - volume 0.25-0.5 mm<sup>3</sup>, 91 - volume 0.5-1 mm<sup>3</sup>, 80 - volume 1-10 mm<sup>3</sup>, 30 - volume 10-100 mm<sup>3</sup>, 8 - volume 100-500 mm<sup>3</sup>, and volume above 500 mm<sup>3</sup> was determined for 1 pore, and it constituted total amount of separated and connected “voids”. Designated in terms of stability, the greatest perpendicular dimensions (L and l) describing cross-sections of lateral masses of vertebrae from C3 to C6 for specimens P1 and P2 are summarized in TABLE 3, while the values of the cross-sections areas: total of lateral masses, pores Ap and participation of bone tissue B<sub>Ab</sub> [%] in different cutting planes (FIG. 2b) are summarized in TABLE 4. Results in parentheses for C6 specimen P2 are approximate values resulting from bone loss related to the quality of the specimen.





RYS. 4. Rozkład porów o objętości 0+850 mm<sup>3</sup> w kręgach kręgosłupa szyjnego, preparat P1.  
 FIG. 4. Distribution pores with volume 0+850 mm<sup>3</sup> in vertebrae of the cervical spine, specimen P1.

TABELA 3. Wymiary prostopadłe (L) i (l) masywów bocznych kręgów szyjnych wyznaczone dla potrzeb stabilizacji kotwicznej.  
 TABLE 3. Perpendicular dimensions (L) and (l) of lateral masses of cervical vertebrae determined for anchor stabilization.

TABELA 3. Wymiary prostopadłe (L) i (l) masywów bocznych kręgów szyjnych wyznaczone dla potrzeb stabilizacji kotwicznej.  
 TABLE 3. Perpendicular dimensions (L) and (l) of lateral masses of cervical vertebrae determined for anchor stabilization.

Longer (L) and shorter (l) dimension of the cross-section of the lateral mass [mm] / Dłuższy (L) i krótszy (l) wymiar przekroju masywu bocznego [mm]							
Kręg / Vertebra	Preparat / Specimen	płaszczyzna cięcia S / cutting plane S		płaszczyzna cięcia AP / cutting plane AP		płaszczyzna cięcia H / cutting plane H	
		L1	l1	L2	l2	L3	l3
C3	P1	21.35	6.75	8.77	15.18	9.84	7.82
	P2	18.62	7.49	9.95	14.42	8.45	7.39
C4	P1	22.33	7.31	8.50	17.09	9.54	7.62
	P2	20.49	7.28	7.97	15.55	4.93	4.58
C5	P1	21.70	8.12	11.54	15.95	10.03	7.83
	P2	21.46	7.66	11.29	15.37	9.48	5.85
C6	P1	20.12	6.56	8.19	14.52	9.68	6.24
	P2	19.17	5.13	10.80	13.98	(6.09)	(5.70)

TABELA 4. Zawartość procentowa zajęta przez tkankę kostną w trzech płaszczyznach przekroju masywu bocznego kręgów szyjnych C3-C6.  
 TABLE 4. Percentage occupied by bony tissue in three planes of the cross-section of the lateral mass of cervical vertebrae C3-C6.

TABELA 4. Zawartość procentowa zajęta przez tkankę kostną w trzech płaszczyznach przekroju masywu bocznego kręgów szyjnych C3-C6.  
 TABLE 4. Percentage occupied by bony tissue in three planes of the cross-section of the lateral mass of cervical vertebrae C3-C6.

Pola powierzchni przekrojów masywu bocznego (At) i porów (Ap) podane w [mm <sup>2</sup> ]; B <sub>Ab</sub> [%] – zawartość procentowa tkanki kostnej / Areas of cross-sections of the lateral mass (At) and pores (Ap) in [mm <sup>2</sup> ]; B <sub>Ab</sub> [%] – percentage of the bony tissue										
Kręg / Vertebra	Preparat / Specimen	płaszczyzna cięcia S / cutting plane S			płaszczyzna cięcia AP / cutting plane AP			płaszczyzna cięcia H / cutting plane H		
		At	Ap	B <sub>Ab</sub> [%]	At	Ap	B <sub>Ab</sub> [%]	At	Ap	B <sub>Ab</sub> [%]
C3	P1	144.05	36.41	74.72	241.42	98.90	59.03	111.13	31.41	71.74
	P2	135.09	40.44	70.06	249.57	70.09	71.92	109.28	14.62	86.62
C4	P1	167.56	40.88	75.60	251.51	78.42	68.82	115.18	26.02	77.41
	P2	146.44	47.75	67.39	244.49	75.11	69.28	42.41	1.52	96.42
C5	P1	160.10	51.45	67.86	268.40	72.03	73.16	137.98	28.30	79.49
	P2	131.18	38.81	70.41	310.91	99.76	67.91	128.38	21.41	83.32
C6	P1	135.33	25.04	81.50	285.39	54.94	80.75	107	11.65	89.11
	P2	111.34	47.83	57.04	293.12	100.07	65.86	(101.73)	46.91	(53.89)

Lepszą podatnością na stabilizację kotwiczną pod względem anatomicznym charakteryzuje się preparat P1 wykazujący się regularnymi masywami bocznymi oraz większymi wartościami L i I. Wyjątkiem jest kręgosłup C3 preparatu P1 o gorszych parametrach w odniesieniu do preparatu P2 analizowanego na tym samym poziomie, co potwierdzają skany. Wyniki nie wskazują, by istniał związek między rozmiarem masywu bocznego a poziomem kręgosłupa szyjnego w zakresie C3-C6.

Wyniki dla preparatu P1 wskazują tendencję wzrostu gęstości kości ( $B_{Ab}$  [%]) w masywach bocznych wraz z przechodzeniem na niższe poziomy kręgosłupa szyjnego. Największą gęstość kości obserwowano na przekrojach wzdłuż płaszczyzny horyzontalnej H, co może wskazywać, że uwzględniono w pomiarach również kość korową.

## Wnioski

1) stwierdzono morfometryczne zróżnicowanie masywów bocznych kręgów szyjnych, które mogą zależeć od cech osobniczych pacjenta oraz stopnia degeneracji kości (szczególnie zmian osteoporotycznych);

2) tomograficzna analiza morfometryczna ( $CT_t$ -3D) masywów bocznych wskazuje na możliwość stabilizacji kotwicznej O·C·A·M/DERO z kotwicą pozycjonowaną w kości; RYS. 1;

3) tomografia komputerowa  $CT_t$  umożliwia morfometrię kości pod kątem oceny podatności anatomiczno-geometrycznej oraz bio-mechanicznej na stabilizację implantami;

4) największe pod względem objętości pory zlokalizowane były w trzonach kręgów, a najmniejsze w masywach bocznych, co sugeruje ich dobrą podatność do stabilizacji „w kość”.

## Podziękowania

*W pracy wykorzystano wyniki badań współfinansowanych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach Przedsięwzięcia IniTech (projekt nr OSF 73708, w ramach umowy ZPB/23/73708/IT2/10).*

Better susceptibility on anchoring stabilization in anatomical terms, had the specimen P1, having regular lateral masses and greater values L and I. The exception is vertebra C3 of the specimen P1, having worse parameters in the relation with specimen P2 analyzed on the same level, which is confirmed on scans. Results in this study didn't indicate that there is a connection between the dimension of the lateral mass and the level of the cervical spine in a range of C3-C6.

Results for specimen P1, indicated a tendency of increase in bone density ( $B_{Ab}$  [%]) in lateral masses with passing to lower levels of the cervical spine. The greatest bone density was observed on cross-sections along the horizontal plane H, which can indicate, that in the measurements also cortical bone was taken into account.

## Conclusions

1) there has been stated the morphometric differentiation of lateral masses of cervical vertebrae, which can be dependent on the patient's personal features and the grade of bone degeneration (especially osteoporotic changes);

2) tomographical morphometric analysis ( $CT_t$ -3D) of lateral masses indicates the possibility of their use in anchoring stabilization O·C·A·M/DERO with an anchor positioned in a bone, FIG.1;

3) computed tomography  $CT_t$  enables the morphometry of the bone in terms of assessment of anatomically-geometrical and bio-mechanical susceptibility on stabilization using implants;

4) the greatest, in terms of volume, pores were localized in vertebral bodies, and the smallest in lateral masses, which suggests their good susceptibility on the stabilization “into the bone”.

## Acknowledgements

*In this paper were used the results of studies co-financed from means of The National Centre for Research and Development into the venture IniTech (project no OSF 73708, the agreement ZPB/23/73708/IT2/10).*

## Piśmiennictwo

- [1] Currey J.D., Foreman J., Laketic, I. et al., Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone, *J. Orthop. Res.*, 15, 111, 1997.
- [2] Kuhn J.L., Goldstein S.A., Ciarelli M.J. and Matthews L.S., The limitations of canine trabecular bone as a model for human: a biomechanical study. *J. Biomech.*, 22, 95, 1989.
- [3] Odgaard A., Hvid I. and Linde F., Compressive axial strain distributions in cancellous bone specimens, *J. Biomech.*, 22, 829, 1989.
- [4] Keller T.S., Mao Z. and Spengler D.M., Young's modulus, bending strength, and tissue physical properties of human compact bone. *J. Orthop. Res.*, 8, 592, 1990.
- [5] Będziński R., *Biomechanika Inżynierska*. Pol. Wrocławska, Wrocław 1997.

## References

- [6] Gzik M., *Biomechanika kręgosłupa człowieka*. Pol. Śląska, Gliwice 2007.
- [7] Tęsiński M., Zarzycki D., Lipik E., Ciupik L., Occipito-cervical fusion using some types of implants – anchor in cranio-cervical pathologies. *The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research* 4(20), 2010.
- [8] Ciupik L., Kierzkowska A., Occipito-cervical Anchorage method: some biomechanical aspects and clinical results; experience of last nine years. *The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research* 4(16), 2009.
- [9] Yoganandan N., Kumaresan S., Pintar F.A., Biomechanical of the cervical spine Part 2. Cervical spine soft tissue responses and biomechanical modeling. *Clinical Biomechanics* 16, 2001.

# OCENA TOMOGRAFICZNA KONTAKTU IMPLANTU TYTANOWEGO Z TKANKĄ KOSTNĄ ŚWIŃSKIEGO KRĘGOSŁUPA

LECHOSŁAW F. CIUPIK, EWELINA FLIS

INSTYTUT BIOINŻYNIERII I MEDYCZNYCH TECHNOLOGII (IBeMT),  
LFC, ZIELONA GÓRA  
E-MAIL IBEM@LFC.COM.PL

## Streszczenie

*Główną funkcją implantów jest dążność do odтворzenia i utrzymania proporcji między elementami struktury układu kostno-mięśniowego.*

*Błazka graniczna trzonu jest elementem przenoszącym obciążenia biomechaniczne. W badaniach na preparatach świńskich z użyciem tomografu komputerowego 3D zobrazowano geometrię kontaktu tytanowego implantu gwintowanego w przestrzeni międzykręgowej.*

**Słowa kluczowe:** *implant kręgosłupowy, tomografia komputerowa, preparat świński, kontakt implant-tkanka kostna*

*[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 95-98]*

## Wprowadzenie

Z analizy zapotrzebowania rynku spondyloimplantologicznego wynika, że kręgosłupowe implanty międzytrzonowe są jedną z najczęściej stosowanych stabilizacji układu kostno-neuro-mięśniowego kręgosłupa. Znajdują zastosowanie w leczeniu dysfunkcji zlokalizowanych w przestrzeni międzykręgowej. Popularność implantów międzytrzonowych w biostabilizacji związana jest z możliwościami instalacji chirurgicznej na każdym poziomie kręgosłupa, z różnych dostępów chirurgicznych, możliwością tworzenia samo-stabilizacji przez pojedynczy implant lub jako ważny element większej złożonej stabilizacji, np. w połączeniu ze śrubami transpedikularnymi, płytkami, etc.

Implant musi być dobrany do funkcji biomechaniczno-protekcijnej związanej ze schorzeniem oraz uwzględnić złożoność układu kostno-neuro-mięśniowego. Główną funkcją implantów międzytrzonowych jest odtworzenie/korekcja i utrzymanie utraconej w wyniku zmian chorobowych geometrii przestrzeni międzytrzonowej. Dają one w efekcie możliwość zbudowania stabilnego biomechanicznie układu, zwykle sprzyjającego powstawaniu zrostu kostnego. Chirurgia z implantem międzytrzonowym umożliwia również wykonanie odbarczenia elementów układu korzeniowego i rdzenia kręgowego, celem usunięcia deficytów neurologicznych.

Odtworzenie i przywrócenie utraconej wysokości przestrzeni międzytrzonowej jest związane z funkcją nośną układu implant-kość. Szczególną rolę spełnia tu zdolność do przeniesienia obciążeń przez blaszkę graniczną, naciskaną zwykle przez twardszy implantu. Własności blaszki granicznej oraz typowanie miejsc osadzenia implantu, tak aby pewność stabilizacji była jak najwyższa, były już tematem wielu publikacji, między innymi [1,2,5]. W projektowaniu nowego implantu międzytrzonowego ważne jest także pozyskanie wiedzy dotyczącej biomechaniki współpracy elementów przestrzeni międzytrzonowej, głównie blaszki granicznej z implantem, powiązanie z jakością biomechaniczną kości, geometrią kontaktu w miejscu osadzenia implantu [3] oraz procedurą implantowania.

# TOMOGRAPHICAL EVALUATION OF THE CONTACT OF TITANIUM IMPLANT WITH BONE TISSUE OF THE PORCINE SPINE

LECHOSŁAW F. CIUPIK, EWELINA FLIS

INSTITUTE OF BIOENGINEERING AND MEDICAL TECHNOLOGIES (IBeMT), LFC, ZIELONA GÓRA  
E-MAIL IBEM@LFC.COM.PL

## Abstract

*The main function of implants is their tendency to restoration and maintenance of proportions between elements of the skeleto-muscular system.*

*A vertebral endplate is the element, which transfers biomechanical loads. During studies on porcine specimens using computed tomograph 3D, geometry of a contact of titanium threaded implant in an intervertebral space has been visualized.*

**Keywords:** *spinal implant, computed tomography, porcine specimen, implant-bone tissue contact*

*[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 95-98]*

## Introduction

From the analyses of the spondyloimplantology market stems that interbody implants are one of the most common skeleto-neuro-muscular stabilizations. They are used in the treatment of dysfunctions localized within the intervertebral space. The popularity of interbody implants in biostabilization is associated with possibilities of surgical installation on each spinal level, from various surgical approaches, with ability to produce self-stabilization by a single implant or as an important element of a greater, complex stabilization, e.g. in a conjunction with transpedicular screws, plates, etc. Implant should be matched to the biomechanical and protective functions related to the dysfunction and should take into account the complexity of the skeleto-neuro-muscular system. The main function of interbody implants is the restoration/ correction and maintenance of geometry of the interbody space, which has been lost as a result of pathologic changes. They give, as a result, a possibility to build a biomechanically stable system, usually favoring a bone fusion. The surgery with the interbody implant allows also to perform decompression of neural elements and the spinal cord to remove neurological deficits.

Reconstruction and restoration of the lost height of the interbody space is associated with the carrying function of the implant-bone system. Ability to transfer loads by the endplate, which is usually pressed by a harder implant, meets a particular role. Properties of the endplate and indication of places to seat the implant, so as to ensure stability as high as possible, were the subject of many publications, including [1,2,5]. During the development of a new interbody implant is also important to gain knowledge according to biomechanics of cooperation of elements of interbody space, mainly the endplate, with the implant, conjunction with the biomechanical quality of the bone, geometry of the contact in the place of seating the implant [3] and implantation procedure.

Pozwala to na powiązanie konstrukcji implantu z procedurą chirurgiczną, które razem mają stanowić bezpieczną i efektywną technologię medyczną, cechującą się obniżonym ryzykiem akceptowalnym związanym z funkcjonowaniem implantu: osiadaniem, tj. procesem „zapadania się” implantu w kość na skutek przerwania blaszki granicznej lub niepożądanym przemieszczeniem z miejsca jego osadzenia, np. przy repozycji ześlizgu w spondylolistezie [4].

## Cel

Cel badań to ocena przedkliniczna geometrii kontaktu implant-tkanka kostna w przestrzeni międzytrzonowej kręgosłupa świńskiego dla próbki – implantu tytanowego, dwudzielnego z gwintem kostnym na wewnętrznej powierzchni walcowej, instalowanego według procedury chirurgicznej dotyczącej metody DrRB leczenia chirurgicznego ześlizgu. Ocenie podlegał fragment procedury metody DrRB parametryzującej wcinanie się gwintu wkręcane implantu w sąsiadujące blaszki graniczne trzonów (w przestrzeń międzytrzonową).

## Materiał i metodyka

Do badań użyto modelu implantu tytanowego, dwudzielnego z osiową płaszczyzną podziału, z walcową zewnętrzną gwintowaną powierzchnią oraz lędźwiowy segmenty ruchowy kręgosłupa świńskiego, w którego przestrzeń międzytrzonową instalowano - wkręcano implant. Instalacja implantu odbywała się zgodnie z procedurą przewidywaną dla polskiej, innowacyjnej metody DrRB (Distraction by rotation, Reposition and Blockage), specjalnie opracowanej dla leczenia dysfunkcji kręgosłupa objawiającej się ześlizgiem [3,4]. Model stabilizatora, jego proporcje wymiarowe oraz narzędzie wprowadzające zostały odpowiednio dostosowane rozmiarowo do wielkości przestrzeni międzytrzonowej kręgosłupa świńskiego w odcinku lędźwiowym. Do oceny efektów implantacji wykorzystano specjalnie dostosowany do potrzeb jednostki badającej tomograf komputerowy CT<sub>r</sub>-3D (prod. GE, UE/USA), o wysokich możliwościach jednoczesnej detekcji tkanek układu kostno-neuro-mięśniowego i biomateriału implantowego (voxel 67,173 μm), w tym przypadku stopu tytanu Ti6Al4V ELI.

Świeży kręgosłup świński został podzielony na segmenty. Gniazda pod próbkę/implant odpowiednio chirurgicznie przygotowane: otwór wejściowy w pierścieniu włóknistym z dostępu chirurgicznego tylnego, usunięto jądro miazdżyste dysku. Usunięto także mięśnie, zachowując krążki międzykręgowe i więzadła. Następnie segment kręgosłupa został zaopatrzony w tytanowe markery sytuujące i wykonano zdjęcie tomograficzne; RYS. 1.

Instalacja implantu polegała na stopniowym, „wahadłowym” wkręcaniu: 30 stopni w prawo i 15 stopni w lewo, aż do usytuowania implantu w środkowej części przestrzeni międzytrzonowej. Wahadłowe wkręcanie z ruchem powrotnym powodowało lepsze wcięcie gwintu jednocześnie w sąsiadujące blaszki graniczne [3]. Końcowy efekt współpracy implant-przestrzeń międzytrzonowa ponownie obrazowano z użyciem tomografu CT<sub>r</sub>-3D. Trudność obrazowania polegała na jednoczesnym ujawnieniu tytanowego implantu i współpracującej z nim tkanki kręgosłupa zwierzęcego; RYS. 2. Wykorzystując możliwości pomiarowe tomografu dokonano pomiarów blaszki granicznej oraz wypełnienie przestrzeni wrębów między zwojami gwintu kostnego (wysokość zwoju 2 mm) przez tkankę blaszki granicznej trzonów.

It allows to connect the implant's construction with a surgical method, which together can provide safe and effective medical technology, which is characterized by reduced acceptable risk related with implant's functioning: subsidence, i.e. the process of “collapsing” of the implant into the bone due to interruption of the endplate, or undesirable displacement from the seating place, e.g. at reposition of the slippage in spondylolisthesis [4].

## Objective

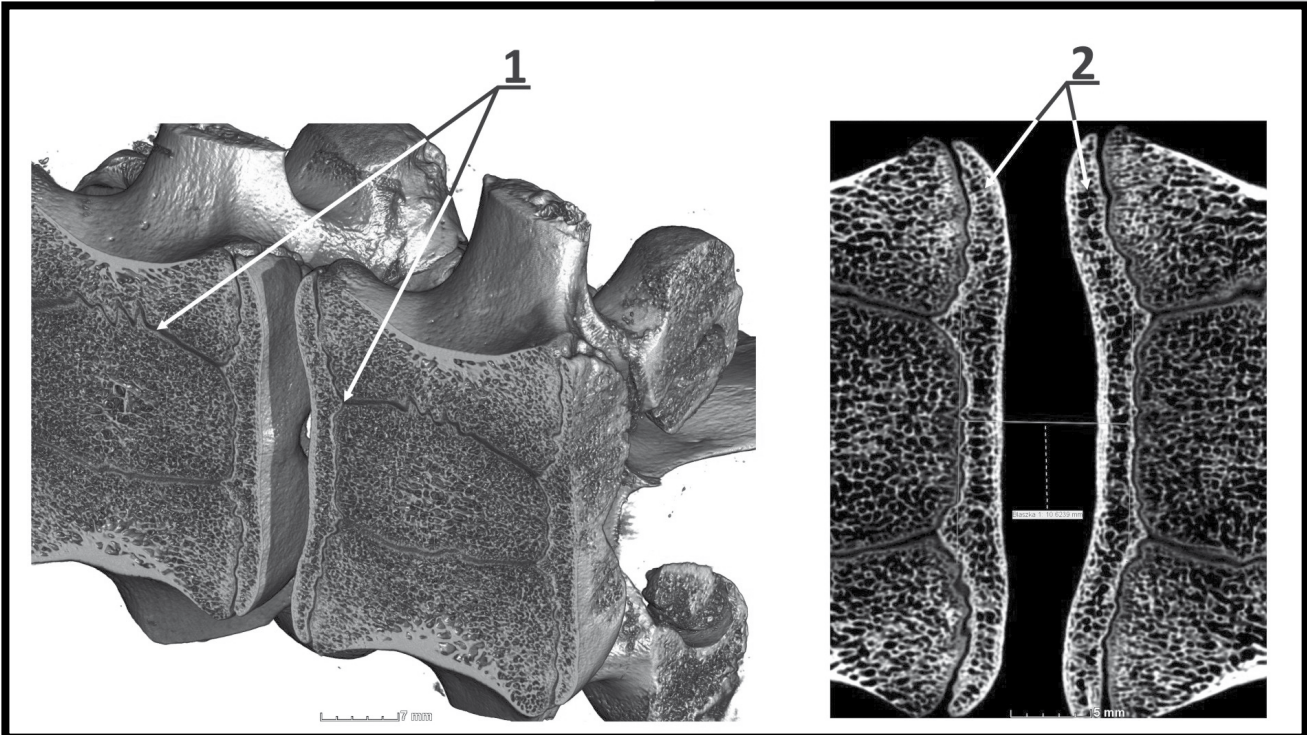
The aim of the experimental studies was a pre-clinical assessment of geometry of the contact implant-bone tissue in the interbody space of a porcine spine for a sample – dual titanium implant, with a bone thread on internal cylindrical surface, installed according to the surgical procedure concerning DrRB-method of surgical treatment of spondylolisthesis. To the assessment was subjected the fragment of the procedure of DrRB-method, which parameterized the cutting of the implant's thread in adjacent endplates of vertebral bodies (into the interbody space).

## Material and method

In the study a model of titanium implant, dual with an axial plane division, with cylindrical external threaded surface and porcine lumbar motion segments were used. Installation of the implant was performed according to the procedure for polish, innovative method DrRB (Distraction by rotation, Reposition and Blockage), specially developed for treatment of spinal dysfunction revealed by spondylolisthesis [3,4]. The model of the stabilizer, its dimensional proportions and the introducing instrument were appropriately dimensionally adjusted to the size of the interbody space of the porcine spine in the lumbar segment. For the assessment of effects of the implantation, specially adapted computed tomograph CT<sub>r</sub>-3D (GE, UE/USA) was used, which has great capabilities of simultaneous detection of skeleto-neuro-muscular tissues and biomaterial of the implant (voxel 67,173 μm), titanium Ti6Al4V ELI in this case.

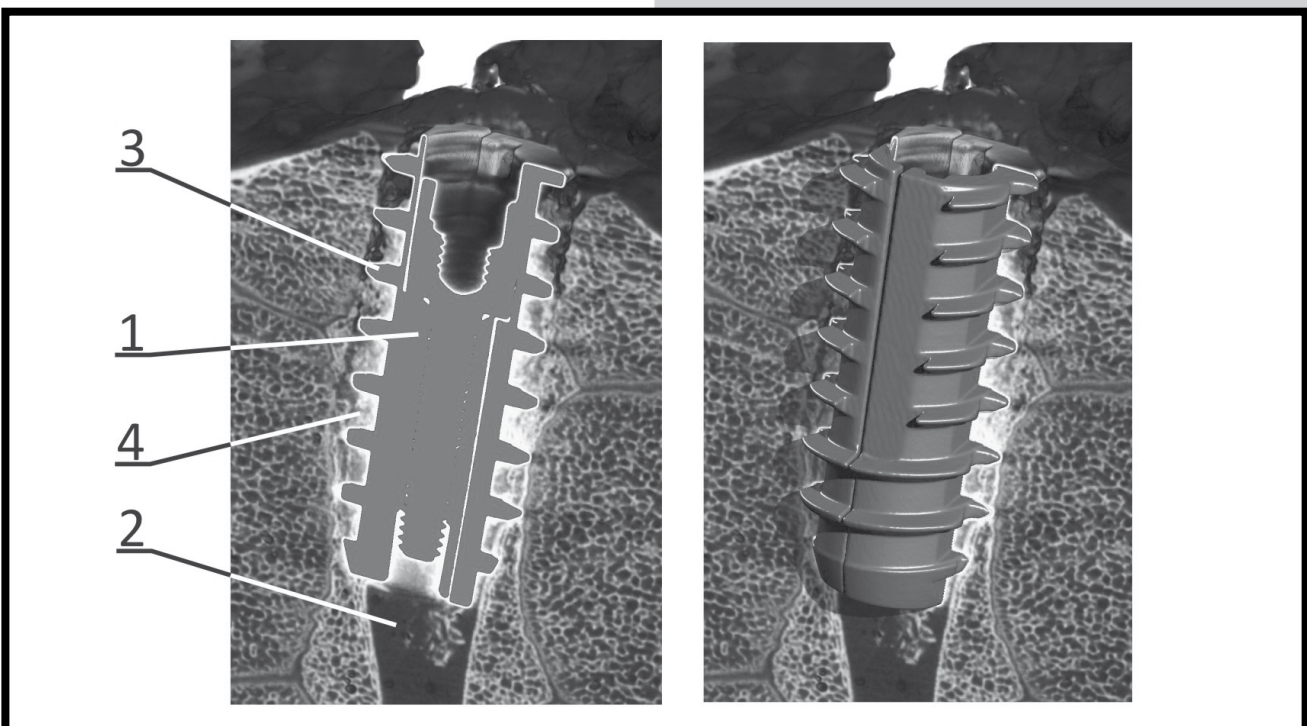
The fresh porcine spine was divided into segments. Seats for the sample/implant have been properly surgically prepared: the input hole in the annulus fibrosus from the posterior surgical approach, nucleus pulposus has been removed. Muscles have been also removed, while retaining intervertebral discs and ligaments. Next, the spinal segment has been equipped in titanium situating markers, and the tomographical image has been made; FIG. 1.

Installation of the implant consisted in a gradual, “swinging” screwing: 30 degrees right and 15 degrees left, until positioning of the implant in the middle part of interbody space. Swinging screwing with the reverse motion caused better cutting of the thread in adjacent endplates simultaneously [3]. The final effect of implant-interbody space cooperation has been again visualized using CT<sub>r</sub>-3D tomograph. Difficulty of the visualization lied in simultaneous exposing of the titanium implant and cooperating with it tissue of the animal spine; FIG. 2. Using measuring abilities of the tomograph, has been performed measurements of the endplate and filling of hollows between thread's coils (height of the coil 2 mm) by the tissue of the endplate.



RYS. 1. Segment kręgosłupa świńskiego w obrazie z tomografii CT<sub>i</sub>-3D; uwidocznione struktury rozwojowe (wzrostowe) trzonów (1) oraz wyraźnie zarysowane blaszki graniczne (2) sąsiadujące ze sobą o grubości od 1 do 3 mm w wierzchołkach.

FIG. 1. Porcine spinal segment on an image from computed tomography CT<sub>i</sub>-3D; visible developing (growing) structures of vertebral bodies (1) and clearly outlined adjacent endplates (2) with a thickness from 1 to 3 mm in peaks.



RYS. 2. Implant tytanowy o powierzchni gwintowanej (1), stosowany w korekcji ześlizgu, osadzony przez wkręcenie w przestrzeń dyskową (2) preparatu kręgosłupa świńskiego, w obrazie z tomografii komputerowej. Uwidoczniono ważne dla funkcji leczenia wcięcie gwintu (3) w blaszki graniczne (4) sąsiadujących trzonów kręgowych z wypełnieniem przestrzeni między wierzchołkami gwintu.

FIG. 2. Titanium implant with threaded surface (1), used in the correction of spondylolisthesis, seated by screwing into discal space (2) of the porcine spine's specimen on the image of computed tomography. The cut of the thread (3) into the endplates (4) of adjacent vertebral bodies, with filling of the spaces between thread tips, important for the healing function, is illustrated.

W badaniach zastosowano segmenty kręgosłupa świńskiego uzyskane od młodych, nie w pełni rozwiniętych osobników hodowlanych, z prawidłową wysokością przestrzeni międzytrzonowej. Nie oceniano możliwości odtworzenia wysokości przestrzeni międzykręgowej przez mechaniczne oddziaływanie implantu, ale jakość współpracy kręgi-implant-kręgi, warunkującą możliwość dokonywania mechanicznie korekcji wzajemnego ułożenia kręgów i pełnienia funkcji nośnych układu implant-tkanka kostna.

Warunkiem prawidłowego pełnienia zadanej funkcji było chirurgiczne, prawidłowe osadzenie implantu w przestrzeni międzytrzonowej. Na zdjęciach CT<sub>i</sub>, dobierając odpowiednio średnicę implantu do wysokości przestrzeni międzytrzonowej przy zastosowaniu wkręcania postępowego z częściowym powrotem, uzyskano całkowite wcięcie gwintu w powierzchnię blaszek granicznych trzonów kręgów świńskich. Założono, że funkcja nośna implantu wynika z jego dopasowania do powierzchni blaszki granicznej, a także może być polepszona przez element konstrukcyjny w postaci półki, z którą bezpośrednio kontaktowały się oba trzony kręgowe. Może to stanowić przyczynę do stwierdzenia, że zaproponowany model implantu może stanowić bio-stabilizację o obniżonym ryzyku osiadania przestrzeni sąsiadujących trzonów, przy jednoczesnym zachowaniu wszystkich zasad chirurgicznych przygotowania łoża pod implant.

Niemniej jednak wymagana jest dalsza ocena jakościowo-ilościowa układu kręgi-implant-kręgi, między innymi w badaniach bio-mechanicznych i późniejsza na organizmach żywych – zwierzęcych z obserwacją o odpowiednim follow-up.

## Wnioski

1. Preparatem świńskim można modelować instalowanie implantu w przestrzeni dyskowej (międzytrzonowej) i dokładnie obserwować skutki czynności instalacyjnych; wcinanie gwintu w blaszkę graniczną.

2. Nowoczesna tomografia komputerowa CT<sub>i</sub>-3D zastosowana w badaniach pozwala identyfikować strefę rozdziału implant (tytanowy)-tkanki okołointplantowe i oceniać z dokładnością do kilkudziesięciu mikrometrów geometrię kontaktu.

3. Uzyskana poprawność geometryczna osadzenia implantu, przed zastosowaniem technologii medycznej, winna być potwierdzona szczególnie badaniami biomechanicznymi i przedklinicznymi.

## Podziękowania

*W pracy wykorzystano wyniki badań współfinansowanych częściowo ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, lata 2007-2013 (nr POIG.01.04.00-08-001/...).*

## Piśmiennictwo

- [1] Pamela Grant J., Sc Ma, Oxland R. Thomas i in.: Mapping the Structural Properties of the Lumbosacral Vertebral Endplates, *Spine*, Vol. 26, 8/2001, ss 889-896.
- [2] Ciupik L. F., Kierzkowska A., Baran B., Pieniążek J., Zarzycki Z.: Intervertebral body stabilization – the biomechanical significance of endplate. *The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research*, 4(16), 2009, 132-141.
- [3] Ciupik L. F., Baran B., Dobkiewicz A., Zarzycki D.: Validation of development in surgical treatment of spondylolisthesis. *The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research*, 4(16), 2009, 142-153.

## Discussion

In studies were used porcine spine segments obtained from young, not fully developed breeding individuals, with the correct height of interbody space. The possibility of restoration of the intervertebral space by mechanical effect of the implant was not evaluated, but the quality of cooperation vertebra-implant-vertebra, which conditions the possibility of making mechanical corrections of mutual adjusting of vertebrae and fulfilling carrier functions of the implant-bone tissue system.

To fulfil given function, proper seating of the implant in the interbody space was necessary. On CT<sub>i</sub> images, by selecting the proper diameter of the implant to the interbody space height, while applying progressive screwing with a partial reverse, a total cut of the thread into porcine endplates' surfaces was gained. It was hypothesized, that the carrier function of the implant stems from its adjustment to the endplate's surface, and also can be improved by construction element in a form of a shelf, with which indirectly contacted both vertebral bodies. This can be a contribution to the conclusion that the proposed model of the implant may be a bio-stabilization of a decreased risk of subsidence of the interbody space, while preserving all surgical principles for preparation of implant's bed.

However, further qualitative-quantitative evaluation of the system vertebra-implant-vertebra is required, including bio-mechanical studies and later on living organisms – animals, with observation with a proper follow-up.

## Conclusions

1. Using porcine specimen, it can be modeled installation of the implant in the disc space (interbody) and precisely observed effects of installation steps; cutting of the thread into the endplate.

2. Modern computed tomography CT<sub>i</sub>-3D used in our study can identify the division zone: implant (titanium)-peri-implant tissues, and evaluate a contact geometry with an accuracy of tens of micrometers.

3. Gained geometric propriety of seating of the implant, before using of medical technology, should be confirmed by particular biomechanical and preclinical studies.

## Acknowledgments

*In the paper were used results of studies partially financed by the European Regional Development Fund under the Operational Programme Innovative Economy for 2007-2013 (no POIG.01.04.00-08-001/...).*

## References

- [4] Dobkiewicz A., Baran B., Ciupik L. F., Pieniążek J.: Preliminary assessment of the spondylolisthesis comprehensive surgical treatment in lumbar spine. *The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research*, 4(16), 2009, 161-168.
- [5] Ciupik L. F., Kierzkowska A., Pieniążek J., Zarzycki D.: Znaczenie blaszki granicznej w stabilizacji międzytrzonowej, [w] *Spondyloimplantologia zaawansowanego leczenia kręgosłupa systemem DERO*. Praca zbiorowa pod red. L. Ciupik, D. Zarzycki, 2005.

# NOWE MATERIAŁY KOMPOZYTOWE BAZUJĄCE NA OSNOWIE POLILAKTYDOWEJ PRZEZNACZONE NA GWOŹDZIE ŚRÓDSZPIKOWE

A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>1\*</sup>, J. CHŁOPEK<sup>1</sup>, P. DOMALIK<sup>1</sup>,  
M. BOGUŃ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

<sup>2</sup> POLITECHNIKA ŁÓDZKA,  
WYDZIAŁ TECHNOLOGII MATERIAŁOWYCH I WZORNICTWA TEKSTYLIÓW,  
KATEDRA WŁÓKIEN SZTUCZNYCH,  
UL. ŻEROMSKIEGO 116, 90-543 ŁÓDŹ

\* E-MAIL: MORAWSKA@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu różnych faz modyfikujących (włókna węglowe (CF), włókna z alginianu wapnia (Alg), nanocząstki fosforanu trójwapnia (TCP)) na właściwości mechaniczne, szybkość degradacji i bioaktywność kompozytów o osnowie z polilaktynu (PLA). Badaniom poddano trzy układy kompozytowe: PLA+CF, PLA+TCP+CF i PLA+TCP+CF+Alg, co pozwoliło określić wpływ poszczególnych faz na finalne właściwości biomateriałów.

Otrzymane kompozyty poddano badaniom *in vitro* w symulowanym środowisku biologicznym (płyn Ringera i SBF, 37°C przez okres 1 roku). Dla próbek wyjściowych oraz po wybranych okresach obserwacji określono właściwości mechaniczne, wykonano badania mikrostruktury z mikroanalizą rentgenowską (SEM+EDAX), badania spektroskopowe w podczerwieni (FTIR) oraz wykonywano pomiary masy próbek i pH płynów inkubacyjnych.

Kompozyt PLA+TCP+CF+Alg cechował się najwyższą wytrzymałością, co wskazuje na korzystny wpływ równoczesnego zastosowania obu rodzajów włókien, węglowych i alginianowych. Dodatek TCP poprawił wytrzymałość kompozytu PLA+TCP+CFI w porównaniu do PLA+CFII, co jest możliwe dzięki dobrej homogeniczności kompozytu. Dodatek TCP przyspieszył nukleację apatytu, jednak największą ilość wydzielań apatytowych zaobserwowano dla kompozytu PLA+TCP+CFI+Alg.

Opracowane w ramach pracy wielofazowe układy kompozytowe mogą znaleźć zastosowanie w produkcji wielofunkcyjnych, biodegradowalnych gwoździ śródszpikowych o podwyższonej wytrzymałości w początkowym etapie po implantacji i module Younga zbliżonym do modułu Younga kości, dzięki czemu mogą w sposób znaczący poprawić jakość zespołów śródszpikowych, a dzięki zastosowaniu nośników leków i bioaktywnych dodatków również przyspieszyć proces gojenia się kości.

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 99-104]

# NEW COMPOSITE MATERIALS BASED ON POLYLACTIDE MATRIX FOR INTRAMEDULLARY NAILS

A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>1\*</sup>, J. CHŁOPEK<sup>1</sup>, P. DOMALIK<sup>1</sup>,  
M. BOGUŃ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup> TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
FACULTY OF MATERIAL TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN,  
DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES,  
UL. ŻEROMSKIEGO 116, 90-543 ŁÓDŹ, POLAND

\* E-MAIL: MORAWSKA@AGH.EDU.PL

## Abstract

The aim of the studies was to evaluate the influence of applied modifying phases on mechanical properties, degradation rate and bioactivity of composites with polylactide matrix (PLA). Long carbon fibres (CF), long calcium alginate fibres (Alg) and tricalcium phosphate nanoparticles (TCP) were used as the modifiers. Three composite systems were investigated: PLA+CF, PLA+TCP+CF and PLA+TCP+CF+Alg.

Composites were investigated under *in vitro* conditions in simulated biological environment (Ringer solution and SBF, 37°C, 1 year observation). The study of mechanical properties, microstructure with roentgen microanalysis (SEM+EDAX) and infrared spectroscopy (FTIR) were performed for all samples before and after selected observation periods. Additionally, mass of samples and pH of incubation fluids were measured.

PLA+TCP+CF+Alg composite was characterised by the highest bending strength. The addition of TCP in the case of PLA+TCP+CF also increased the composite strength compared to PLA+CF. Improvement of this parameter indicates the good homogeneity of TCP. TCP addition accelerated apatite nucleation, however the largest amount of precipitation was observed for PLA+TCP+CF+Alg.

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 99-104]

## Introduction

Intramedullary nailing is a one of the methods of treatment of long bones fractures. The development of intramedullary nails included primarily the new construction solutions and chemical modifications of metallic nails. However, the new solutions are still insufficient [1]. The most important requirements for intramedullary nails, besides of their biocompatibility, are the high strength of materials, Young's modulus fitting to the Young's modulus of bone, bioactivity and ability to biodegradation [2]. Such of complexity of functions is impossible to fulfil with conventional materials, it may only be accomplished with multiphase, complex composite systems. Application of composites based on degradable polymers reinforced by fibres (carbon or polymer fibres) and modified by bioactive fillers (hydroxyapatite (HAP), tricalcium phosphate (TCP), bioglass) has the benefit of the necessary potential [3,4].

Gwoździowanie śródszpikowe stanowi skuteczną metodę leczenia złamań kości długich. Rozwój tej techniki operacyjnej obejmował przede wszystkim prace nad nowymi rozwiązaniami konstrukcyjnymi i materiałowymi w obrębie materiałów metalicznych, które stają się jednak niewystarczające ze względu na wzrastające wymagania stawiane biomateriałom [1]. Do wymagań stawianych gwoździom śródszpikowym, oprócz biogodności, należą przede wszystkim wysoka wytrzymałość, moduł Younga dopasowany do modułu Younga kości, bioaktywność, zdolność do biodegradacji [2]. Taka złożoność właściwości i funkcji nie jest możliwa do spełnienia przez materiały konwencjonalne, mogą jej sprostać jedynie wielofazowe, złożone układy kompozytowe. Możliwości takie stwarzają kompozyty oparte o polimery degradowalne wzmacniane włóknami (włókna węglowe, polimerowe) i modyfikowane dodatkami bioaktywnymi (HAP, TCP, bioszkle) [3,4].

W niniejszej pracy degradowalną osnowę polilaktydową poddano modyfikacji trzema różnymi materiałami: nanocząstkami TCP, włóknami węglowymi i włóknami alginianowymi. TCP wykazuje wysoką biogodność, bioaktywność oraz skłonność do resorpcji w środowisku żywego organizmu. Uważany jest za materiał osteokonduktywny, który wspomaga regenerację kości [4]. Podstawowym zadaniem włókien węglowych było podwyższenie wytrzymałości materiału, ponadto są one również zdolne do stymulacji wzrostu tkanki kostnej i spełnienia roli rusztowania po resorpcji osnowy polimerowej [5]. Włókna węglowe są jedynie częściowo degradowalne, dlatego też mogą być zastosowane w zewnętrznej części gwoździ, która powinna przerosnąć kością. Włókna alginianowe są natomiast całkowicie degradowalne, dlatego mogą być użyte do wzmocnienia wewnętrznej części gwoździa. Mogą one również zostać wykorzystane jako nośniki leków lub innych substancji aktywnych [6].

Celem pracy była ocena wpływu różnych faz modyfikujących (włókna węglowe (CF), włókna z alginianu wapnia (Alg), nanocząstki fosforanu trójwapnia (TCP)) na właściwości mechaniczne, szybkość degradacji i bioaktywność kompozytów o osnowie z polilaktydu (PLA). Badaniom poddano trzy układy kompozytowe: PLA+CF, PLA+TCP+CF i PLA+TCP+CF+Alg, co pozwoliło określić wpływ poszczególnych faz na finalne właściwości biomateriałów.

## Materiały i metody

Jako osnowę materiałów kompozytowych zastosowano poli(L-laktyd) (PLA, Ingeo™ 3051D, NatureWorks® LLC). Jako wzmocnienie kompozytów zastosowano dwa typy włókien węglowych, włókna węglowe CFI – średniomodulowe włókna węglowe T300 Torayca (wytrzymałość na rozciąganie 3,2 GPa, moduł Younga 235 GPa, wydłużenie 1,4%) oraz włókna węglowe CFII – włókna węglowe HTS 5631 Toho Tenax America (wytrzymałość na rozciąganie 4,3 GPa, moduł Younga 238 GPa, wydłużenie 1,8%). β-fosforan trójwapnia (TCP, Fluka, Germany) zastosowano jako dodatek bioaktywny (skład tlenkowy: 54,3% mas. CaO, 45,7% mas. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

Włókna z alginianu wapnia zostały otrzymane w Katedrze Włókien Sztucznych na Wydziale Technologii Materiałowych i Wzornictwa Tekstyliów Politechniki Łódzkiej. Włókna formowano metodą z roztworu na mokro przy użyciu wody destylowanej jako rozpuszczalnika [7]. Roztwór przędzalniczy został przygotowany z alginianu sodu. Zestalenie włókien z alginianu wapnia odbywało się w kąpeli zawierającej CaCl<sub>2</sub> i HCl. Proces wyciągania włókien obejmował dwa etapy, ciągnięcie wstępne w kąpeli plastyfikacyjnej zawierającej CaCl<sub>2</sub> i niewielką ilość roztworu HCl oraz ciągnięcie w oparach nasyconych wodą w temperaturze 135°C.

In this work, degradable polylactide matrix was modified by three different materials: TCP nanoparticles, carbon fibres and alginate fibres. TCP is characterised by high biocompatibility, bioactivity and degradation ability in the living organism. Its osteoconductive properties accelerate bone regeneration [4]. The main role of carbon fibres is increasing of material strength, but they are also able to stimulate bone growth and fulfil the role of scaffold after resorption of polymer matrix [5]. Carbon fibres are only partially degradable, therefore they may be used in the external part of nails, which should overgrow of bone. Alginate fibres are totally degradable, therefore they may be used as an internal part of nail. They may reinforce of composites but also be used as a carrier of drug or other active factors [6].

The aim of the studies was to evaluate the influence of applied modifying phases on mechanical properties, degradation rate and bioactivity of composites with polylactide matrix (PLA). Long carbon fibres (CF), long calcium alginate fibres (Alg) and tricalcium phosphate nanoparticles (TCP) were used as the modifiers. Three composite systems were investigated: PLA+CF, PLA+TCP+CF and PLA+TCP+CF+Alg.

## Materials and methods

Poly(L-lactide) (PLA, Ingeo™ 3051D, NatureWorks® LLC) was used as composites matrix. Two different types of carbon fibres were used for composite reinforcement, CFI carbon fibres – semi-modulus carbon fibres T300 Torayca, tensile strength 3.2 GPa, Young's modulus 235 GPa, elongation 1.4% and CFII carbon fibres – carbon fibres HTS 5631 Toho Tenax America, tensile strength 4.3 GPa, Young's modulus 238 GPa, elongation 1.8%.

The β-tricalcium phosphate (TCP, Fluka, Germany) was used as a filler of PLA matrix (the oxides composition: 54.3 mass % CaO, 45.7 mass % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

Calcium alginate fibres were produced by Team of Fibre Formation and Biomaterials in Department of Man-Made Fibres, Technical University of Lodz. Fibres were formed using the wet-spinning from solution using distilled water as the solvent [7]. Spinning solutions were prepared using sodium alginate. The solidification of calcium alginate fibres was conducted in a bath containing CaCl<sub>2</sub> and HCl. The drawing process consisted of two stages: the first drawing in a plastification bath containing CaCl<sub>2</sub> and a small quantity of solution of HCl and the second drawing in saturated water vapour at a temperature of 135°C. After winding, the fibres were dried in isometric conditions at a temperature of 25°C. Fibre diameter was average 17 μm, tensile strength of single fibre was 221 MPa and Young's modulus was 13 GPa.

Three different composite systems were investigated:  
 - PLA+CFII – composite with PLA matrix modified by uniaxially oriented long carbon fibres (CFII-50 wt%),  
 - PLA+TCP+CFI – composite with PLA matrix modified by uniaxially oriented long carbon fibres (CFI-50 wt%) and TCP nanoparticles (6 wt%),  
 - PLA+TCP+CFI+Alg – composite with PLA matrix modified by long carbon fibres (CFI-25 wt%), long calcium alginate fibres (Alg-25 wt%) (uniaxially oriented fibres) and TCP nanoparticles (6 wt%).

Particularly prepregs were obtained in the first step of composite manufacturing. PLA+CFII 1D prepregs were prepared by impregnation of CFII fibres in PLA solution (PLA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:4 ratio), PLA+TCP+CFI 1D prepregs were obtained by impregnation of CFI fibres in PLA solution with TCP.



Po nawinięciu włókna były suszone w warunkach izometrycznych w temperaturze 25°C. Średnica włókien wynosiła średnio 17 μm, wytrzymałość na rozciąganie 221 MPa, natomiast moduł Younga 13 GPa.

W pracy badaniom poddano trzy typy kompozytów, dla których stosowano następujące oznaczenia:

- PLA+CFII – kompozyt o osnowie PLA modyfikowanej włóknami węglowymi ciągłymi ułożonymi jednokierunkowo (CFII-50% wag.),
- PLA+TCP+CFI – kompozyt o osnowie PLA modyfikowanej włóknami węglowymi ciągłymi ułożonymi jednokierunkowo (CFI-50% wag.) i nanocząstkami TCP (6% wag.),
- PLA+TCP+CFI+Alg – kompozyt o osnowie PLA modyfikowanej jednokierunkowo ułożonymi włóknami węglowymi ciągłymi (CFI-25% wag.) i włóknami ciągłymi z alginianu wapnia (Alg-25% wag.) oraz nanocząstkami TCP (6% wag.).

W pierwszym etapie otrzymywania kompozytów przygotowano poszczególne prepregi. Prepregi PLA+CFII 1D sporządzono przez impregnację włókien CFII roztworem PLA (PLA rozpuszczony w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> w proporcji 1:4). Prepregi PLA+TCP+CFI 1D otrzymano poprzez impregnację impregnację włókien CFI roztworem PLA zawierającym TCP. Roztwór PLA w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4) z TCP otrzymano poprzez dodanie zawiesiny TCP w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/4 całkowitej zawartości CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) do roztworu PLA w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3/4 całkowitej zawartości CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Całość mieszano przez 20 min na mieszadle magnetycznym. Prepregi PLA+TCP+Alg 1D otrzymano poprzez impregnację włókien alginianowych roztworem PLA+TCP (przygotowanym j.w.). Prepregi prasowano na gorąco (120°C, 110 kPa/cm<sup>2</sup>) w formie o wymiarach 60x60x4mm. Otrzymaoną płytkę pocięto na belki o wymiarach (60x5x4 mm - l,w,h).

Otrzymane kompozyty poddano badaniom *in vitro* w symulowanym środowisku biologicznym (płyn Ringera i SBF, 37°C). Właściwości mechaniczne określono dla próbek wyjściowych oraz po 2 i 6 tygodniach inkubacji w płynie Ringera na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej (Zwick 1435). Badania mikrostruktury z mikroanalizą rentgenowską (SEM+EDAX) zostały wykonane dla próbek po 4 tygodniach inkubacji w płynie SBF przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego NovaNanoSEM FEI zaopatrzonego w przystawkę EDAX. Próbkę przed analizą pokryto złotem. Badania spektroskopowe w podczerwieni (FTIR) przeprowadzono dla próbek wyjściowych oraz po 4 i 10 tygodniach inkubacji w SBF. Badania wykonano techniką transmisyjną na spektrometrze fourierowskim firmy BIO-RAD FTS-60V. Ponadto przeprowadzono pomiary masy próbek po ich uprzednim wysuszeniu do stałej masy oraz pH płynów inkubacyjnych.

## Wyniki i dyskusja

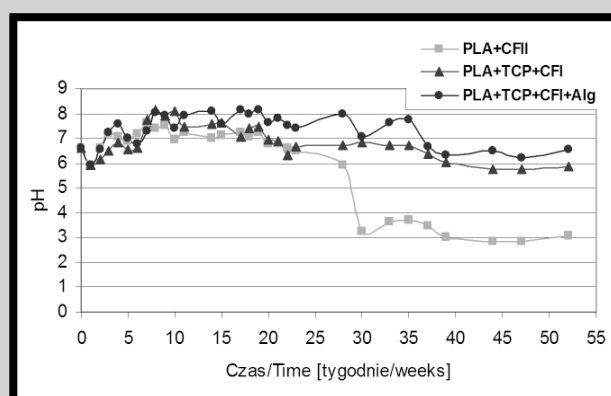
Pomiary zmian masy próbek oraz pH płynu Ringera wykazały, że zastosowany na osnowę polilaktyd zaczyna ulegać degradacji po 6 miesiącach inkubacji (RYS. 1, 2). Świadczy o tym skokowa zmiana pH między 28 a 30 tygodniem widoczna dla kompozytu PLA+CFII, co pokrywa się z początkiem ubytku masy tego materiału. Dla pozostałych kompozytów, o degradacji PLA świadczy ubytek masy widoczny po 23 tygodniach. Największa zmiana masy nastąpiła dla PLA+TCP+CFI, co było związane z degradacją zarówno PLA jak i nanocząstek TCP. Najmniejszy spadek masy nastąpił w przypadku PLA+TCP+CFI+Alg, co może wynikać z częściowego uwięzienia nanocząstek TCP przez żelujące włókna alginianowe. Dla tych materiałów nie obserwuje się wyraźnego spadku pH, co wynika z lekkiej alkalizacji środowiska przez zastosowane modyfikatory (TCP i włókna alginianowe) i tym samym neutralizacji zakwaszenia środowiska związanego z degradacją PLA. Zmniejszenie kwasowości środowiska wpływa korzystnie na biodegradację tych materiałów.

PLA solution (PLA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:4 ratio) with TCP particles was prepared by adding the suspension of TCP in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/4 of total volume of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to the solution of PLA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3/4 of total volume of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and mixing together on magnetic stirrer by 20 min. PLA+TCP+Alg 1D prepregs were prepared by impregnation of calcium alginate fibres by PLA+TCP solution (as above). The composite plates (60x60x4mm) were obtained by hot pressing method of prepregs (120°C, 110 kPa/cm<sup>2</sup>), next the plates were cut to the shape of beams (60x5x4 mm - l,w,h).

Composites were investigated under *in vitro* conditions in simulated biological environment (Ringer solution and SBF, 37°C). Mechanical properties were tested after 2 and 6 weeks of incubation in Ringer by universal mechanical testing machine (Zwick 1435). Microstructure with roentgen microanalysis were performed for samples after 4 weeks of incubation in SBF by using scanning electron microscope NovaNanoSEM FEJ connected with EDAX (FEJ Europe Company). Before analysis the samples were covered with gold. Infrared spectroscopy (FTIR) were performed for all samples before and after 4 and 10 weeks of incubation in SBF, in pellet techniques by Fourier spectrometer BIO-RAD FTS-60V. Additionally, mass of samples (after their drying to constant mass) and pH of incubation fluids were measured.

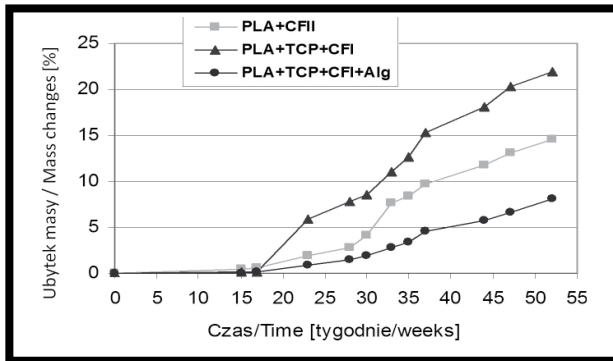
## Results and discussion

The beginning of PLA matrix degradation was observed after 6 months of samples incubation in Ringer solution, indicated in the study of samples mass and pH changes of fluids (FIG. 1, 2). Significant decrease of pH connected with degradation of PLA+CFII was observed between the 28<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> week and it coincided with mass loss of this composite. For the other composites, PLA degradation was indicated by mass loss after the 23<sup>rd</sup> week. The greatest loss of mass was observed in PLA+TCP+CFI and it was connected with degradation of PLA but also TCP nanoparticles. The lowest reduction of mass was observed in the case of PLA+TCP+CFI+Alg and it suggests partial trapping of TCP by gelled alginate fibres. However, no significant decrease of pH was measured for these composites as a result of small alkaline influence of degraded TCP and alginate fibres on environment causes the acidic neutralisation of fluids after PLA degradation. Decreasing of the environment acidity is very suitable for the biocompatibility of materials.



RYS. 1. Zmiany pH płynu Ringera w funkcji czasu inkubacji badanych materiałów.

FIG. 1. pH changes of Ringer solution in the function of incubation time of studied samples.

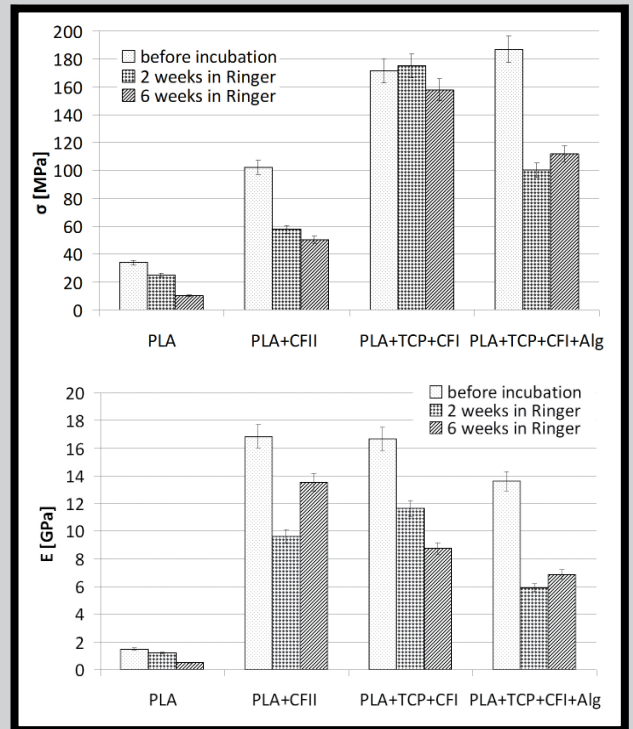


**RYS. 2. Zmiany masy badanych materiałów w funkcji czasu inkubacji w płynie Ringera.**  
**FIG. 2. Mass changes of studied samples in the function of incubation time in Ringer solution.**

RYS. 3 przedstawia wpływ poszczególnych dodatków modyfikujących na wytrzymałość i moduł sprężystości kompozytów w porównaniu do samego PLA. Wszystkie zastosowane dodatki poprawiają w sposób znaczący oba te parametry i odpowiadają one parametrom mechanicznym kości zbitej (z wyjątkiem wytrzymałości PLA+CFII). Najwyższą wytrzymałość wykazuje kompozyt zawierający oba typy włókien, węglowe i alginianowe. Zadaniem włókien jest przeniesienie obciążenia przekazywanego przez osnowę polimerową. Otrzymane wyniki świadczą więc, o efektywnym przenoszeniu obciążeń z osnowy na włókna, co z kolei wskazuje na dobrą adhezję na granicy faz włókno-osnowa. Wytrzymałość tego kompozytu jest zdecydowanie wyższa od wytrzymałości kompozytu zawierającego tylko włókna węglowe, natomiast moduł sprężystości jest nieznacznie niższy, co wynika z niskiego modułu Younga samych włókien alginianowych. Dodatek TCP również zdecydowanie poprawia wytrzymałość kompozytu z włóknami węglowymi, co wiąże się z niską zawartością procentową nanocząstek TCP - 6% wag. Większy udział nanododatku powoduje obniżenie wytrzymałości kompozytu. Poprawa właściwości mechanicznych kompozytu dzięki zastosowaniu TCP wskazuje również na jego dobrą homogeniczność.

Kolejną ważną cechą w przypadku implantów degradable jest dopasowanie czasu ich degradacji do szybkości odbudowy tkanki kostnej, co przejawia się stopniowym obniżaniem ich parametrów mechanicznych. Pozwala to nowopowstałej tkance kostnej na stopniowe przyjmowanie obciążeń, co ma zasadnicze znaczenie przy jej prawidłowej przebudowie. Spadek parametrów mechanicznych w funkcji czasu inkubacji zaobserwowano w przypadku wszystkich próbek, jednak największy spadek wytrzymałości odnotowano w przypadku kompozytu zawierającego włókna alginianowe. Jest to związane z degradacją tych włókien w środowisku wodnym. Najmniejsza zmiana wytrzymałości nastąpiła w przypadku kompozytu z TCP.

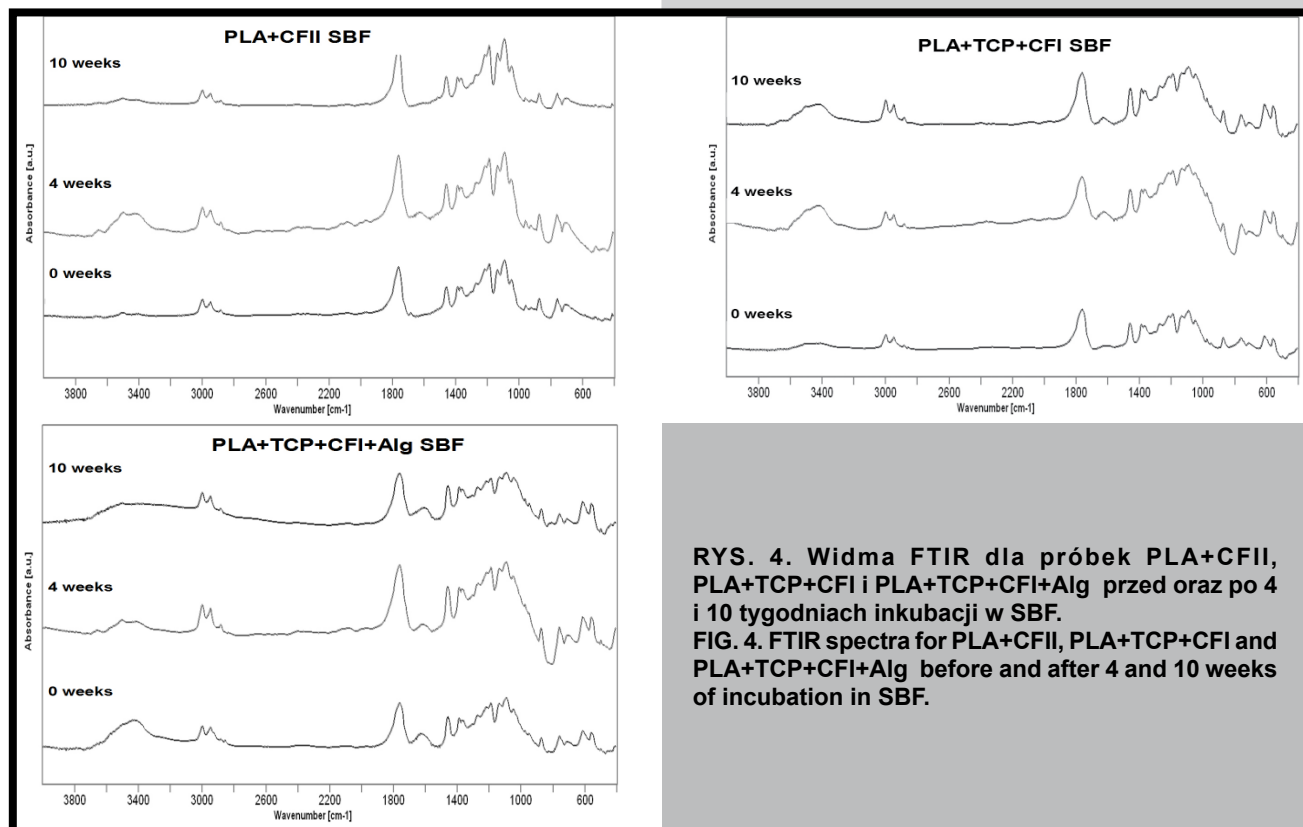
Badanie FTIR wykonano w celu oceny zmian strukturalnych zachodzących w badanych kompozytach w wyniku ich inkubacji w sztucznym osoczu – SBF. RYS. 4 przedstawia widma FTIR próbek PLA+CFII, PLA+TCP+CFI, PLA+TCP+CFI+Alg przed inkubacją oraz po 4 i 10 tygodniach inkubacji w SBF. Pasmami charakterystycznymi dla polilaktidu są: intensywne pasmo przy  $1760\text{ cm}^{-1}$  związane z drganiami rozciągającymi grup C=O, deformacyjne symetryczne pasmo przy  $1362, 1394\text{ cm}^{-1}$  związane z drganiami grup  $\text{CH}_3$ , rozciągające symetryczne i asymetryczne pasma w zakresie  $1090\text{--}1215\text{ cm}^{-1}$  pochodzące od grup C-O i C-O-C, rozciągające pasmo przy  $1046\text{ cm}^{-1}$  związane z grupami C- $\text{CH}_3$  oraz rozciągające pasma w zakresie  $2800\text{--}3004\text{ cm}^{-1}$  charakterystyczne dla grup C-H i  $\text{CH}_3$ .



**RYS. 3. Wytrzymałość na zginanie oraz moduł sprężystości próbek PLA, PLA+CFII, PLA+TCP+CFI oraz PLA+TCP+CFI+Alg wyjściowych oraz po 2 i 6 tyg. inkubacji w płynie Ringera.**  
**FIG. 3. Bending strength and modulus of elasticity for PLA, PLA+CFII, PLA+TCP+CFI and PLA+TCP+CFI+Alg initial and after 2 and 6 weeks incubation in Ringer solution.**

The influence of modifying additives on mechanical properties of composites in comparison with pure PLA is presented in FIG. 3. All applied modifiers significantly improved composite strength and elastic modulus, readjusting them to the mechanical parameters of compact bone (with the exception of PLA+CFII strength). The highest strength was observed in composite containing two types of fibres, carbon and alginate (PLA+TCP+CFI+Alg). The role of fibres is loads transmission, which are transferred from polymer matrix. The obtained results proved the effective load transferring from matrix to fibres, and revealed the presence of good adhesion in the fibres-matrix interface. The strength of this composite is significantly higher than in the case of composite with carbon fibres; while modulus of elasticity is slight lower, which is connected with low Young's modulus of alginate fibres. The addition of TCP also increased composite strength as a result of its low percentage – 6 wt%. The higher content of nanoparticles causes decrease of composite strength. Improvement of the mechanical properties of the composite also indicates the good homogeneity of TCP.

Synchronisation of the degradation time of resorbable implants to the time of bone tissue treatment in the fracture place, which is manifested by gradual decrease of mechanical properties, is another important property of these materials. It enables the new bone tissue to gradually accept loads, which is the fundamental role in the proper remodelling of bone. Decrease of mechanical parameters in the function of incubation time was observed for all samples, however the most significant changes were visible for composites with alginate fibres. This was connected with their degradation. The smallest changes of strength took place for PLA+TCP+CFI.



**RYS. 4.** Widma FTIR dla próbek PLA+CFII, PLA+TCP+CFI i PLA+TCP+CFI+Alg przed oraz po 4 i 10 tygodniach inkubacji w SBF.

**FIG. 4.** FTIR spectra for PLA+CFII, PLA+TCP+CFI and PLA+TCP+CFI+Alg before and after 4 and 10 weeks of incubation in SBF.

Analizując wszystkie widma nie stwierdzono znaczących zmian w intensywnościach i relacjach pasm pochodzących od polimeru, co pozwala przypuszczać, że po 10 tygodniach inkubacji polilaktyd jeszcze nie uległ znaczącej degradacji. Pokrywa się to z wnioskiem wysuniętym na podstawie analizy zmian pH i masy.

Wprowadzenie do kompozytu cząstek TCP powoduje pojawienie się pasm charakterystycznych dla grup  $\text{PO}_4^{3-}$  widocznych w zakresie  $550\text{--}615\text{ cm}^{-1}$ . Typowe pasmo grup fosforanowych charakteryzujące się najwyższą intensywnością przypada w zakresie  $940\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ , jest ono jednak w przypadku kompozytów z PLA niewidoczne w wyniku jego nakładania się z pasmami pochodzącymi od polimeru. W przypadku kompozytów PLA+TCP+CFI i PLA+TCP+CFI+Alg pasma pochodzące od fosforanu trójwapnia widoczne są przez cały okres inkubacji, co wskazuje, że cząstki TCP do 10 tyg. inkubacji nie uległy resorpcji lub też nastąpiła częściowa resorpcja TCP przy równoczesnym wytrąceniu apatytów z SBF. Obserwacje mikroskopowe wraz z analizą pierwiastków wykazały obecność na powierzchni tych materiałów wydzielenia apatytowych, co potwierdza prawdziwość drugiego przypuszczenia (RYS. 5a,b). Ilość tych wydzieleni jest znacznie większa na powierzchni kompozytu PLA+TCP+CFI+Alg, co wskazuje, że połączenie wszystkich stosowanych faz równocześnie posiada korzystny wpływ na bioaktywność materiału.

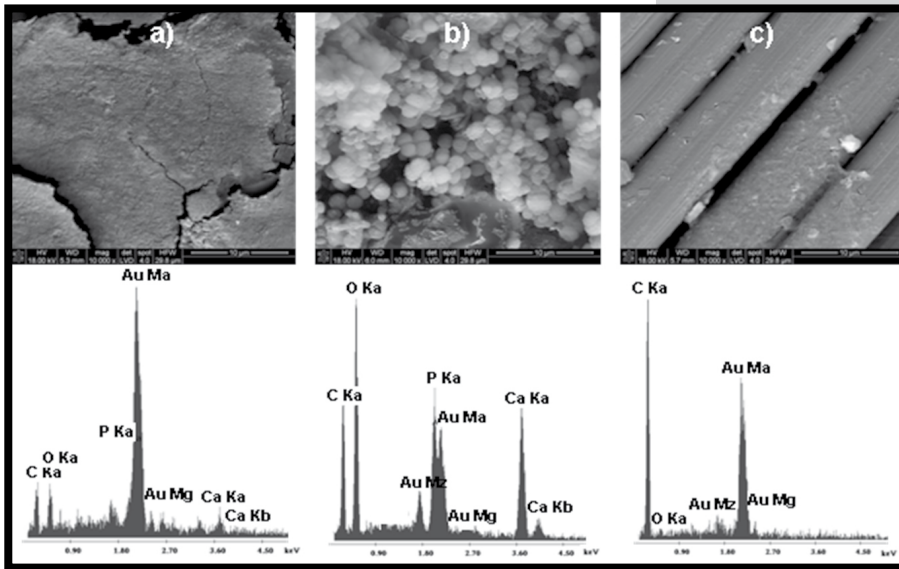
Natomiast na widmach FTIR próbek PLA+CFII nie zaobserwowano pasm charakterystycznych dla fosforanów w całym okresie obserwacji, wydzielenia apatytowe nie były również widoczne na zdjęciach SEM (RYS. 5c), co wskazuje na najniższą bioaktywność tego kompozytu, a tym samym potwierdza celowość zastosowania bioaktywnego dodatku w postaci TCP.

FTIR studies were performed in order to analyse the structural changes of the composites under the influence of their incubation in SBF. FIG. 4 shows FTIR spectra for PLA+CFII, PLA+TCP+CFI, PLA+TCP+CFI+Alg before and after 4 and 10 weeks of incubation. Characteristic bands for polylactide are: intensive band connected with stretching vibrations in C=O groups at  $1760\text{ cm}^{-1}$ , deformational symmetric bands corresponding to vibrations in  $\text{CH}_3$  groups at  $1362, 1394\text{ cm}^{-1}$ , stretching symmetric and asymmetric bands corresponding to C-O and C-O-C groups in the range of  $1090\text{--}1215\text{ cm}^{-1}$ , stretching band connected with C- $\text{CH}_3$  group at  $1046\text{ cm}^{-1}$  and stretching bands characteristic for C-H and  $\text{CH}_3$  groups in the range of  $2800\text{--}3004\text{ cm}^{-1}$ .

No significant changes were observed in the intensities and relations of bands connected with polymer, which suggests that during 10 weeks of incubation the degradation of polylactide was not yet significantly advanced. It confirms the results obtained in studies of pH and mass changes.

For the composites with TCP, the bands characteristic for  $\text{PO}_4^{3-}$  were observed in the range of  $550\text{--}615\text{ cm}^{-1}$ . The most intensive band of phosphate groups in the range of  $940\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  was not visible in this case because of its covering by bands originating from the polymer. For PLA+TCP+CFI and PLA+TCP+CFI+Alg, the bands corresponding to tricalcium phosphate ( $550\text{--}615\text{ cm}^{-1}$ ) can be observed throughout the observation period, which indicates two possibilities, for 10 weeks TCP particles were not resorbed or were partially resorbed with simultaneous apatite precipitation from SBF. Microscopic observations with elements analysis revealed the presence of the apatite precipitations on the materials surface and confirmed the correctness of the second conjectures (FIG. 5a,b). The greater amount of precipitations on the PLA+TCP+CFI+Alg surface indicates that the connection of all phases simultaneously has a very favourable influence on the bioactivity of materials.

The presence of apatite precipitations were not revealed on FTIR spectra and SEM pictures (FIG. 5c) obtained for PLA+CFII, therefore it suggests the lowest bioactivity of this composite and confirms the advisability of TCP use as the bioactive additive.



RYS. 5. Mikrostruktura powierzchni kompozytów po 4 tyg. inkubacji w SBF wraz ze średnią analizą pierwiastków z powierzchni materiału: a) PLA+TCP+CFI, b) PLA+TCP+CFI+Alg, c) PLA+CFII.

FIG. 5. Microstructure of composites surface after 4 weeks of incubation in SBF connected with average elements analysis:

a) PLA+TCP+CFI,  
b) PLA+TCP+CFI+Alg,  
c) PLA+CFII.

## Wnioski

Badania w symulowanym środowisku biologicznym wykazały, że w przypadku badanych kompozytów degradacja osnowy PLA zaczyna się od 23 tygodnia inkubacji. Kompozyt PLA+TCP+CFI+Alg charakteryzował się najwyższą wytrzymałością na zginanie, co wskazuje, że równoczesne zastosowanie dwóch rodzajów włókien, węglowych i alginianowych, pozwala skutecznie wzmacniać osnowę PLA. Dodatek TCP również poprawił wytrzymałość kompozytu PLA+TCP+CFI w porównaniu do PLA+CFII, co jest możliwe dzięki dobrej homogeniczności kompozytu.

Stopniowe obniżanie parametrów mechanicznych próbek w trakcie inkubacji w płynie Ringera (wytrzymałość na zginanie, moduł Younga) sugeruje degradację poszczególnych faz w kompozytach.

Dodatek TCP przyspieszył nukleację apatytu, jednak największą ilość wydzielań apatytowych zaobserwowano dla kompozytu PLA+TCP+CFI+Alg. Wskazuje to na korzystny wpływ równoczesnego zastosowania TCP i włókien alginianowych na tworzenie apatytu.

Opracowany w ramach pracy wielofazowy układ kompozytowy (PLA+TCP+CFI+Alg) może znaleźć zastosowanie w produkcji biodegradowalnych gwoździ śródszpikowych o podwyższonej wytrzymałości w początkowym etapie po implantacji i module Younga zbliżonym do modułu Younga kości, dzięki czemu może on w sposób znaczący poprawić jakość zespożeń śródszpikowych, a dzięki zastosowaniu bioaktywnego dodatku również przyspieszyć proces gojenia się kości. Ponadto istnieje możliwość wykorzystania włókien alginianowych, które stanowią jego fazę modyfikującą, jako nośników leków. Planuje się kontynuację pracy w kolejnych badaniach.

## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Nr 4575/B/T02/2009/37, ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## Piśmiennictwo

- [1] Marciniak J, Chrzanowski W, Krauze A.: Gwoździowanie śródszpikowe w osteosyntezie. Gliwice, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej 2006.
- [2] Niedźwiecki T, Brudnicki J, Niedźwiecki Ł.: Leczenie zaburzeń zrostu trzonu kości udowej gwoździem śródszpikowym. Niepowodzenia leczenia. Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja 2007, 9(4):377-383.
- [3] Ramakrishna R, Mayer J, Wintermantel E, Leong KW: Biomedical applications of polymer composite materials: a review. Composites Science and Technology 61, 2001, 1189-1224.

## References

## Conclusions

PLA matrix in investigated composites started to degrade after 23 weeks of incubation.

PLA+TCP+CFI+Alg composite was characterised by the highest bending strength. It indicates that combination of two kinds of fibres, carbon and alginate, is effective method for reinforcing of PLA matrix. The addition of TCP in the case of PLA+TCP+CFI also increased composite strength compared to PLA+CFII. Improvement of this parameter indicates the good homogeneity of TCP.

Gradually decreasing of mechanical parameters during incubation (bending strength, elastic modulus) suggests degradation of particular phases in composites.

TCP addition accelerated apatite nucleation, however the largest amount of precipitation was observed for PLA+TCP+CFI+Alg. It indicates of favourable influence of using TCP and alginate fibres simultaneously for creating of apatite.

Multiphase composite system elaborated in presented work (PLA+TCP+CFI+Alg) may find application in production of biodegradable intramedullary nails characterised by enhanced strength in the first stage after implantation and Young's modulus fitting to Young's modulus of bone, which can significantly improve the quality of bone treatment. Moreover, use of drug carriers and bioactive additives could promote healing of bone and these investigations will be continuing in the next studies.

## Acknowledgements

This work was realized as a part of research project No. 4575/B/T02/2009/37 and was financially supported by the Ministry of Science and High Education.

- [4] Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, Ragnit P, Paronin A, Lindholm TC: Microscopic evaluation of bone-implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. Biomaterials 16, 1995, 1175-1179.
- [5] Chłopek J, Morawska-Chochół A, Paluszkiwicz C: FTIR evaluation of PGLA – carbon fibres composite behaviour under 'in vivo' conditions. Journal of Molecular Structure 875, 2008, 101-107.
- [6] Gombotz WR, Wee S.F: Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 31, 1998, 267-285.
- [7] Boguń M: Nanokompozytowe włókna alginianowe i kompozyty z ich udziałem do zastosowań w inżynierii biomateriałowej. Zeszyty naukowe Nr 1062, Łódź 2010.

# POWSTAWANIE APATYTU NA ELASTYCZNYM KOMPOZYCIE KOŚCIOZASTĘPCZYM

LESZEK BORKOWSKI<sup>1\*</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>,  
ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>2</sup>, ZOFIA PASZKIEWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII

<sup>2</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA TECHNOLOGII CERAMIKI I MATERIAŁÓW OGNIOTRWALYCH  
\* E-MAIL: LESZEKB86@O2.PL

## Streszczenie

Podstawowe cechy materiałów kośćcozastępczych takie jak bioaktywność i biokompatybilność, mogą być badane *in vitro* przy wykorzystaniu roztworu imitującego płyn tkankowy tzw. płyn SBF. Dwufazowy kompozyt, przeznaczony do wypełniania ubytków kostnych, został wykonany z granul hydroksyapatytu węglanowego i polimeru polisacharydowego. Biomateriał testowano pod kątem zdolności tworzenia warstwy apatytu w roztworze SBF przez okres 30 dni. Po tym czasie powierzchnię próbek i płyn po inkubacji, poddano analizie z wykorzystaniem SEM-EDX. Wykazano tworzenie warstwy apatytowej na powierzchni kompozytu kośćcozastępczego.

**Słowa kluczowe:** bioaktywność, biokompatybilność, hydroksyapatyt węglanowy (CHAP), kompozyt kośćcozastępczy, SBF, SEM-EDX

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 105-109]

## Wstęp

Krystalizacja fosforanów wapnia (Ca-P) następująca w płynie SBF (ang. Simulated Body Fluid) jest procesem analogicznym do biologicznej mineralizacji, która zachodzi powszechnie w organizmach żywych [1]. Biomineralizacja obejmuje selektywną ekstrakcję i pobieranie składników z lokalnego środowiska i wbudowywanie ich do określonych struktur pod ścisłą kontrolą biologiczną. Zjawisku mineralizacji biologicznej podlegają oprócz kości i zębów, także naczynia krwionośne w przebiegu miażdżycy [2] oraz wszczepione na długi okres implanty układu krążenia jak np. sztuczne zastawki serca [3,4]. Krystalizacja soli Ca-P na powierzchni implantów medycznych jest ważna z punktu widzenia ortopedii, gdyż wykazano wysoką biokompatybilność wszczepów posiadających na swej powierzchni warstwę apatytu, przez którą były w kontakcie z sąsiadującymi tkankami [5]. Badania przeprowadzone na szkło-ceramicie apatytowo-wollastonitowej wykazały, iż formowanie się warstwy apatytu na powierzchni implantu wszczepionego do organizmu jest niezbędnym warunkiem dla utworzenia połączenia z kością [6]. Z kolei doświadczenia przeprowadzone na szczurach dowiodły, że warstwa apatytu stymuluje aktywność komórkową, a także pozytywnie wpływa na mnożenie się i różnicowanie osteoblastów oraz komórek macierzystych szpiku kostnego [7-9]. Wg Oghushi i in. [9] stymulacja osteogenezy przez apatyt biologiczny może zachodzić zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.

# APATITE FORMATION ON A FLEXIBLE BONE SUBSTITUTE

LESZEK BORKOWSKI<sup>1\*</sup>, GRAŻYNA GINALSKA<sup>1</sup>,  
ANNA ŚLÓSARCZYK<sup>2</sup>, ZOFIA PASZKIEWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,  
CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,  
LUBLIN, POLAND

<sup>2</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF TECHNOLOGY OF CERAMICS AND REFRACTORIES,  
KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: LESZEKB86@O2.PL

## Abstract

*Biocompatibility and bioactivity, elementary characteristics of bone substitute materials, can be examined *in vitro* using solution that simulates body fluids. Two-phase composite, intended for filling bone defects, was made of carbonated hydroxyapatite granules and polysaccharide polymer. Biomaterial was tested whether it can form apatite layer during soaking in SBF solution for 30 days. After that time, the surface of composite samples and the fluid were analyzed using SEM-EDX. Our observations indicate the ability of a bone substitute biomaterial to form apatite layer on its surface.*

**Keywords:** bioactivity, biocompatibility, bone substitutes, carbonated hydroxyapatite (CHAP), SEM-EDX, simulated body fluid (SBF)

[*Engineering of Biomaterials*, 106-108, (2011), 105-109]

## Introduction

The precipitation of calcium phosphate (Ca-P) in simulated body fluid (SBF) has attracted extensive research interest, because Ca-P precipitation is similar to biological mineralization [1]. The process of biomineralization involves the selective extraction and uptake of elements from the local environment and their incorporation into functional structures under strict biological control. Biomineralization occurs in normal hard tissues, such as bone and dentine, in diseased or atherosclerosed vessel walls [2], and at blood-contacting surfaces of long-term implanted cardiovascular devices, e.g. artificial valves [3,4]. Ca-P precipitation on the surface of biomedical materials plays an important role in orthopedic surgery due to very good biocompatibility of implants when the apatite is in contact with tissues [5]. Previous studies on bioactive ceramics, such as Bioglass, sintered hydroxyapatite and glassceramic AW, have reported that the essential requirement for artificial materials to bond to living bone is formation of a biologically active bone-like apatite layer on its surface when implanted in the living body [6]. Experiments on rats have demonstrated that this layer has an active role and can stimulate the cellular activity and positively influence the proliferation and differentiation of osteoblasts and marrow stem cells [7-9]. Oghushi et al. [9] conclude that osteogenic enhancement by biological apatite can occur both *in vivo* and *in vitro*.

SBF to bezkomórkowy roztwór o pH i stężeniu jonów zbliżonym do płynu tkankowego. Proces imitujący biologiczną mineralizację zachodzi, gdy w płynie SBF zostanie umieszczony materiał o określonych właściwościach. Skutkiem tego procesu jest powstawanie na jego powierzchni warstwy apatyty zawierającego grupy węglanowe [8,10]. Zatem bioaktywność in vivo danego materiału jest możliwa do przewidzenia przez zbadanie jego zdolności do tworzenia warstwy apatyty na swojej powierzchni w roztworze SBF [11,12].

Niniejsza praca przedstawia badanie in vitro zdolności tworzenia warstwy apatyty na powierzchni innowacyjnego biomateriału do wypełniania ubytków kostnych. Kompozyt ten składa się z dwóch faz: (1) porowatych granul hydroksyapatytu węglanowego oraz (2)  $\beta$  1,3 glukuanu (zgodnie z opisem patentowym [13]). Hydroksyapatyt (HAP) wykazuje chemiczne podobieństwo do frakcji mineralnej kości i jest uznanym składnikiem materiałów kościocząsteczkowych z powodu swej osteokonduktywności, biozgodności, bioaktywności oraz minimalnego ryzyka wystąpienia reakcji alergicznych [14,15]. Właściwości HAP zawierającego dodatkowo grupy węglanowe przesunięte są w kierunku większej rozpuszczalności, mniejszej krystaliczności i większej reaktywności chemicznej z powodu obecności słabego wiązania [16,17]. Drugi ze składników kompozytu nadaje elastyczność i może zostać użyty jako nośnik leków [18,19].

## Materiały i metody

### Wytworzenie kompozytu dwufazowego

Próbki biomateriału przygotowano z granul hydroksyapatytu węglanowego i polimeru polisacharydowego wg procedury opisanej w zgłoszeniu patentowym [13]. Do wytworzenia kompozytu wykorzystano dwie frakcje granul CHAP (0,2-0,3 mm i 0,4-0,6 mm) o następujących parametrach: porowatość otwarta - 66%, nasiąkliwość - 68%, gęstość pozorną - 0,97 g/cm<sup>3</sup>. Próbki kompozytu w postaci kostek sześciennych o boku długości 10 mm (+/- 1) suszono przez 4 dni w 37°C, a następnie w eksykatorze w temperaturze pokojowej przez 3 dni. Po zważeniu próbki wsterylizowano w autoklawie.

### Inkubacja w SBF

SBF przygotowano wg procedury Kokubo i in. [12], przez rozpuszczenie NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> i Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w wodzie destylowanej oraz dodano (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>3</sub>. Przy pomocy HCl ustalono pH na poziomie 7,25. Następnie roztwór poddano sterylizacji filtracyjnej (zestaw Stericup, 500 ml, 0,22  $\mu$ m; Millipore Corporation). Do sterylnych butelek szklanych wlało 70 ml płynu i umieszczono po 3 próbki kompozytu w każdej. Inkubację prowadzono w temp. 37°C przez 10, 20 lub 30 dni. Po tym czasie próbki wyjęto, suszono jak poprzednio, zważono i obliczono różnice w masie.

### Analiza powierzchni kompozytu i stężenie jonów w SBF po inkubacji

Po wyjęciu próbek biomateriału z SBF zmierzono stężenie jonów wapnia i fosforu w pozostałym płynie przy użyciu zestawów diagnostycznych Liquick Cor-Calcium 30 i Liquick Cor-Phosphorus 30 (Cormay). Powierzchnię próbek kompozytu analizowano w elektronowym mikroskopie skaningowym (FE-SEM; Zeiss ULTRA plus) z detektorem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX; Bruker).

The process that mimics biomineralization occurs in vitro when the material is submerged in a SBF, an acellular solution with ion concentrations and a pH value similar to those of human blood plasma. This biomimetic process results in formation of a carbonated apatite layer on the surface of soaked material [8,10]. Therefore, the in vivo bone bioactivity of a material can be predicted by examining the apatite formation on its surface in SBF [11,12].

The present study was undertaken to examine in vitro apatite-forming ability of a novel bone substitute material. This composite consists of two phases: (1) porous carbonated hydroxyapatite (CHAP) granules and (2)  $\beta$ -1,3-glucan, pursuant to patent pending [13]. Hydroxyapatite (HAP) exhibits chemical similarity with the mineral phase of bone, and is an appreciated component of bone substitutes due to its biocompatibility, osteoconductivity, bioactivity and minimal risk of allergic reactions [14,15]. Properties of HAP containing carbonate ions move towards higher solubility, lower crystallinity and higher chemical reactivity due to weak bonding [16,17]. The second component accounts for elasticity of the composite and may be used as a drug delivery vehicle [18,19].

## Materials and methods

### Composite preparation

The biomaterial was prepared by mixing carbonated HAP granules with polysaccharide polymer according to the procedure described in patent pending [13]. Two fractions of CHAP granules were used, i.e. 0.2-0.3 and 0.4-0.6 mm, having the following properties: effective porosity - 66%, soaking capacity - 68%, bulk density - 0.97 g/cm<sup>3</sup>. The fabricated material was cut into cubes with the side length of 10 mm (+/- 1), dried for 4 days at 37°C and subjected to exsiccation for the next 3 days. Dry samples were weighed and sterilized by autoclaving.

### Soaking in a SBF

The SBF was prepared by dissolving reagent grade NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> into ultra pure water, (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>3</sub> was added and the solution was buffered at pH 7.25 with HCl (according to method proposed by Kokubo et al. [12]). Afterwards, the fluid was sterilized by mechanical filtration, using the Stericup filter (500 ml, 0.22  $\mu$ m; Millipore Corporation) under vacuum. Autoclaved composite samples were soaked in 70 ml of SBF at 37°C for various periods: 10, 20 and 30 days (3 pieces were immersed together in one bottle). After a given period, the specimens were dried for 4 days at 37°C and the further 3 days over exsiccated silica gel at room temperature. The mass changes of submerged samples were calculated.

### Structural analysis of the samples and ions concentration of the SBF

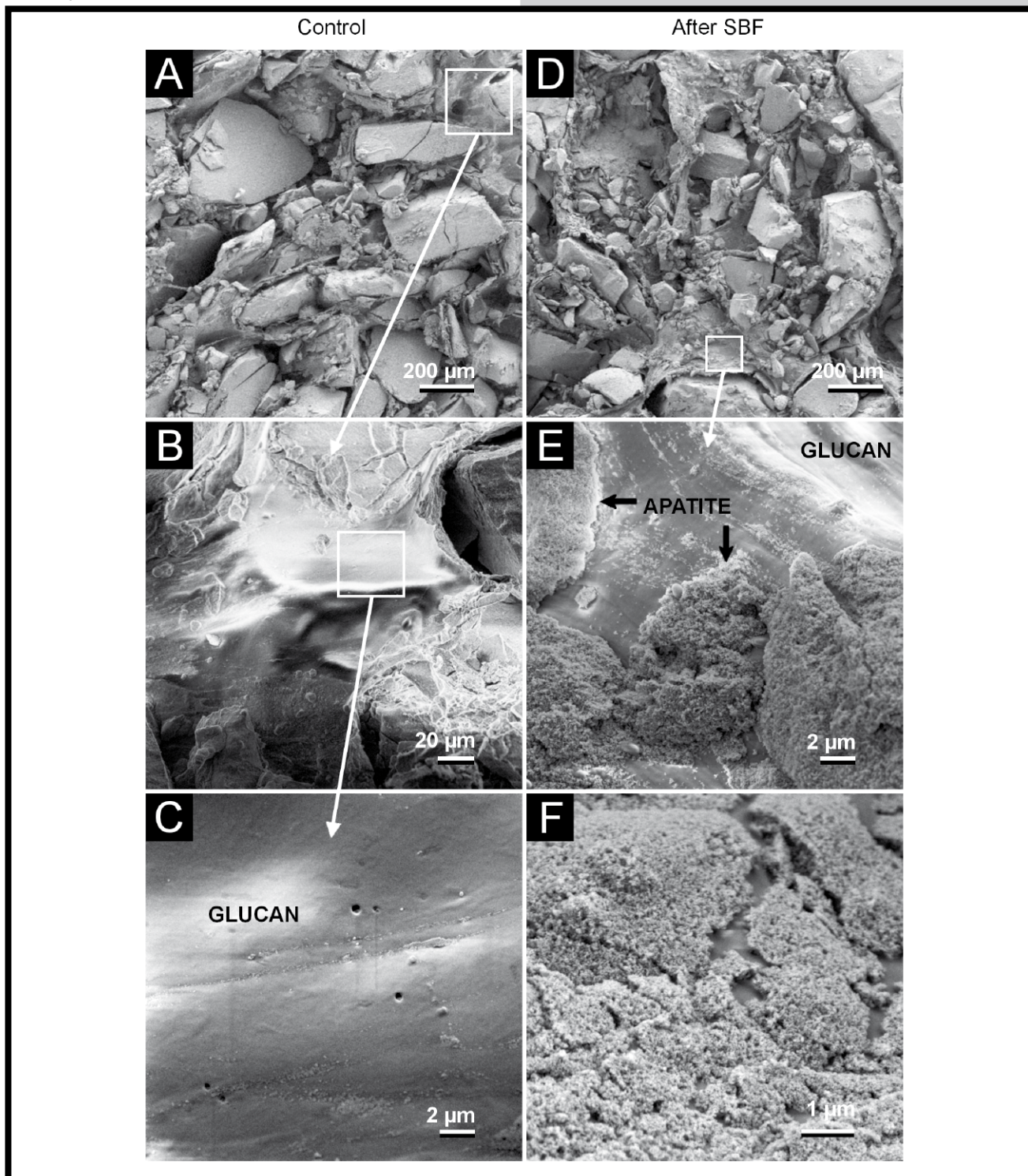
Changes in the concentration of calcium and phosphorus in SBF solution after soaking biomaterial samples were measured with Cormay diagnostic kits, Liquick Cor-Calcium 30 and Liquick Cor-Phosphorus 30. The surfaces of specimens before and after soaking in SBF were analyzed using scanning electron microscopy (FE-SEM; Zeiss ULTRA plus) with an energy dispersive X-ray detector (EDX; Bruker).

## Wyniki i dyskusja

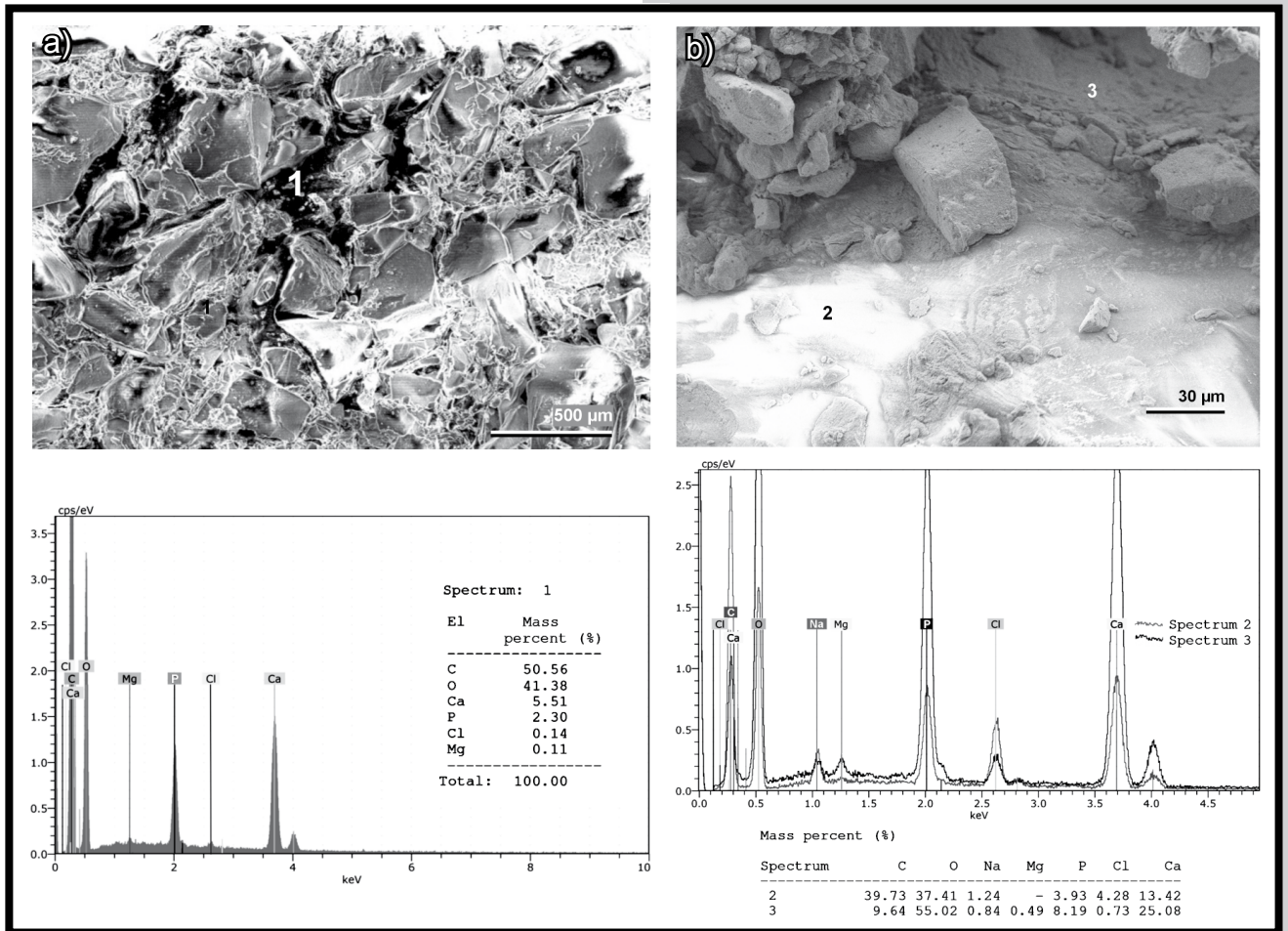
Wyniki analizy SEM-EDX powierzchni badanych próbek wykazują zmiany w morfologii i składzie pierwiastkowym. RYS. 1 przedstawia obrazy SEM powierzchni kompozytu CHAP-polimer cukrowy przed (A, B, C) i po inkubacji (D, E, F) w płynie SBF przez 30 dni. Na powierzchni organicznej próbek, które były zanurzone w SBF, widoczne są struktury utworzonego apatytu (RYS. 1E i F). RYS. 1C przedstawia gładką powierzchnię fazy organicznej próbki nie poddanej inkubacji.

## Results and discussion

Results of SEM-EDX analyses show changes in surface morphology and composition. FIG. 1 presents SEM photographs of the surfaces of CHAP-organic specimens before and after soaking in SBF for 30 days at 37°C. After incubation, apatite structures were found on the superficial area of organic phase of the biomaterial examined (see FIG. 1E and F). The surface of the sample not soaked in SBF remained plain (FIG. 1C).



RYS. 1. Obrazy SEM powierzchni kompozytu CHAP-polimer cukrowy przed (A, B, C) i po inkubacji (D, E, F) w płynie SBF przez 30 dni (przy różnych powiększeniach).  
 FIG. 1. SEM photographs of the CHAP-organic composite surfaces before (A, B, C) and after (D, E, F) soaking in SBF for 30 days (images at different magnifications).



**RYS. 2.** Dwa widma EDX składu pierwiastków na powierzchni fazy organicznej próbki kompozytu zanurzonej w SBF przez 30 dni (2b) i widmo dla próbki kontrolnej (2a), wraz z załączonymi zdjęciami SEM wskazującymi miejsca poddane analizie.

**FIG. 2.** EDX spectra of the biomaterial organic surfaces before (2a) and after incubation in SBF for 30 days (2b). Attached SEM pictures show spots subjected to EDX analysis.

Widma EDX pokazane na RYS. 2 ujawniają lokalny skład pierwiastków na powierzchni fazy organicznej próbki kompozytu: a) - kontrolnej, b) - badanej. Po 30 dniach zawartość wapnia i fosforu wzrosła, podczas gdy węgla obniżyła się. Widma 2 i 3 (RYS. 2b) demonstrują różnice w rozkładzie pierwiastków na powierzchni badanej próbki. Otrzymane obrazy świadczą o nierównomiernym rozmieszczeniu tworzącej się warstwy apatytu na powierzchni kompozytu.

Zaobserwowano zmiany masy fragmentów kompozytu poddanych inkubacji w SBF. Średni ciężar próbek wzrósł od 0,73% po 10 dniach do 1,01% po 30 dniach. Średni przyrost próbek inkubowanych przez 30 dni w płynie wymieniowym co 10 dni, wyniósł 1,13%.

Po skończonej inkubacji próbek kompozytu, płyn SBF poddano analizie przy użyciu specjalistycznych zestawów diagnostycznych. Stwierdzono, że stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w płynie poinkubacyjnym w porównaniu do wyjściowego obniżyło się w ciągu 10-30 dni do 1,58-2,12 mM, a poziom jonów fosforanowych do 0,2 mM. Ponadto wykazano, że kompozyt CHAP-glukan w kontakcie z płynem SBF nie wpływał znacząco na jego odczyn pH. Mieściło się ono w przedziale 7,24 do 7,39.

EDX profiles of the organic phase of composite superficial area before and after soaking in SBF are shown in FIG. 2a and FIG. 2b, respectively. After 30 days, the calcium and phosphorus content increased while the carbon content decreased. The spectra 2 and 3 (FIG. 2b) demonstrate differences in elemental distribution between the two organic surfaces on the sample treated with SBF solution. Different X-ray diffraction patterns on the organic surface of soaked sample indicate heterogenous arrangement of emerging apatite.

The weight changes of composite samples after soaking in SBF were observed. The average weight of specimens increased from 0.73% after 10 days of incubation to 1.01% after 30 days. The average weight of the samples submerged for 30 days in the fluid, renewed every 10 days, increased by about 1.13%.

When the incubation of samples in SBF was over, remaining solutions were tested using diagnostic kits. It was found that the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the fluid after soaking specimens for 10-30 days, in comparison with the original SBF, decreased to 1.58-2.12 mM and the level of  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions was less than 0.2 mM. The CHAP-organic composite did not cause significant pH changes of the fluid, which varied from 7.24 to 7.39.



Zaobserwowane zmiany pH i obniżenie stężenia jonów wapnia i fosforu w roztworze inkubacyjnym są zgodne z opisywanym mechanizmem wzrostu warstwy apatytu na powierzchni materiałów bioaktywnych [20,21]. Obecność jonów wapnia i fosforu w lokalnym środowisku jest konieczna, aby mogło zajść formowanie apatytu. W warunkach eksperymentu środowisko to stanowił płyn SBF, w którym stężenie wymienionych pierwiastków jest zbliżone do stężenia we krwi ludzkiej ( $\text{Ca}^{2+}$  - 2,5 mM;  $\text{HPO}_4^{2-}$  - 1 mM). Ponadto hydroksyapatyt rozpuszczając się w pierwszej fazie eksperymentu, stanowił dodatkowe źródło jonów wapnia i fosforu dla tworzonego apatytu [22].

## Wnioski

Przeprowadzone szczegółowe badania powierzchni i składu kompozytu CHAP-glukan wykazują zdolność tworzenia apatytu na jego powierzchni w roztworze SBF. Wykonane widma EDX wykazały przyrost ilości wapnia i fosforu na powierzchni biomateriału oraz uwidoczniły niejednolite tworzenie apatytu. Analiza płynu SBF po inkubacji kompozytu potwierdziła ubytek tych pierwiastków z roztworu. W związku z powyższym oczekuje się, iż kompozyt ten wykaże wysoką biozgodność po implantacji do ubytków kostnych, pobudzi proliferację komórek kościotwórczych i będzie mógł osiągnąć ściśle wiązanie z kością.

## Podziękowania

Pracę współfinansowano ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, grant nr. UDA-POIG 01.03.01-00-005/09-01 oraz DS2/11 Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

## Piśmiennictwo

- [1] Lu X, Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid, *Biomaterials* 2005; 26:1097-1108.
- [2] Rosanova IB, Mischenko BP, Zaitsev VV, Vasin SL, Sevastianov VI. The effect of cells on biomaterial calcification: Experiments with in vivo diffusion chambers. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:277-280.
- [3] Levy RJ, Wolfrum J, Schoen FJ, Hawley MA, Lund SA, Langer R. Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled-release diphosphonate. *Science* 1985; 228:190-192.
- [4] Levy RJ, Schoen FJ, Flowers WB, Staelin ST. Initiation of mineralization in bioprosthetic heart valves: studies of alkaline phosphatase activity and its inhibition by  $\text{AlCl}_3$  or  $\text{FeCl}_3$  preincubation. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:906-935.
- [5] Suzuki K, Kobayashi R, Yokoyama Y, Harada Y, Kokubo T. Experimental study of an artificial trachea made of polymers coated with hydroxyapatite. In: Ducheyne P. and Christiansen D., Editors, *Bio-ceramics vol. 6*, Butterworth-Heinemann Ltd., London 1993; 245-250.
- [6] Kokubo T. Recent progress in glass-based materials for biomedical applications. *J Ceram Soc Japan* 1991; 99:965-73.
- [7] Loty C, Sautier J, Boulekbache H, Kokubo T, Kim H, Forest N. In vitro bone formation on a bone-like apatite layer prepared by a biomimetic process on a bioactive glass-ceramic. *J Biomed Mater Res* 2000; 49(4):423-434.
- [8] Loty C, Sautier J, Berdal A, et al. The biomimetics of bone: engineered glass-ceramics a paradigm for in vitro biomineralization studies. *Connect Tissue Res* 2002; 43(2/3):524-528.
- [9] Oghushi H, Dohi Y, Tamai T, Tabata S, Okunaga K, Shobuya T. Osteogenic differentiation of cultured marrow stem cells on the surface of bioactive glass-ceramic. *J Biomed Mater Res* 1996; 32:341-348.
- [10] Daculsi G, LeGeros R, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcified Tissue Int* 1990; 46(1):20-27.
- [11] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials* 2006; 27(15):2907-2915.

The observed changes in pH and decline in calcium and phosphorus concentrations in the SBF are in agreement with the growth mechanism of an apatite layer on bioactive materials [20,21]. The presence of calcium and phosphorus ions in the local environment is the basic requirement for apatite formation. The concentration of these ions in the original SBF was nearly equal to those of human blood plasma ( $\text{Ca}^{2+}$  - 2.5 mM;  $\text{HPO}_4^{2-}$  - 1 mM). The hydroxyapatite, which dissolved in the first stage of experiment, was additional source of calcium and phosphorus ions for the apatite formation [22].

## Conclusions

Detailed characterization of the structure and composition indicates that examined CHAP-glucan composite form apatite on its surface in SBF. EDX spectra demonstrate increased content of calcium phosphate and diverse formation of apatite on biomaterial surface. SBF analysis proved loss of calcium and phosphorus ions during experiment. Therefore, this biomaterial is expected to have high biological affinity when implanted into bony defects, ability to stimulate the osteoblast proliferation and capacity to achieve tight bonding to living bone.

## Acknowledgements

The authors would like to acknowledge that the financial assistance for this research was provided by European Regional Development Fund within the Innovative Economy Operational Programme, grant No UDA-POIG 01.03.01-00-005/09-01 and by DS2/11 of Medical University in Lublin.

## References

- [12] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3, *J Biomed Mater Res* 1990; 24:721-734.
- [13] Belcarz A, Ginalska G, Ślósarczyk A, Paszkiewicz Z. Kompozyt bioaktywny oraz sposób wytwarzania kompozytu bioaktywnego. 2009; Polish Patent 387872.
- [14] Chang B, Lee C, Hong K, Youn H, Ryu H, Chung S, Park K. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 2000; 21(12):1291-1298.
- [15] Sopyan II, Mel MM, Ramesh SS, Khalid KA. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Sci Technol Adv Mater* 2007; 8(1/2):116-123.
- [16] Ślósarczyk A, Paszkiewicz Z, Zima A. The effect of phosphate source on the sintering of carbonate substituted hydroxyapatite. *Ceram Int* 2010; 36(2):577-582.
- [17] Baig AA, Fox JL, Wang Z, Su J, Otsuka M, Higuchi WI, Legeros RZ. Effect of carbonate content and crystallinity on the metastable equilibrium solubility behavior of carbonate apatite. *J Colloid Interf Sci* 1996; 179:608-617.
- [18] Na K, Park K, Kim S, Bae Y. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). *J Control Release* 2000; 69(2):225-236.
- [19] Kim BS, Jung ID, Kim JS, Lee JH, Lee IY, Bok K. Curdlan gels as protein drug delivery vehicles. *Biotechnol Lett* 2000; 22:1127-1130.
- [20] Neuman W, Neuman M. The chemical dynamics of bone mineral. Chicago: University of Chicago Press, IL, 1958.
- [21] Suzuki T, Hatsushika T, Hayakawa Y. Synthetic hydroxyapatites employed as inorganic cation-exchangers. *J Chem Soc Faraday T* 1981; 77:1059-1062.
- [22] Gu Y, Khor K, Cheang P. In vitro studies of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti-6Al-4V composite coatings in simulated body fluid (SBF). *Biomaterials* 2003; 24(9):1603-1611.

# STRUKTURA I WŁASNOŚCI MECHANICZNE MODYFIKOWANYCH STOPÓW CoCrMo DO ZASTOSOWAŃ W PROTETYCE STOMATOLOGICZNEJ

KAROLINA BEER, MARIUSZ WALCZAK

KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,  
WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
POLITECHNIKA LUBELSKA  
E-MAIL: KBEER@WP.PL, M.WALCZAK@POLLUB.PL

## Streszczenie

Większość klinicznych niepowodzeń w przypadku protez stomatologicznych związana jest przede wszystkim z techniką wytapiania i odlewania oraz ilością użytego do wsadu stopu już raz przetopionego. W pracy dokonano analizy wpływu ilości materiału z recyklingu na właściwości mechaniczne i strukturę stomatologicznego stopu CoCrMo. Zastosowano metodę odlewania odśrodkowego, oraz jednokrotne przetopy o składzie wyjściowym odpowiednio 0, 25, 50, 75 i 100% złomu. Przeprowadzono statyczną próbę rozciągania, pomiar mikrotwardości, analizę mikrostrukturalną oraz obserwację SEM przelomów. Stwierdzono, że własności mechaniczne wszystkich przetapianych stopów są gorsze niż stopu czystego, zakupionego u zagranicznego producenta. Mikrostruktura przelomów przetapianych stopów z zawartością złomu powyżej 50% jest bardziej niejednorodna i w strukturze dendrytycznej widoczna jest większa ilość mikropęknięć. Podczas zrywania próbek zarejestrowano wyraźne obniżenie granicy plastyczności i wytrzymałości tych stopów w próbach zrywania w porównaniu z próbkami ze stopów zawierających mniejszą ilość materiału z recyklingu.

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 110-115]

## Wprowadzenie

Właściwości materiałowe stosowanych uzupełnień protetycznych stałych i ruchomych (uzyskanych w procesie przetapiania) oraz ich konstrukcja mają istotny wpływ na trwałość w warunkach złożonego stanu obciążeń biomechanicznych. Obciążenia mechaniczne występujące podczas żucia są w głównej części odpowiedzialne za uszkodzenia i niepowodzenie leczenia protetycznego. Podstawowym technicznym miernikiem odporności konstrukcji protetycznej na uszkodzenie jest jej wytrzymałość mechaniczna. Ponadto, jak wskazują dane literaturowe oraz praktyka lekarzy stomatologów, na jakość uzupełnień protetycznych może wpływać również stosowanie do odlewania materiałów powtórnie przetopionych [1-8]. W protetyce często wykorzystuje się metale lub ich stopy, które już raz były użyte w procesie odlewania (np. kanały odlewowe) lub stanowią pozostałości po obróbce protetycznej. Jest to bardzo częsty sposób na dodatkowe obniżenie kosztów w pracowniach protetycznych. Dane literaturowe wskazują, że właściwości ponownie przetopionych stopów (z recyklingu) mogą różnić się od stopów fabrycznie nowych, ale zdania autorów prac badawczych prezentowanych w literaturze są podzielone [5-9].

# STRUCTURE AND MECHANICAL PROPERTIES OF MODIFIED CoCrMo ALLOYS FOR USE IN DENTAL PROSTHETICS

KAROLINA BEER, MARIUSZ WALCZAK

DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE,  
MECHANICAL ENGINEERING FACULTY,  
TECHNICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, POLAND  
E-MAIL: KBEER@WP.PL, M.WALCZAK@POLLUB.PL

## Abstract

*The majority of clinical failures in the case of dental prostheses is associated primarily with the technique and the amount of remelted alloy used for the casting. The majority of clinical failures in the case of dental prostheses is associated primarily with the technique of remelting and casting, and quantity of the once remelted alloy used for the batch. The paper analyzes the impact of the amounts of recycled material on the mechanical properties and structure of dental alloy CoCrMo. The centrifugal casting method has been applied and remelted alloys with output composition of 0, 25, 50, 75 and 100% of scrap respectively. The static tensile test, microstructural analysis and SEM observation as well as microhardness test have been conducted. These all tests show that the mechanical strength of all remelted alloys is worse than the strength of the fine alloy, purchased from a foreign manufacturer. The microstructure of breakthroughs of the remelted alloys containing more than 50% of scrap is more heterogeneous and a higher amount of microcracks is visible in the dendritic structure. When the samples were tested in the static tension test, the significant decrease in the yield strength and the tensile strength of these alloys during these static tension tests in comparison to the samples of alloys containing lower amount of the recycled material were observed.*

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 110-115]

## Introduction

Material properties of used permanent and mobile restorations (obtained in the process of melting), and their design have a significant impact on the stability in case of complex biomechanical loads. Mechanical stresses occurring during chewing are mainly responsible for the damage and failure of prosthetic treatment. The basic technical measure of damage resistance of prosthetic structure is its mechanical strength. Moreover, as indicated by the published literature and the practice of dentists, the quality of the restorations may also affect the use of recycled materials for the casting of remelted alloys [1-8]. The prosthodontists often use metals or their alloys, which had already been used in the casting process (eg casting channels) or which are residues after prosthetic treatment. This is a very common way to reduce costs in the laboratory. Literature data indicate that the properties of remelted alloys (from recycling) can vary from brand new alloys, but opinions of the authors of the researches presented in the literature are divided [5-9].

Może zmieniać się skład chemiczny stopu wyjściowego oraz mogą powstawać fazy zmieniające właściwości mechaniczne stopu. Niektórzy uważają, iż zmiany właściwości stopu po kolejnych przetopieniach można pominąć, ponieważ nie są one istotne [10, 11]. Inni uważają, że zmiany te są na tyle niekorzystne, że nie należy używać pozostałości odlewniczych do ponownych przetopień [12]. Ponadto zmiany te mogą wpływać na odporność korozyjną stopu, a także na wytrzymałość połączenia z porcelaną dentystyczną [14, 15]. Większość autorów publikacji formułuje wnioski praktyczne, wiążące technologię z właściwościami mechanicznymi. Brak jest jednak jednoznacznego opisu i oceny zjawisk fizycznych wywołujących zmiany właściwości, na przykład powiązania procesu krzepnięcia i krystalizacji stopu ze zmianami w morfologii i jednorodności struktury.

Wielu producentów stopów dentystycznych dopuszcza stosowanie przetopów wtórnych ale z nie mniej niż 50% udziałem materiału nowego i z zastrzeżeniem, że cały materiał musi pochodzić z tej samej partii. Istnieje też grupa producentów, która nie dopuszcza materiałów powtórnie przetopionych, bądź nie podaje żadnych informacji dotyczących wykorzystania stopów dentystycznych uzyskanych z recyklingu. Powyższe fakty uzasadniają celowość podjętych badań, zmierzających do określenia wpływu stosowania wtórnych przetopów na właściwości mechaniczne i strukturalne uzyskanych odlewów.

## Material i metody

Do badań zastosowano stop Wironit®extra-hard firmy Bego o nominalnym składzie chemicznym (masowo) 63% Co, 30% Cr, 5% Mo, 1,1% Si oraz Mn<1% i C<1% [16]. Stop ten przeznaczony jest do odlewania protez szkieletowych, protez klamrowych i protez mocowanych na zasuwę, rygle i zatrzaski. Ze stopu CoCrMo wykonano odlewy stosując jednokrotne przetopy o składzie wyjściowym odpowiednio 0, 25, 50, 75 i 100% złomu. Odlewy wykonano metodą traconego wosku. Jako model bazowy zastosowano próbkę stalową o kształcie i wymiarach zalecanych w normie do statycznej próby rozciągania. Do badania zastosowano palcowe próbki o średnicy pomiarowej  $\varnothing$  3 mm i długości pomiarowej 15 mm.

Stopione indukcyjnie wsady odlewane były metodą odśrodkową w wirówce ROTOCAST. Po usunięciu masy osłaniającej i odcięciu materiału z układu wlewowego powierzchnię próbek piaskowano. Cały proces wykonania próbek ze stopu CoCrMo przeprowadzony był w warunkach profesjonalnej pracowni protetycznej według procedur stosowanych do wytwarzania metalowych elementów protez szkieletowych.

## Metodyka badań

Statyczną próbę rozciągania przeprowadzono w oparciu o normę PN EN 10002-1, na serwohydraulicznej maszynie wytrzymałościowej MTS 858 MiniBionix. Badania rozciągania realizowano z posuwem 25  $\mu$ m/s w całym zakresie obciążenia. Pomiary twardości wykonano na mikrotwardościomierzu Vickers'a FM-700 z automatycznym systemem FM-ARS 900 firmy Future-Tech Corp. przy obciążeniu 0,5 kg na zglądach poprzecznych i wzdłużnych. Wykonano po 20 pomiarów mikrotwardości dla każdej z kombinacji próbek.

Mikrostrukturę przełomów i zglądów obserwowano (badano) przy użyciu mikroskopu optycznego Nikon MA200 i skaningowego Carl Zeiss Ultra Plus z mikroanalizatorem EDX firmy Brucker.

The chemical composition of the output alloy may change and phases changing the mechanical properties of the alloy may be generated. Some believe that changes in the properties of the alloy after successive remeltings can be omitted, since they are not too important [10, 11]. The others perceive them as being so negative that they do not recommend to use any residues for re-castings [12]. Furthermore, these changes may affect the corrosion resistance of the alloy, as well as the bond strength of dental porcelain [14, 15]. Most writers draw practical conclusions, binding technology with mechanical properties. There is however lack of a clear description and evaluation of physical phenomena that cause changes in properties, for example, links among the alloy solidification process, and thus the crystallization method with changes in morphology and heterogeneity of the structure.

Many dental alloys manufacturers permit the use of remelted alloys but not less than 50% share of the new material and provided that all material must come from the same batch. There is also a producer group, which does not allow re-melted materials or not share any information on the use of dental alloys derived from recycling. These facts justified the usefulness of the present study aimed to determine the impact of use of the remelted alloys on the mechanical and structural properties in obtained castings.

## Materials and methods

Alloy used for the tests - Wironit®extra-hard from Bego company with a nominal chemical composition (by mass) 63% Co, 30% Cr, 5% Mo, 1.1% Si, and Mn <1% and C <1% [16]. This alloy is used for casting dentures, braces and prostheses anchored on the latches, bolts and hinges.

The castings were made from the CoCrMo alloy using a disposable alloy with a starting output composition of 0, 25, 50, 75 and 100% scrap. Castings were made using lost wax. As a base model a sample of steel was used in shape and dimensions being applicable for a static tension test. The study used cylindrical samples with a measuring diameter  $\varnothing$  3 mm and 15 mm gauge length.

Induction melted batches were cast by centrifugal separator device ROTOCAST. After removing the investment material and cutting off the material from the gating system the surface of samples was blasted. The whole process of implementation of the CoCrMo alloy samples was carried out in a professional dental laboratory according to procedures used in the manufacture of metal partial dentures.

## Research methodology

Static tensile test was carried out based on the standard EN 10002-1, on the MTS testing servo hydraulic machine MiniBionix 858. Tensile tests were carried out with a feed rate of 25  $\mu$ m/s over the entire load. Hardness measurements were performed on a micro hardness testing machine Vickers FM-700 FM with an automatic 900-ARS's Future-Tech Corp. system with a load of 0.5 kg per transverse and longitudinal metallographic specimen. 20 microhardness measurements were taken for each combination of samples.

Microstructural observations on breakthroughs and metallographic specimen were made using a Nikon MA200 optical microscope and Carl Zeiss Ultra Plus scanning microscope with EDX microanalyzer by Brucker.

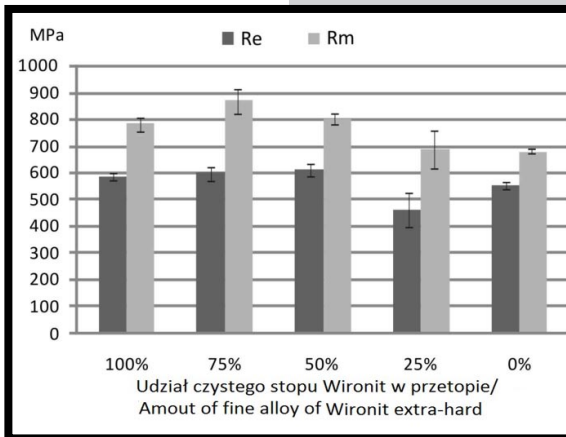
Na podstawie wykonanych prób zrywania wyznaczono następujące parametry charakteryzujące własności wytrzymałościowe badanych przetopów (stopów): moduł Younga  $E$ , współczynnik Poissona  $\nu$ , umowną granicę plastyczności  $R_{e02}$  oraz wytrzymałość na rozciąganie  $R_m$ . Współczynnik Poissona osiąga wartości od 0,26 dla odlewu z materiału nowego do 0,29 dla materiału wykonanego w 100% z recyklingu. Moduł Younga wynosi średnio 199 GPa. Wyniki  $R_e$  i  $R_m$  zestawiono na wykresie (RYS. 1). Wielkości te są niższe niż  $R_m = 910$  MPa,  $R_{e02} = 625$  MPa deklarowane przez producenta. Obserwuje się spadek wytrzymałości na rozciąganie oraz granicy plastyczności badanych próbek. Wytrzymałość na rozciąganie wykazuje maksimum dla składu 75% materiału nowego, ale i tak jest to wartość poniżej deklarowanej. Dla odlewów do 50% udziału złomu otrzymane różnice w wielkościach pomiarowych są niewielkie i nie przekraczają 5%. Natomiast przy zwiększeniu udziału procentowego złomu w odlewie powyżej 50% obserwuje się znaczący spadek wartości  $R_{e02}$  oraz  $R_m$  (RYS. 1).

Twardość przetopów średnio osiąga wartość 386 HV10 i jest zbliżona do deklarowanej przez producenta 375 HV10, natomiast pomiary mikrohardości wskazują na niejednorodność makrostruktury i różnice na poziomie mikrostruktury. Obserwowany wzrost mikrohardości materiałów z dodatkiem złomu może wynikać stąd, że podczas przetopów w temperaturze około 1473 K dochodzi do przemiany węgla  $M_{23}C_6$  na  $M_6C$  (węgiel  $M_6C$  ma wyższą twardość niż  $M_{23}C_6$ ) [17]. Dlatego, w przypadku stopów powtórnie przetopionych, zawartość węglików  $M_6C$  w stopie prawdopodobnie wzrasta, ale wymaga to potwierdzenia badaniami składu fazowego.

Analiza mikrostrukturalna odlewanych stopów CoCrMo z materiału nowego charakteryzuje się typową, gruboziarnistą strukturą dendrytyczną (RYS. 2a) z niewielką ilością mikroporów. W obrębie krystalitów występują mikrosegregacje dendrytyczne, w przestrzeniach międzydendrytycznych i wzdłuż granic krystalitów rozmieszczone są wydzielienia pierwotne o charakterze ciągłym oraz mikro-nieciągłości (RYS. 2b). Odlewy z udziałem złomu charakteryzują się podobną mikrostrukturą (RYS. 2c,d). Nie zaobserwowano wtrąceń, które mogłyby pochodzić z zanieczyszczenia wsadu cząstkami materiału osłaniającego.

Obserwacje przełomów po próbie rozciągania wykazały różnice w strukturze odlewów. W próbkach stopów odlanych z czystego stopu Wironit makrostruktura na całym obszarze przełomu wykazuje jednorodny charakter (RYS. 3a). Natomiast próbki stopu zawierającego materiał z recyklingu wykazują niejednorodny przełom, z coraz wyraźniejszym pękaniem wzdłuż dendrytów ułożonych dośrodkowo (RYS. 3 b,c).

Analiza SEM przełomów uwidoczniła mikropęknięcia powstające zgodnie z ukierunkowaniem dendrytów, o gęstości rosnącej z udziałem materiału z recyklingu (RYS. 4). Wraz ze wzrostem udziału procentowego złomu obserwuje się wzrost nieciągłości strukturalnych w postaci mikroporów i rzadzisz. Wady odlewnicze w postaci nieciągłości materiałowych można traktować jako mikrokarby wywołujące spiętrzenie naprężeń w obszarach występowania, przyczyniające się do obniżenia wytrzymałości.



**RYS. 1. Porównanie granicy plastyczności  $R_e$  i wytrzymałości na rozciąganie  $R_m$  stopów z różnym udziałem procentowym czystego stopu Wironit<sup>®</sup>extra-hard.**

**FIG. 1. The comparison of the yield strength  $R_e$  and tensile strength  $R_m$  with varying percentage of a fine alloy Wironit<sup>®</sup>extra-hard.**

On the basis of the static tension tests the following values determining the strength properties of the tested remelted alloys (alloys) have been estimated: Young's modulus  $E$ , Poisson's ratio  $\nu$ , conventional yield strength  $R_{e02}$  and tensile strength  $R_m$ . The results show that the Poisson's ratio is equal to 0.26 - for casting from a fine material; to 0.29 for 100% recycled material. The Young's modulus  $E$  is on average 199 GPa. The  $R_m$  and  $R_e$  results are shown on graph (FIG. 1). These values are lower than  $R_m = 910$  MPa,  $R_{e02} = 625$  MPa declared by the manufacturer. There is a decrease in tensile strength and yield strength of test specimens. The tensile strength shows a maximum for the composition of 75% new material, but it is still below the specified value. For castings of up to 50%

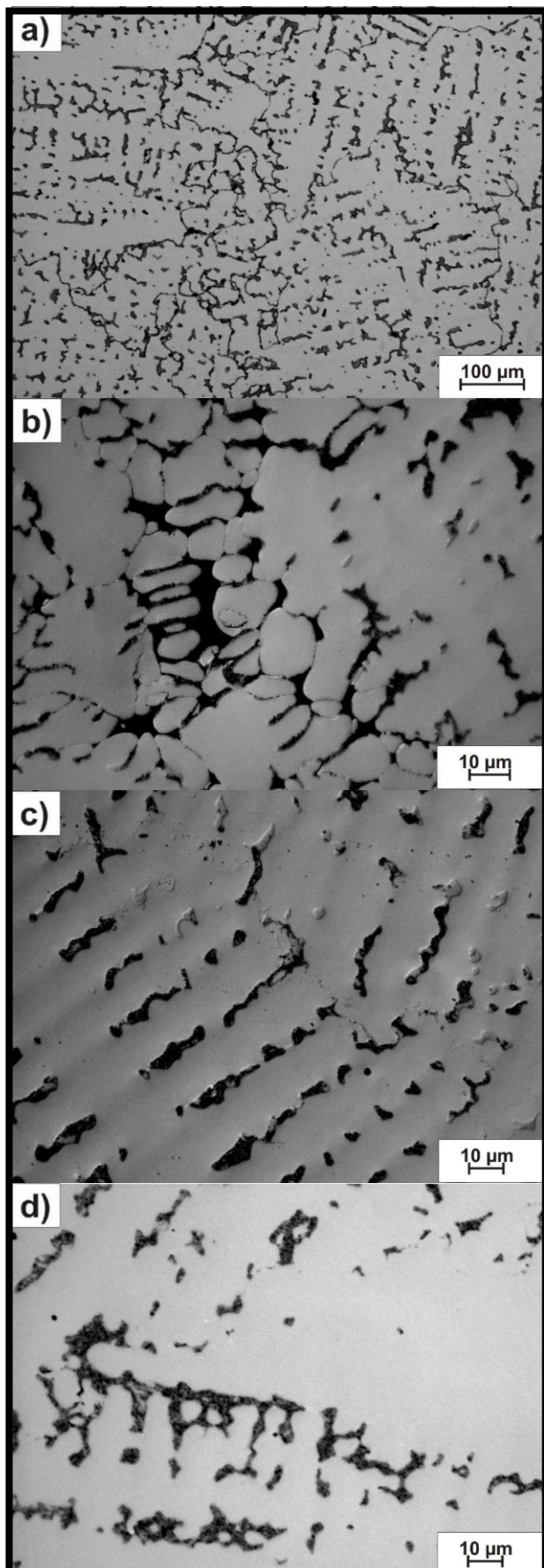
of the scrap obtained measuring the differences in sizes are small and they do not exceed 5%. However, along with the increase in the percentage of scrap in the casting of more than 50% a significant decline in the value  $R_{e02}$  and  $R_m$  has been observed (FIG. 1).

The measured average hardness reaches 386 HV10 and is similar to that specified by the manufacturer 375 HV10, whereas microhardness measurements indicate the heterogeneity of the macrostructure and differences at the level of microstructure. The observed increase in microhardness with the addition of scrap material comes most likely from the fact that while various castings at ca 1473 K comes to the transformation of carbide  $M_{23}C_6$  on  $M_6C$  (carbide  $M_6C$  has a higher hardness than  $M_{23}C_6$ ) [17]. Thus, in the case of remelted alloys, the participation of  $M_6C$  carbides in the alloy increases, but it requires a composition confirmation testing phase.

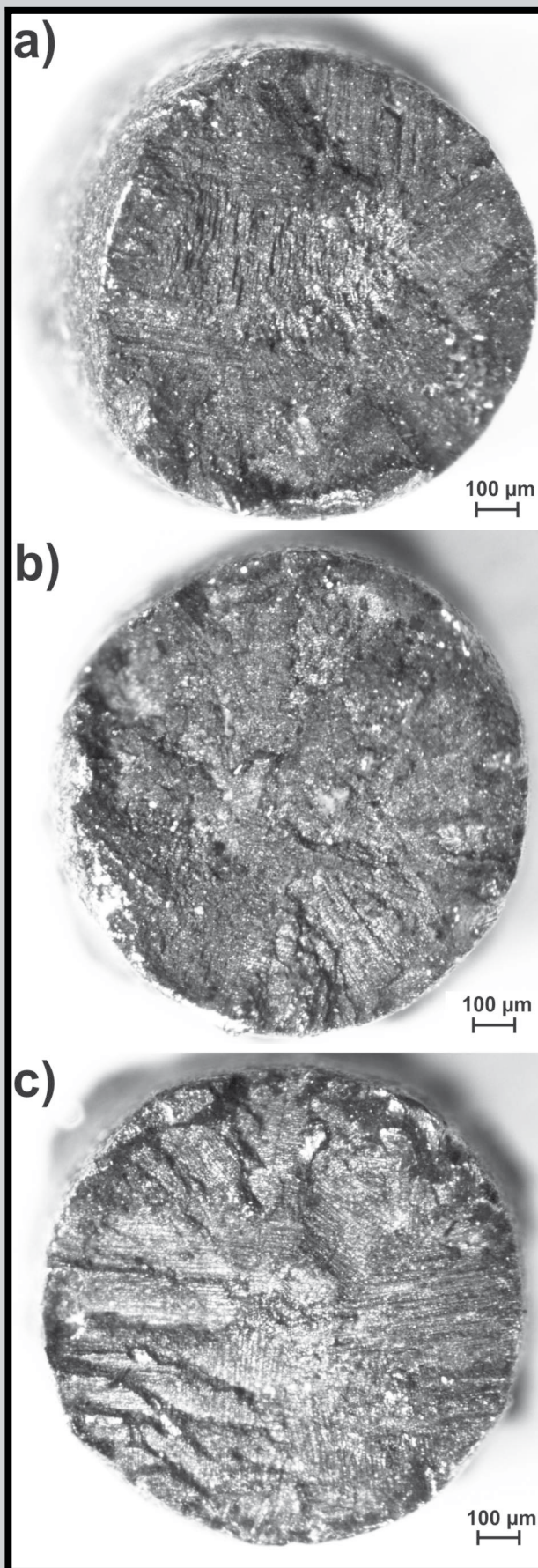
Microstructural analysis of cast CoCrMo alloy material is characterized by the typical new, relatively coarse dendritic structure (FIG. 2a) with a small amount of micropores. Within the crystallites are dendritic microseggregations, in the interdendritic regions along the borders of crystallites are arranged primary continuous precipitations and micro discontinuities (FIG. 2b). The castings with scrap participation demonstrate similar structure (FIG. 2c,d). There were no inclusions, which could come from contamination of the material with particles of the investment material.

Observations of fracture after tensile test also showed differences in the structure of castings. In samples of alloys casted from a fine Wironit alloy the macrostructure throughout the whole area of fracture is heterogeneous (FIG. 3a). The alloy containing the material from recycling show a heterogeneous fracture, with ever clearer cracking centripetally arranged along the dendrites (FIG. 3b,c).

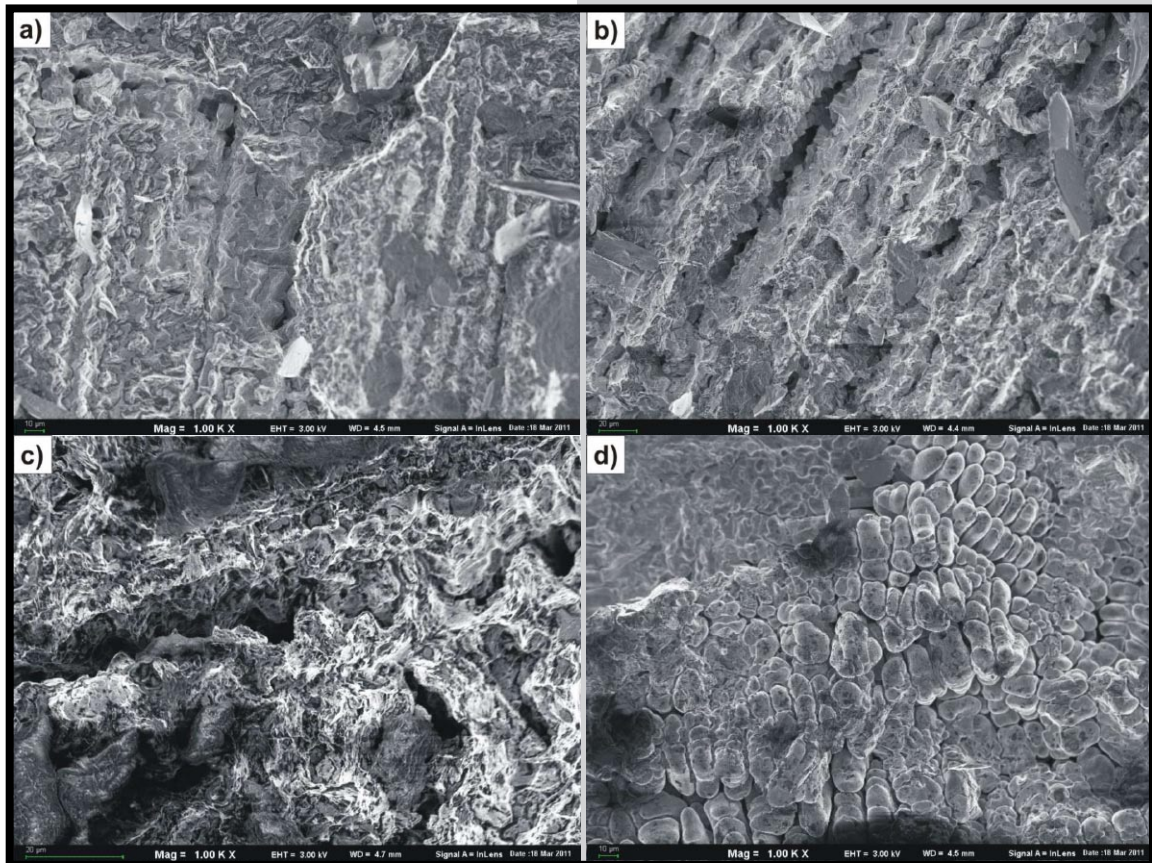
SEM analysis revealed microcracks according to the orientation of dendrites with density increasing along with recycled material (FIG. 4). With the increase in the percentage of scrap structural discontinuities in the form of micropores and microshrinkages are increasing. Casting defects in the form of discontinuities in materials can be treated as micronotches causing accumulation of stresses in areas of prevalence, contributing to reduction in strength.



**RYS. 2.** Mikrostruktura odlewów: a) i b) przetopiony Wironit - 100% czystego materiału, c) przetop z udziałem 25% złomu, d) przetop z udziałem 50% złomu.  
**FIG. 2.** Microstructure of casts: a) and b) remelted Wironit - 100% of the fine material, c) alloy with 25% of scrap d) alloy with 50% of scrap.



**RYS. 3.** Struktura przełomów stopów po teście wytrzymałości na rozciąganie: a) 100% Wironitu, b) z udziałem 25% złomu, c) z udziałem 50% złomu.  
**FIG. 3.** Breakthroughs of alloys after tensile test: a) 100% new material, b) with 25% scrap, c) with 50% scrap.



**RYS. 4.** Mikrostruktura SEM przełomów stopów odlewniczych o różnym udziale materiału z recyklingu po próbach zrywania: a) 100% nowego materiału, b) 25% złomu, c) i d) 50% złomu; widoczne pęknięcia oraz rzadzizny i mikropory.

**FIG. 4.** SEM microstructure of the breakthroughs of the casting alloys with varying involvement of recycled material after static tension test: a) 100% of a new material, b) 25% scrap, c) and d) 50% scrap, visible cracks, microshrinkages and micropores.

## Posumowanie i wnioski

Na podstawie badań własności mechanicznych stwierdzono, że granica plastyczności i wytrzymałość na rozciąganie wszystkich przetapianych stopów są niższe niż średnie wartości  $R_m$  i  $R_{02}$  stopu Wironit deklarowane przez producenta. Zwiększenie udziału procentowego złomu w odlewach powyżej 50% powoduje znaczący spadek wartości  $R_m$  i  $R_{02}$ , a co za tym idzie znaczne obniżenie właściwości wytrzymałościowych. Przetapiane stopy z większą ilością materiału z recyklingu mają bardziej niejednorodną strukturę oraz wykazują większą skłonność do kruchego pęknięcia. Przełomy po próbach zrywania mają charakter kruchy, z wyraźnie widoczną strukturą dendrytyczną. Na fotografiach mikrostruktury obserwowanej przy użyciu mikroskopu skaningowego widoczne są wady materiałowe odlewów w postaci mikroporów, rzadzizn i pęknięć. Planowane są dalsze badania celem określenia, czy przyczyną pogorszenia jakości stopów przetapianych jest niewłaściwa technologia przygotowania formy odlewniczej, czy gorsze parametry zmiany parametrów stopu zawierającego materiał z recyklingu. Konieczne jest przeprowadzenie badań składu fazowego przetapianych stopów oraz sprawdzenie możliwości ujednorodnienia struktury poprzez zastosowanie odpowiedniej obróbki cieplnej w celu poprawienia własności wytrzymałościowych odlewów. Z przeprowadzonych badań wynika, że dodanie do czystego stopu Wironit złomu z recyklingu w ilości nie przekraczającej 50% nie powoduje wyraźnego pogorszenia jakości otrzymanych odlewów i ze względów ekonomicznych można by taką technologią stosować w praktyce wykonywania protez stomatologicznych.

## Summary and conclusions

On the base of the study it has been pointed out that the yield strength and the tensile strength of all alloys is lower than the average values  $R_m$  i  $R_{02}$  of Wironit alloy declared by the manufacturer. The increase of contribution percentage of scrap in castings of more than 50% of the recycled contribution causes a significant decrease in the  $R_m$  i  $R_{02}$  values and thereby substantially reduces the strength properties. Remelted alloys with a higher amount of the recycled material have more inhomogeneous structure and are more prone to brittle fracture. The breakthroughs after the static tension tests have clearly visible dendritic structure. In the pictures of the microstructure taken by means of the scanning microscope are visible material failures in shape of micropores, microshrinkages and cracks. Further studies are planned to determine whether their cause is just the wrong mold technology or worse parameters, change of the parameters of an alloy containing material from the remelted casting. It is necessary to carry out a detailed phase analysis of cast materials and to check the possibility of a structure heterogeneous by means of application of a proper heat treatment in order to improve the properties of the durable castings. The conducted researches indicate that if you add to a fine Wironit alloy a scrap from recycling in the amount of not more than 50% it will not significantly affect the quantity of the obtained castings and from economic reasons this technology could be applied in practice of dental prostheses manufacturing process.

## Podziękowania

*Autorzy artykułu są wdzięczni dr n. med. Januszowi Borowiczowi z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie za pomoc w realizacji badań.*

## Acknowledgements

*The authors of the article are grateful to Janusz Borowicz – PhD of Medicine from Medical University of Lublin for help with realization the researches.*

## Piśmiennictwo

- [1] Strietzel R.: Ponowne odlewanie stopów dentystycznych, *Dental-labor*, 4/2000, s. 3-6.
- [2] Peraire M., Martinez-Gomis J., Anglada J.M., Bizar J., Salsench J., Gil F.J.: Effects of Recasting on the Chemical Composition, Microstructure, Microhardness, and Ion Release of 3 Dental Casting Alloys and Titanium, *The International Journal of Prosthodontics*, 20, 2007, pp. 286-288.
- [3] Majewski S., Opoka W., Gacek S.: Właściwości stopu ćwiczebne-go w zależności od postaci składników wyjściowych i wielokrotności odlewów, *Protetyka Stomatologiczna*, XLI, 4, 1991, s. 192-198.
- [4] Ozyegin L.S., Tuncer R., Avci E.: Hardness, Behavior and Metal Surface Evaluation of Recasting Non-Precious Dental Alloys, *Key Engineering Materials*, 330-332, 2007 pp. 1425-1428.
- [5] Horasawa N., Marek M.: The effect of recasting on corrosion of a silver-palladium alloy, *Dental Materials*, 20, 2004, pp. 352-357.
- [6] Hajduga M., Puchalik A., Oszacowanie przydatności stopu Heraenium NA po przetopieniu w kontekście badań strukturalnych, *Nowoczesny Technik Dentystyczny*, 3, 2009 s. 56-60.
- [7] Bauer J., Cella S., Pinto M.M., Costa J.F., Reis A., Loguercio A.D.: The use of recycled metal in dentistry: Evaluation of mechanical properties of titanium waste recasting, *Resources, Conservation and Recycling*, 54, 2010, pp.1312-1316.
- [8] Al-Ali A.A., Evaluation of Macrohardness of Recasted Cobalt-Chromium Alloy, *Al-Rafidain Dent J.*, 7(1), 2007, pp. 111-117.
- [9] Henriques Guilherme E.P., Consani S., de Almeida Rollo João M.D., Andrade e Silva F.: Soldering and remelting influence on fatigue strength of cobalt-chromium alloys, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 78, 1997, pp. 146-152.

## References

- [10] Khamis E., Seddik M.: Corrosion evaluation of recasting non-precious dental alloys, *International Dental Journal*, 45, 1995, pp. 209-217.
- [11] Ozdemir S., Arikan A.: Effects of recasting on the amount of corrosion products released from two Ni-Cr base metal alloys, *Eur. J. Prosthodont. Rest. Dent.*, 1998, 6, pp. 149-153.
- [12] Ameer M.A., Khamis E., Al-Motlaq M.: Electrochemical behaviour of recasting Ni-Cr and Co-Cr non-precious dental alloys, *Corrosion Science*, 46, 2004, s. 2825-2836.
- [13] Pierzynka R., Marciniak S., Klimek L., Wpływ liczby przetopień na właściwości mechaniczne stopu DUCINOX, *Nowoczesny Technik Dentystyczny*, 2, 2010 s. 22-24.
- [14] Ucar Y., Aksahin Z., Kurtoglu C.: Metal Ceramic Bond After Multiple Casting of Base Metal Alloy, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 102, 2009, pp. 165-171.
- [15] Joias R.M., Tango R.N., Junho de Araujo J.E., Ferreira Anzaloni Saavedra Gde S., Paes-Junior T.J., et al.: Shear bond strength of ceramic to Co-Cr alloys, *J. Prosthet. Dent.*, 99, 2008, pp. 54-59.
- [16] [www.bego.com](http://www.bego.com) - Strona firmy Bego, 27 luty 2011.
- [17] Mineta S., Namba S., Yoneda T., Ueda K., Narushima T.: Carbide Formation and Dissolution in Biomedical Co-Cr-Mo Alloys with Different Carbon Contents during Solution Treatment, *Metallurgical and Materials Transactions A*, 41(8), 2010, pp. 2129-2138.

# KOMPOZYTY Z KRÓTKIMI WŁÓKNAMI NA OSNOWIE POLIAMIDU Z SUROWCÓW ODNAWIALNYCH NA ELEMENTY STABILIZATORÓW MEDYCZNYCH

MARTA SROKA\*, GABRIELA PYKO, STANISŁAW KUCIEL

POLITECHNIKA KRAKOWSKA,  
ZAKŁAD MECHANIKI DOŚWIADCZALNEJ I BIOMECHANIKI  
AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKÓW

\* E-MAIL: MARTASROK@GMAIL.COM

## Streszczenie

*Kompozyty na osnowie polimerów konstrukcyjnych napełniane włóknami często wykorzystywane są na mniejsze elementy w konstrukcji stabilizatorów medycznych czy małych protez ze względu na ich małą masę i niską cenę, łatwość otrzymywania różnymi metodami przetwórstwa termoplastów oraz przenikalność promieni rentgenowskich. Dodatkowo możliwość zastosowania polimerów na wyprodukowanych z odnawialnych surowców oraz włókien lnu pozwala na stworzenie niezwykle ekologicznych, przyjaznych w użyciu i łatwych do utylizacji produktów. Przeprowadzone badania pokazały możliwość stosowania różnych włókien i przez to kształtowanie odpowiednich dla danego rozwiązania właściwości wytrzymałościowych. Kompozyty na osnowie poliamidu 11 z odnawialnych surowców charakteryzują się przy tym stabilnością właściwości mechanicznych oraz niską chłonnością wody.*

**Słowa kluczowe:** stabilizatory, kompozyty, polimery z surowców odnawialnych

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 116-119]

## Wprowadzenie

Współcześnie można zauważyć nowe trendy w sposobie doboru i wykonywania elementów sprzętu medycznego z tworzyw sztucznych. Powszechnym staje się zastępowanie elementów stalowych takich jak rurki, łączniki, pręty – wyrobami wytworzonymi ze stopów aluminium lub kompozytów węglowych czy szklanych na osnowie utwardzalnych żywic poliestrowych czy epoksydowych. Dotyczy to elementów o dużej wytrzymałości i sztywności. Elementy mniejsze lub mniej obciążone zastępowane są elementami z tworzyw termoplastycznych i kompozytami na ich osnowie [1,2]. Dodatkowym atutem mogą być tu osnowy z polimerów wytworzonych z surowców odnawialnych czy dodatek włókien naturalnych. Tłuszcze, oleje naturalne, biomasa i cukry można, po odpowiednim przetworzeniu wykorzystać w produkcji zarówno nowych tworzyw wytwarzanych przez bakterie, jak PHA, PLA czy modyfikowana skrobia, jak i do produkcji klasycznych polimerów jak poliamidy czy polietylen [3,4].

## Materiały i metody

W pracy dokonano wstępnej oceny możliwości wytworzenia kompozytów na osnowie poliamidu 11 otrzymywanego z naturalnych surowców na bazie oleju rycynowego i produkowanego od 2011 roku, przez chińską firmę Suzhou Hipro Polymers pod handlową nazwą Hiprolon 211.

# THE COMPOSITES WITH SHORT FIBERS BASED ON POLYAMIDE FROM RENEWABLE SOURCES FOR ELEMENTS OF EXTERNAL FIXATION SYSTEM

MARTA SROKA\*, GABRIELA PYKO, STANISŁAW KUCIEL

KRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF APPLIED MECHANICS AND BIOMECHANICS  
AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: MARTASROK@GMAIL.COM

## Abstract

*The composites based on engineering polymer filled with fibers are often used in construction of small elements of external fixation system or small prosthesis because of their low weight and good price, easy of manufacturing using different thermoplastic processing methods and its good radio-transparency (due to low crystallites). Moreover polymers based on renewable sources and flax fibers allow to create unusually ecologic and eco-friendly composites which are easy to utilize. Proceeded tests showed possibility of using different fibers as a fillers and design strength properties suitably to realized projects. Composites based on polyamide 11 from renewable sources have stable mechanical properties and low soaking of water.*

**Keywords:** fixation system, composites, polymer from renewable sources

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 116-119]

## Introduction

Nowadays, we all can notice new trends in selection and produce elements of polymer assistive medical devices: steel elements (tubes, connectors, barstocks, constructions) are being replaced by aluminum products, carbon or glass composite fabrications, with hardened epoxy or polyester resin ground mass due to their high durability and stiffness. Small or less loaded elements are being replaced by thermoplastic products or composites with thermoplastic matrix [1,2]. Polymer matrix from renewable resources or matrix with natural fibers is another advantage that applies to them. Fats, natural oils, biomass and sugars after proper treating can be used in new plastics processed by bacteria as PHA, PLA or modified starch and also to production of conventional polymer like polyamides or polyethylene [3,4].

## Materials and methods

This work is aimed at presenting preliminary assessment of the possibility to produce composites based on polyamide 11 obtained from natural resources on basis of castor oil. It should be pointed out that the above-mentioned polyamide has been produced by Chinese company Suzhou Hipro Polymers since 2011. This polyamide is known as Hiprolon 211. Following polymer is characterized by long chains, low water absorption and high dimensional stability.



Jest to polimer o długich łańcuchach, niskiej chłonności wody i dużej stabilności wymiarowej. Dla oceny jego możliwości modyfikacji krótkimi włóknami z przeznaczeniem do uzyskiwania wyrobów metodą wtryskiwania, wytworzono techniką kompauowania z polimerową osnową kompozyty o udziale 10% włókien:

- lnu w postaci pociętego nisko skręconego rovingu o średnicy włókna 20  $\mu\text{m}$  i przeciętnej długości 120  $\mu\text{m}$ , produkcji firmy Safilin Sp. z o.o.,
- szklanych o średnicy 10  $\mu\text{m}$ ,
- węglowych CF 2 o średnicy 8  $\mu\text{m}$ , produkcji amerykańskiej.

Standardowe próbki wiosełkowe wytworzono metodą wtrysku w zakładach Azotowych w Tarnowie przy użyciu wtryskarki Engel ES 200/40 HSL. Parametry procesu wtrysku były następujące: temperatura wtrysku 205°C, temperatura formy 50°C, ciśnienie wtrysku 80 MPa, czas cyklu 25 s (czas chłodzenia 20 s).

Wykonano badania podstawowych właściwości wytrzymałościowych kompozytów oraz ocenę ich zmienności podczas moczenia w wodzie. Zdjęcia mikrostruktury zostały wykonane na przełomach próbek po rozciągnięciu przy użyciu mikroskopu skaningowego JOEL JSN5510LV z zapisem cyfrowym. Statyczną próbę rozciągania przeprowadzono przy użyciu maszyny wytrzymałościowej MTS Insight zgodnie z normą PN - EN ISO 527-1 dla próbek przed i po moczeniu w wodzie, której chłonność oznaczono zgodnie z PN-EN ISO 62:2000. Wyznaczono wytrzymałość na rozciąganie -  $\sigma_z$ , moduł sprężystości - E i odkształcenie przy zerwaniu -  $\epsilon_z$  dla próbek kondycjonowanych po wtrysku oraz po 30 dniowej inkubacji hydrolytycznej. Oznaczono również gęstość, temperaturę mięknięcia Vicata oraz dodatkowo porównano wytworzone kompozyty z dotychczas stosowanymi (referencyjnymi) na osnowie tradycyjnych polimerów z 10% udziałem włókna węglowego: PA 6 – Tarnamidu oraz POM – Tarnoformu.

## Wyniki i dyskusja

W TABELI 1 przedstawiono składy wytworzonych kompozytów, ich oznaczenia oraz wyniki pomiaru gęstości oraz temperatury mięknięcia Vicata.

Na RYS. 1 na obrazach przełomów po rozciągnięciu widzimy pojedyncze włókna lnu, szklane i węglowe zakotwiczone w poliamidowej osnowie. Obserwujemy dobrą wytrzymałość włókien – wszystkie pękają w poprzek przełomu oraz zmianę charakteru przełomu z bardziej kruchego dla kompozytu z włóknami lnu na bardziej ciągliwy dla tego z dodatkiem włókien węglowych, spowodowana prawdopodobnie zmniejszeniem średnicy włókna.

Na RYS. 2 pokazano wyniki oznaczania chłonności wody badanych kompozytów po 1, 7 i 30 dniach moczenia w wodzie. Na RYS. 3-5 porównano wpływ 30 dniowego moczenia w wodzie na podstawowe właściwości wytrzymałościowe oznaczane w próbie rozciągania. Kompozyty na osnowie Hiprolonu charakteryzują się niską porównywalną do tych na bazie POM chłonnością wody.

Obserwujemy nieznaczny wzrost wytrzymałości na rozciągnięcie dla kompozytów z włóknami lnu i szklanymi przy znaczącym wzroście ich modułów sprężystości oraz niewielkim spadku odkształcalności. Kompozyty z włóknem węglowym charakteryzują się najlepszymi właściwościami wytrzymałościowymi. Powszechnie stosowany kompozyt na osnowie poliamidu 6 charakteryzuje się dużą chłonnością wody i po 30 dniach jego wytrzymałość i moduł spadają do poziomu utrzymywanego przez kompozyt na osnowie poliamidu 11 z odnawialnych surowców. Po inkubacji w wodzie kompozyt PAW traci 30% wytrzymałości i 50% swojego modułu sprężystości.

To estimate possibilities of their modification by short fibers in order to make injection molding parts mixed polymer with fibers in compounding extrusion machine preparing 10 wt% composites with following fibers:

- flax as cut and low twisted roving; diameter of the fiber: 20  $\mu\text{m}$ , average length 120  $\mu\text{m}$ ; production: Safilin Sp. z o.o.,
- fiberglass with a diameter of 10  $\mu\text{m}$ ,
- carbon fiber CF 2 with a diameter of 8 mm; American production.

Standard dumbbell type specimens (10 x 4 x 150 mm) were produced by injection moulding in Zakłady Azotowe in Tarnow using Engel ES 200/40 HSL. The parameters of the injection process for biopolymer BC-LBI01 were the following: injection temperature 205°C, mold temperature 50°C, injection pressure 80 MPa, cycle time 25 s (cooling time 20 s). Influence of soaking in water on basic strength properties of following composites was executed. SEM images were taken on fracture after tensile test on scanning microscope with a digital recording (JOEL JSN5510LV). Mechanical properties were estimated by a tensile test according to PN-EN ISO 527, on a universal testing machine (Insight 50 MTS with MTS axial extensometer) with a constant crosshead speed of 10 mm/min. Elastic modulus (E), tensile strength ( $\sigma_z$ ) and strain at break ( $\epsilon_z$ ) were determined. Materials density was measured by hydrostatic method. Sorption of water (20°C) was calculated after 1, 7 and 30 days of soaking, according to PN-EN ISO 62:2000. To determinate hydrolytic degradation, tensile test was performed again after the 30 days incubation. Finally, it was possible to determine density and Vicat softening point. Following composites were compared to the commonly used (reference) composites based on petrochemical polymers reinforced by 10 wt% of carbon fibers: PA 6 – Tarnamid and POM – Tarnoform.

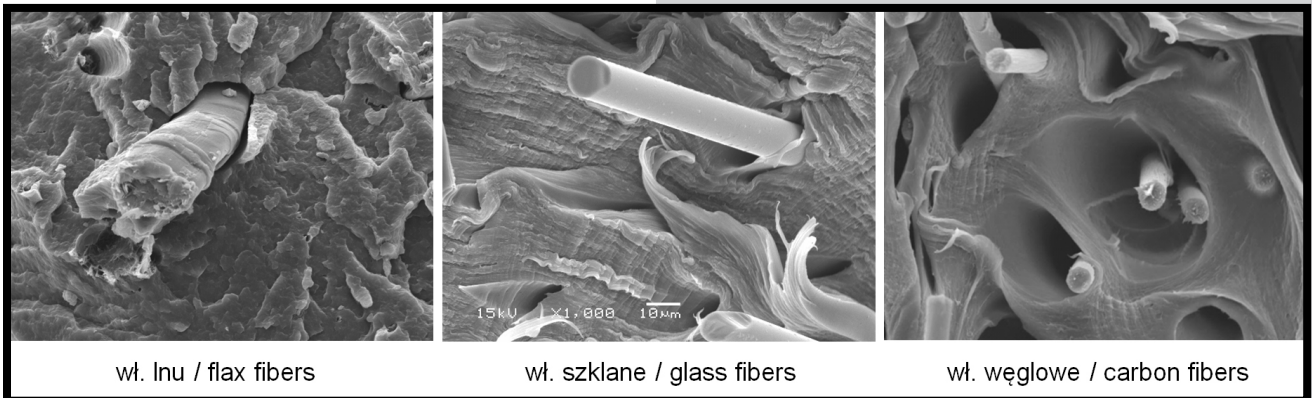
## Results and discussion

TABLE 1 presents weight ratio of obtained composites, their description, results of density test and measuring of Vicat softening temperature. FIG. 1 shows the SEM images of the fracture of composites after tensile. Simple flax fiber, glass and carbon on polyamide matrix can be observed. Good mechanical strength as a results of break all fibers across the fracture and it's changing character from brittle for flax fibers to more ductile for composites with carbon fibers can be evaluated. It's probably as an effect of reducing of fibers diameter.

Results of sorption of water after 1, 7 and 30 days incubation in water are presented in FIG. 2. Influence of soaking in the water for basic strength properties calculated in elongation tests is presented in FIGs 3-5. Lower water sorption than composites on POM matrix base characterizes composites based on Hiprolon 211. Insignificant increase of material's strength for composites with flax and glass fibers considerate with appreciable increasing of elasticity modulus and low decrease of elongation at break can be observed. Carbon fibers composites have the best strength properties. Conventional composites on polyamide 6 matrix has a great water sorption and after 30 days soaking their strength properties falls down to a level established for composites based on polyamide 11 from renewable sources. After incubation PAW loses 30% of strength and 50% of modulus, so it is not justified to use them as fixation system.

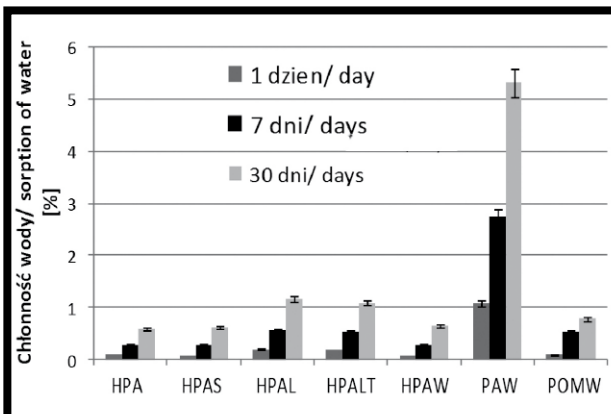
**TABELA 1. Rodzaje badanych kompozytów, ich skład, gęstość i temperatura mięknięcia Vicata.**  
**TABLE 1. The sorts and composition of tested composites, density and Vicat softening temperature.**

Rodzaj kompozytu / Sort of composites	Oznaczenie / Description	Gęstość / Density [g/cm <sup>3</sup> ]	TMV [°C]
Hiprolon 211	HPA	1.05	168
Hiprolon + 10% włókien lnu Hiprolon + 10 wt% of flax fibers	HPAL	1.06	172
Hiprolon + 10% włókna szklanego Hiprolon + 10 wt% of glass fibers	HPAS	1.10	174
Hiprolon + 10% włókna węglowego Hiprolon + 10 wt% of carbon fibers	HPAW	1.07	180
poliamid 6 (Tarnamid) + 10% włókna węglowego polyamide 6 (Tarnamid) + 10 wt% of carbon fibers	PAW	1.15	202
POM (Tarnoform) + 10% włókna węglowego POM (Tarnoform) + 10 wt% of carbon fibers	POMW	1.40	158



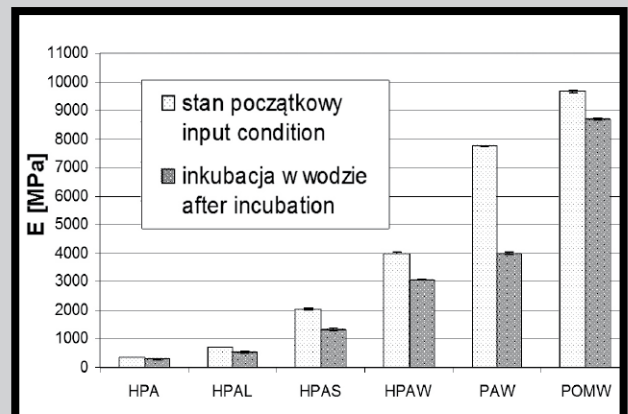
**RYS. 1. Zdjęcia wykonane za pomocą SEM kompozytów na osnowie Hiprolonu 211 z udziałem 10% włókien: lnu, szklanych i węglowych, przełomy po rozciąganiu, pow. 1000x.**

**FIG. 1. SEM images of composites based on Hiprolon 211 filled with 10 wt% fibers of: flax, glass and carbon, tensile fracture surfaces, magnification 1000x.**



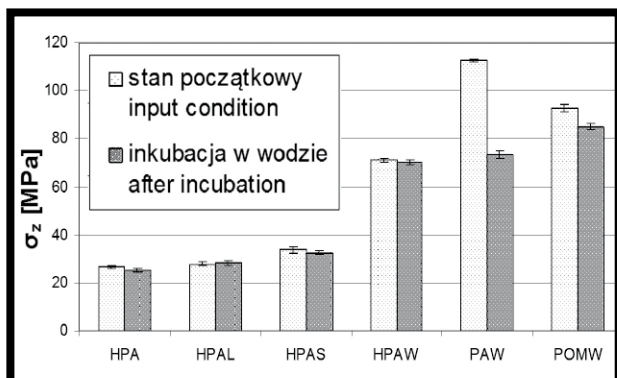
**RYS. 2. Chłonność wody badanych kompozytów po 1, 7 i 30 dniach inkubacji w wodzie.**

**FIG. 2. Sorption of water for testing composites after 1, 7 and 30 days of incubation.**



**RYS. 3. Moduł sprężystości kompozytów w stanie wejściowym oraz po 30-dniowym okresie inkubacji w wodzie.**

**FIG. 3. Elasticity modulus of composites in input condition and after 30 days incubation in water.**



**RYS. 4. Wytrzymałość na rozciąganie kompozytów w stanie wejściowym oraz po 30-dniowym okresie inkubacji w wodzie.**

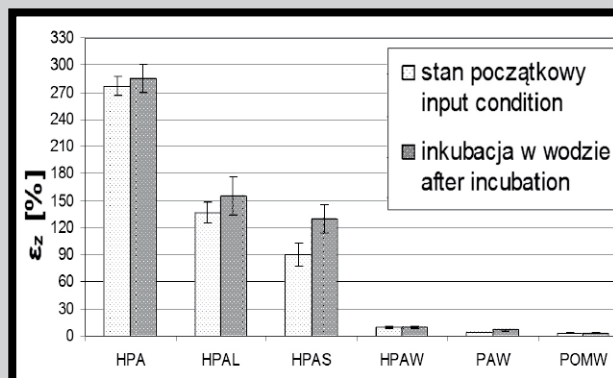
**FIG. 4. Strength of material on composites in input condition and after 30 days of incubation in water.**

## Wnioski

Kompozyty na osnowie poliamidu 11 wytworzonego z odnawialnych surowców z dodatkiem włókien tak naturalnych jak i sztucznych mogą być wykorzystywane na elementy konstrukcyjne sprzętu medycznego. Dużą ich zaletą jest znacznie mniejszy wpływ wody na zmianę ich właściwości w porównaniu z tradycyjnymi wykonanymi z poliamidu 6. Włókna naturalne w tym włókno lnu znane ze swojej dobrej wytrzymałości i łatwości mieszania z polimerami nadają się do wytwarzania kompozytów na elementy o średniej wytrzymałości i znacznej odkształcalności takie jak wsporniki, podłokietniki czy małe podatne stabilizatory. Włókno węglowe czy w mniejszym stopniu szklane świetnie sprawdzają się na elementy o dużej wytrzymałości i sztywności przy znacznej odporności na uderzenia (HPAW i POMW). Najwyższa wytrzymałość jest niezbędna do wytwarzania zewnętrznych elementów stabilizatorów, dlatego w dalszych badaniach należy uwzględnić zwiększenie ilości włókien w kompozycie do nawet 25-30%. Pomoże to również zwiększyć sztywność takich kompozytów. Ważne będzie też zbadanie wpływu obciążeń cyklicznych na właściwości wytrzymałościowe.

## Piśmiennictwo

- [1] Cossard C., Kuciel S., Mazurkiewicz S., Liber-Kneć A.: Possibility of using polyamide 6 reinforced with glass fiber for Ilizarov rings, *Polimery* 2008, 53, nr 4, s. 317-320.  
 [2] Gałazka M., Kuciel S. *Polimery w rehabilitacji*, *Plast News* 5/2011.



**RYS. 5. Wydłużenie przy zerwaniu kompozytów w stanie wejściowym oraz po 30-dniowym okresie inkubacji w wodzie.**

**FIG. 5. Elongation at break for input condition and after 30 days of incubation in water.**

## Conclusions

Composites based on polyamide 11 made of renewable materials with addition of both natural and synthetic fibers, can be used in the production of medical equipment components. One of their indisputable advantages is lower influence of water for changing of mechanical properties comparing to conventional composites based on polyamide 6 matrix. Natural fibers such as flax fiber, which are well-known for their strength and ease of mixing with polymers, are suitable for production of composites used to production of elements that can be characterized by medium strength and considerable flexibility (e.g. trusses, armrests or small elasticity stabilizers). It should be noted that carbon fibers, lesser fiber glasses will perform well in elements of high strength and rigidity and considerable impact resistance (HPAW and POMW). Highest strength is necessary for manufacturing elements for external fixating system, thus in further research should focus on increasing amount of fibers, even to the level of 25-30 wt% of flax fiber in the composite. It could also increase not enough stiffness of composites. Moreover, researchers should take into consideration the influence of fatigue cyclic loading on the strength properties.

## References

- [3] Richard P. Wool, Xiuzhi Susan Sun; *Bio-Based Polymers and Composites*, Elsevier Science & Technology Books 2005.  
 [4] 4. Florjanczyk Z., Dębkowski M., Chwojnowska E., Łokaj K., Ostrowska J.: *Polimery syntetyczne i naturalne w nowoczesnych materiałach polimerowych*, *Polimery* nr 10, (2009), 609-694.

# BIOKOMPOZYTY POLIMEROWE NA ELEMENTY SPRZĘTU RAHABILITACYJNEGO

NATALIA PILIP\*, STANISŁAW KUCIEL, PAULINA KUŹNIAR

POLITECHNIKA KRAKOWSKA,  
ZAKŁAD MECHANIKI DOŚWIADCZALNEJ I BIOMECHANIKI  
AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKÓW  
\* E-MAIL: NATALIAPILIP@GMAIL.COM

## Streszczenie

*W pracy oceniono możliwość wykorzystania nowych biodegradowalnych biokompozytów pochodzenia naturalnego napełnianych włóknami lnu w ilości 10% masowo, jako materiałów do wytwarzania elementów jednorazowych na potrzeby sprzętu rehabilitacyjnego. Oceniono podstawowe właściwości wytrzymałościowe oraz wpływ procesu biodegradacji hydrolytycznej w roztworze soli fizjologicznej na badane właściwości. Zaproponowano zastosowanie biokompozytów jako materiałów do wytwarzania elementów jednorazowego użytku dla sprzętu medycznego i rehabilitacyjnego w miejsce dotychczas używanego polistyrenu czy kompozytów polipropylenu.*

**Słowa kluczowe:** biokompozyty degradowalne, sprzęt rehabilitacyjny, elementy jednorazowe

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 120-123]

## Wprowadzenie

Tworzywa sztuczne, które stosuje się na sprzęt rehabilitacyjny nie muszą spełniać tak wygórowanych wymogów jak materiały stosowane na implanty stosowane in vivo. Nie muszą być one biogodne oraz bioinertne tak jak implanty wszczepiane człowiekowi. Lecz ze względu na kontakt ze skórą materiały te powinny być hypoalergiczne oraz nie zawierać toksycznych substancji. Nie powinny wchodzić w reakcje z wydzielinami skórnymi. Ważnym kryterium jest też odporność na czyszczenie i dezynfekcje. Mimo, że większość tego sprzętu używana jest tylko przez właściciela to raz na jakiś czas sprzęt musi być dezynfekowany dla bezpieczeństwa użytkownika, dlatego materiał musi być odporny na środki chemiczne i powierzchniowo czynne takie jak kwas nadoctowy, chlorek R-benzylodimetyloamoniowy, nitrylotrójocian trisodowy, aldehyd mrówkowy, alkohol izopropylowy oraz propylowy [1,2]. Kompozyty i materiały polimerowe są stosowane na elementy sprzętu rehabilitacyjnego ze względu na możliwość kształtowania i projektowania właściwości, dużą elastyczność i odkształcalność przy sporej wytrzymałości, łatwość nadawania nawet skomplikowanych kształtów oraz możliwość ich późniejszego wytwarzania. Coraz powszechniejsze stosowanie jednorazowych końcówek czy elementów mocujących o różnych rozmiarach i kolorach w zależności od upodobań i rozmiaru pacjenta. W tej koncepcji można wypożyczać np. kule czy pionizator – dopasowując wymienne jednorazowe końcówki. Wykorzystanie polimerów pochodzenia naturalne takich jak termoplastyczna skrobia, techniczny PLA, PHB czy kompozycje skrobi i poliestrów zarówno w czystej postaci jak i w postaci biokompozytów wzmocnionych naturalnymi włóknami np. lnu, konopi czy drzewnymi [3].

# BIOPOLYMER COMPOSITES FOR PARTS OF REHABILITATION EQUIPMENT

NATALIA PILIP\*, STANISŁAW KUCIEL, PAULINA KUŹNIAR

KRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF APPLIED MECHANICS AND BIOMECHANICS  
AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKOW, POLAND  
\* E-MAIL: NATALIAPILIP@GMAIL.COM

## Abstract

*The study estimates the possibility of using new biodegradable biocomposites filled with 10 wt% flax fibers as materials for disposable parts of rehabilitation equipment production. Basic mechanical properties and the influence of hydrolytic degradation process in physiological saline on tensile test properties are analyzed. Application of biocomposites for disposable parts of rehabilitation and medical equipment instead of commonly used polystyrene or polypropylene is proposed in the article.*

**Keywords:** degradable biocomposites, rehabilitation equipment, disposable parts

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 120-123]

## Introduction

Plastics used for rehabilitation equipment do not have to meet as strict requirements as materials used for in vivo implants. They do not have to be biodegradable and bioinert as implants inserted in the human body. However, due to contact with the skin, these materials should be hypoallergenic and can not contain any toxic substances. They should not react with skin secretions. Cleaning and disinfection resistance are also important issues. Though the equipment is used only by its owner, once in a while it must be disinfected for the user safety. Therefore the material must be resistant to chemical substances such as surfactants (e.g. peracetic acid, R-Benzylodimethyloammonio chloride, trisodium nitrotriacetate, formaldehyde, isopropyl alcohol and propyl) [1,2]. Composites and polymer materials are used for elements of rehabilitation equipment due to their design flexibility, significant elasticity and pliability while maintaining considerable strength, ease of shaping even to complex shapes and the possibility of their further production. The use of disposable tips or fasteners of various sizes and colours depending on preferences and size of the patient, becomes increasingly common. In this concept crutches or verticalizers with interchangeable disposable tips could be rented. In order to produce mentioned parts of rehabilitation equipment, it is possible to use natural origin polymers such as thermoplastic starch, technical PLA, PHB, or composites of starch and polyesters, whether in pure form or in form of biocomposites reinforced with natural fibres (such as flax, hemp or wood) [3]. As compared with traditional petrochemical polymers, products made of biocomposites are characterized by lower static electricity (and in result they collect less dirt and dust) and lower tendency to cause allergic reactions. Films and membranes made of biocomposites are also characterized by low permeability [1,4].

**TABELA 1. Rodzaje i właściwości badanych biopolimerów degradowalnych.**  
**TABLE 1. The sorts and properties of tested degradable biopolymers.**

Oznaczenie w pracy* / Description*	Rodzaj polimeru / Sort of polymer	Nazwa handlowa / Trade name	Gęstość / Density [g/cm <sup>3</sup> ]	Masowy wskaźnik płynięcia / Melt Flow MFR [g/10 min]	Temperatura topnienia / Melting point deg C
PL	alifatyczny poliester / aliphatic polyester	Natureplast PBI 003	1.26	15-25	115
PB	polilaktyd / polylactide	Natureplast PLE 001	1.25	2-8	145-155
PH	polihydroksyalkanian / poly(hydroxy alkanate)	Natureplast PHE 001	1.25	5-15	145-155

\*Kompozyty z dodatkiem 10% wag. włókien lnu oznaczono literą L na końcu  
 \*Composites with 10 wt% of flax fibers marked with the L at the end

Wyroby z takich materiałów w porównaniu do tradycyjnych z polimerów petrochemicznych charakteryzują się mniejszą elektrostatycznością, co powoduje znacznie mniejsze zabrudzenia i pokrywanie się kurzem takich wyrobów, mniejszą skłonnością do odczynów alergicznych oraz wysoką barierowością wykonanych z nich folii i błon [1,4].

## Materiały i metody

Próbki do badań wytworzono metodą wtrysku w Zakładach Azotowych SA w Tarnowie na wtryskarce Engel ES 200/40 HSL z regranulatu uzyskanego poprzez zmieszanie 10% wagowo włókien lnu produkcji firmy Safilin Sp. z o.o (średnica włókna 20 μm i przeciętna długość 120 μm) z technicznymi degradowalnymi biopolimerami pochodzenia naturalnego produkcji francuskiej firmy Nature Plast. Ich rodzaje, przyjęte właściwości oraz oznaczenia pokazano w TABELI 1. Dla oceny zmian właściwości kompozytów z włóknami lnu przeprowadzono badania przy statycznym rozciąganiu wg PN-EN ISO 527-1 na próbkach wiosełkowych, przy użyciu maszyny wytrzymałościowej firmy MTS seria Insight z osiowym ekstensometrem firmy MTS. Oznaczono wytrzymałość na rozciąganie -  $\sigma_z$ , moduł sprężystości - E i odkształcenie przy zerwaniu -  $\epsilon_z$  dla próbek kondycjonowanych po wtrysku oraz po miesięcznej inkubacji w soli fizjologicznej o temperaturze 40°C, dodatkowo oznaczając jej chłonność po 1, 7 i 30 dniach moczenia. Zdjęcia mikrostruktury zostały wykonane na przelomach próbek po rozciąganiu przy użyciu mikroskopu skaningowego JEOL JSN5510LV z zapisem cyfrowym.

## Wyniki i dyskusja

Wyniki badań właściwości wytrzymałościowych kompozytów i polimerów oryginalnych przedstawiono w TABELI 2. Dla porównania pokazano w niej typowe materiały (referencyjne) stosowane na elementy sprzętu rehabilitacyjnego, czyli polistyren i kompozyt polipropylenu z talkiem. Biodegradowalne kompozyty z dodatkiem włókien lnu charakteryzują się wyraźnym 30-40% wzrostem modułu sprężystości przy niewielkim kilku procentowym spadku wytrzymałości i większym, ale akceptowalnym spadku odkształceń przy zerwaniu.

## Materials and methods

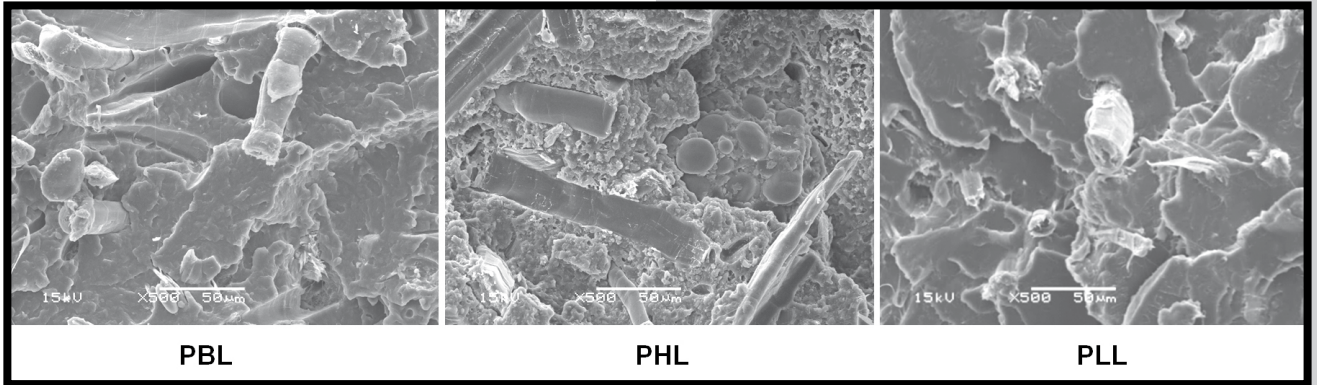
The test specimens were prepared by injection moulding method in Zakłady Azotowe SA in Tarnow on Engel ES 200/40 HLS injection moulding machine with regrind obtained by mixing 10 wt% flax fibre produced by Safilin company (fibre diameter: 20 μm, average length: 120 μm) with technical degradable biopolymers of natural origin produced by French company Nature Plast. Composition and characteristics of tested materials are shown in TABLE 1. To estimate the influence of flax fibres on mechanical properties of the composites tensile test was done on standard dumbbell samples according to PN-EN ISO 527-1 on universal testing machine MTS Insight with MTS axial extensometer. Tensile strength ( $\sigma_z$ ), modulus of elasticity (E) and elongation at break ( $\epsilon_z$ ) for samples conditioned after injection and after one month of incubation in physiological saline at 40°C were obtained. Furthermore, absorption of physiological saline was marked after 1, 7 and 30 days of immersion. Images of tensile fracture surfaces of the composites were made with JEOL JSN5510LV scanning electron microscope with digital recording.

## Results and discussion

Tensile properties determined for tested materials are shown in TABLE 2. For the comparison, the table presents also properties of typical materials used in rehabilitation components production (ex. polystyrene and polypropylene composite with talc). Biodegradable composites filled by flax fibres are characterized by significant increase of modulus of elasticity (about 30-40%) and slight decrease of tensile strength but greater than acceptable decrease of elongation at break.

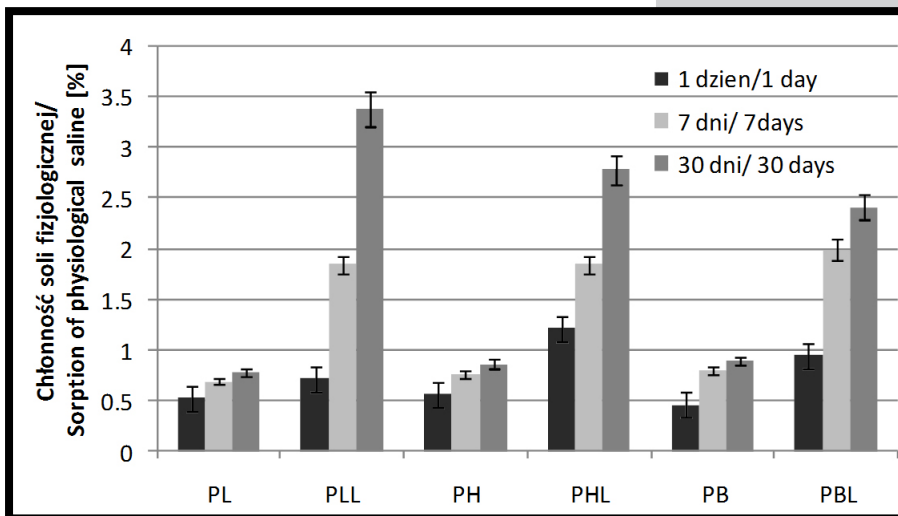
**TABELA 2. Właściwości wytrzymałościowe kompozytów oznaczane w próbie rozciągania.**  
**TABLE 2. Strength properties tested composites marked in elongation test.**

Materiał / Material	$\sigma_z$ [MPa]	$\sigma_{n-1}$	E [MPa]	$\sigma_{n-1}$	$\epsilon_z$ [%]	$\sigma_{n-1}$
PL	67.4	0.3	3868	277	4.3	1.0
PLL	61.1	0.1	5510	289	3.9	0.9
PB	41.3	0.4	703	27	54.1	42.3
PBL	36.1	0.0	1426	37	11.3	0.3
PH	11.5	0.4	329	25	16.6	4.5
PHL	12.4	0.1	676	4	8.6	0.6
PS	50.0	-	3150	-	2.0	-
PP + 40% talk	24.1	-	2410	-	4.0	-



RYS. 1. Zdjęcia wykonane za pomocą SEM dla kompozytów z udziałem 10% włókien lnu, przełomy po rozciąganiu, pow. 500x.

FIG. 1. SEM images of composites filled with 10 wt% of flax, tensile fracture surfaces, magnification 500x.

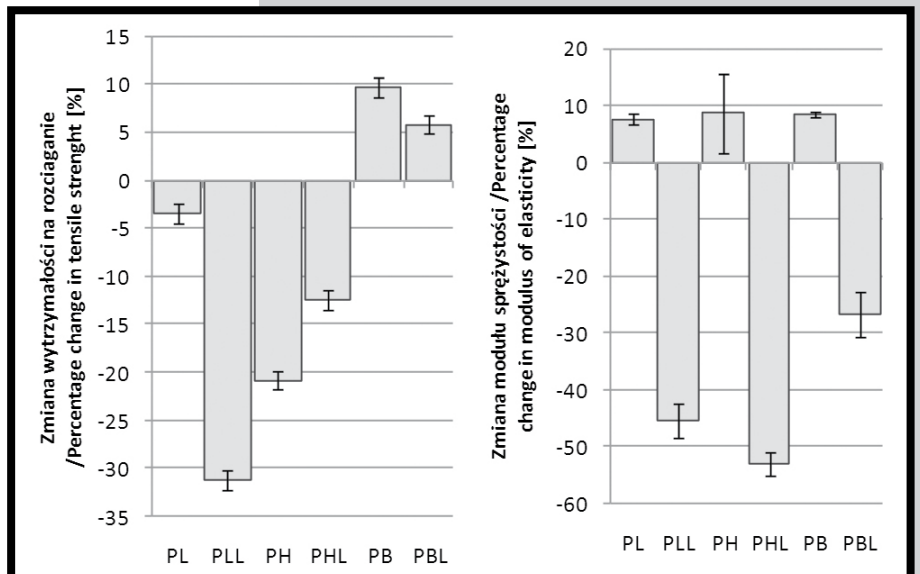


RYS. 2. Chłonność badanych kompozytów po 1, 7 i 30 dniach inkubacji w soli fizjologicznej.

FIG. 2. Physiological saline sorption of tested materials after 1, 7 and 30 days of incubation.

FIG. 1 shows images of composites tensile fracture surfaces where flax fibres well bonded with polymer matrix can be seen (crack across the fibres). FIG. 2 shows increase of physiological saline absorption after 1, 7, and 30 days of incubation. In the FIG. 3 changes of tensile strength and modulus of elasticity are shown. Addition of flax fibres to composites increases the saline absorption and causes faster decrease of their modulus of elasticity and smaller decrease of tensile strength. Reference material are not biodegradable and wasn't tested in physiological saline.

Na RYS. 1 pokazano obrazy przełomów po rozciąganiu badanych kompozytów z wyraźnie widocznymi włóknami lnu dobrze osadzonymi w matrycy polimerowej (pęknięcia w poprzek włókien). Na RYS. 2 pokazano wzrost chłonności soli fizjologicznej badanych kompozytów po 1, 7 i 30 dniach moczenia, a na RYS. 3 zmiany wytrzymałości i modułu sprężystości badanych kompozytów. Dodatek włókien lnu zwiększa chłonność soli fizjologicznej kompozytów i powoduje szybszy spadek ich modułu sprężystości oraz w mniejszym stopniu wytrzymałości. Materiały referencyjne nie są biodegradowalne i nie badano ich degradacji w soli fizjologicznej.



RYS. 3. Zmiany wytrzymałości i modułu sprężystości kompozytów po miesięcznej inkubacji w soli fizjologicznej.

FIG. 3. Percentage changes of composites tensile strength and modulus of elasticity after 30 days incubation in physiological saline.

## Wnioski

Biokompozyty na osnowie polimerów biodegradowalnych pochodzenia naturalnego napełniane włóknami lnu mogą być stosowane na elementy jednorazowego użytku (użyte raz lub używane przez krótki czas przez jednego pacjenta) sprzętu medycznego i rehabilitacyjnego. Stosowanie jednorazowych elementów sprzętu rehabilitacyjnego będzie sprzyjać utrzymaniu higieny, zwiększy ich estetykę i poprawi komfort pacjenta. Biokompozyty na osnowie polilaktydu lub czysty polimer mogą zastępować elementy o krótkim okresie użytkowania wytwarzane dotychczas z różnych odmian polistyrenu. Powszechnie stosowany na wyroby kompozyt polipropylenu z talkiem może być skutecznie zastąpiony przez kompozyty na osnowie alifatycznych poliestrów. Inkubacja w soli fizjologicznej powoduje znacznie większe zmiany modułów sprężystości badanych biokompozytów niż ich wytrzymałości na rozciąganie. Dobierając odpowiedni polimer na osnowę można dopasować czas jego biodegradacji do oczekiwanego czasu użytkowania przez pacjenta, a następnie poddać utylizacji poprzez kompostowanie lub spalanie z odzyskiem energii.

## Conclusions

Biocomposites on the base on biodegradable polymers of natural origin filled with flax fibres can be used for disposable components (used once or used for a short time by one patient) of medical and rehabilitation equipment. There are many benefits from using disposable components such as maintaining of hygiene, enhance their aesthetics and improve patient comfort. Biocomposites with polylactide matrix or pure polymer can be used instead of elements produced till now with various types of polystyrene, however only for short-life products. Commonly used in this applications composites of polypropylene matrix filled with talk can be replaced by composites with aliphatic polyester matrix. Incubation in physiological saline had bigger impact on modulus of elasticity than strength of tested biocomposites. Suitable polymer for composite matrix can be choose to adjust the time of biodegradation to the expected time of its using by patient, and then disposed through the composting or incineration with energy recovery.

## Piśmiennictwo

- [1] Gałazka M., Kuciel S. Polimery w rehabilitacji, *Plast News* 5/2011.  
 [2] Kuciel S., Liber-Kneć A., Kuźniar P., Biodegradowalne materiały polimerowe wykorzystywane jako materiały na elementy stabilizujące, *Czasopismo Inżynieria Biomateriałów* nr 99-101 ss. 38-41.

## References

- [3] Kuciel S., Kuźniar P., Liber-Kneć A., Polymer biocomposites with renewable sources, *Archives of Foundry Engineering* 2010.  
 [4] Mohanty A.K., Misra M, Drzal L.T.: *Natural fibers, biopolymers, and their biocomposites*, CRC Press UK 2, 2005.

# ELEKTROFORETYCZNE OSADZANIE HYDROKSYAPATYTU NA POWIERZCHNI STOPÓW NiTi WYKAZUJĄCYCH PAMIĘĆ KSZTAŁTU

T. GORYCZKA<sup>1\*</sup>, B. SZARANIEC<sup>2</sup>, K. DUDEK<sup>1</sup>, Ł. ZYCH<sup>2</sup>,  
M. FREITAG<sup>1</sup>, J. LELAŃKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNIWERSYTET ŚLĄSKI, INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH,  
UL. BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE

<sup>2</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

\* E-MAIL: TOMASZ.GORYCZKA@US.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 124-128*]

## Wstęp

Stopy NiTi wykazujące efekt pamięci kształtu są znane z praktycznych zastosowań w medycynie [1]. Powodem tak licznych zastosowań jest występujący w nich efekt pamięci kształtu, pojawiający się pod wpływem zmiany temperatury. Stopy NiTi z powrodeniem były zastosowane na klamry, pierścienie czy druty ortodontyczne itd. [2]. Jednakże nadal w literaturze istnieje dyskusja nad ich biokompatybilnością i odpornością korozyjną.

W celu ochrony ludzkiego organizmu przed migracją jonów niklu zostało zaproponowanych szereg technik. Dane literaturowe opisują zastosowanie pokryć stopów azotkami tytanu, tlenkami tytanu lub warstwami diamentopodobnymi, które mają stanowić barierę przeciwko uwalnianiu się niklu i dostatecznie zredukować korozję stopów [3]. Ponadto zachowanie odpowiedniej gładkości powierzchni pozwala na redukcję przyczepności bakterii oraz tworzenie się biofilmów. Zastosowanie metod osadzania warstw tlenkowych, azotkowych i in. wymaga stosowania podwyższonej temperatury [4], co może prowadzić do rozkładu fazy  $\beta$  na fazy równowagowe takie jak  $Ni_3Ti$  czy  $Ti_2Ni$ . Efekt pamięci kształtu jest ściśle powiązany z odwracalną przemianą martenzytyczną, która zachodzi pomiędzy fazą  $\beta$  a martenzytem. Zatem, zmniejszanie w stopie udziału fazy  $\beta$  wpływa na efekt pamięci kształtu poprzez zmniejszenie stopnia odzysku kształtu. Również, efekt pamięci kształtu może być ograniczony lub całkowicie zablokowany poprzez naniesienie zbyt grubej sztywnej warstwy ochronnej [5].

W celu przewyższenia powyższych niedogodności adoptuje się niekonwencjonalne, dla stopów NiTi, metody nanoszenia warstw. Na szczególną uwagę zasługują te metody, w których nie jest wymagane podniesienie temperatury powyżej 100-200°C. Jedną z takich technik jest nanoszenie elektroforetyczne [6]. W artykule przedstawiono wyniki otrzymane dla warstwy hydroksyapatytu (HAP) naniesionej na powierzchnię stopu NiTi.

## Część eksperymentalna

Jako podłoża do nanoszonych warstw zastosowano komercyjny stop NiTi o zamiarowym składzie chemicznym 50,6% at. Ni oraz 49,4% at. Ti. Z litego materiału wycięto próbki o wymiarach 15 mm x 12 mm x 0,8 mm, które poddano przesycaniu z temperatury 850°C do wody z lodem. Następnie powierzchnię próbek polerowano stosując papiery ściernie o gradacji do 1200. Następnie do polerowania zastosowano zawiesiny diamentowe o rozmiarze cząstek do 1  $\mu$ m.

# ELECTROPHORETIC DEPOSITION OF HYDROXYAPATITE COATINGS ON NiTi SHAPE MEMORY ALLOY

T. GORYCZKA<sup>1\*</sup>, B. SZARANIEC<sup>2</sup>, K. DUDEK<sup>1</sup>, Ł. ZYCH<sup>2</sup>,  
M. FREITAG<sup>1</sup>, J. LELAŃKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,  
BANKOWA 12, 40-007 KATOWICE, POLAND

<sup>2</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: TOMASZ.GORYCZKA@US.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 124-128*]

## Introduction

The NiTi shape memory alloys have been recognized as a material suitable for application in medicine [1]. It is due to the presence of a unique effect connected to shape change as a result of temperature increase or decrease. The NiTi alloy was successfully applied for clamps, rings, orthodontic wires ect. [2]. However, there still exists discussion over their biocompatibility and corrosion resistance.

In order to protect human body against migration of nickel ion several covering techniques was proposed. It was reported that, protective coating with titanium nitrides, titanium oxides or diamond-like phase seems to be an attractive way to create a barrier against ion of nickel and sufficiently reduces corrosion [3]. Additionally, surface smoothing reduces adhesion of bacteria as well as a biofilm formation. Applied deposition processes (oxidation, nitriding etc.) require elevation of temperature [4]. However, it may lead to decomposition of the  $\beta$ -phase to equilibrium phases such as:  $Ni_3Ti$  and  $Ti_2Ni$ . The shape memory effect is closely correlate to the reversible martensitic transformation which occurs between the  $\beta$ -phase and martensite. Decrease of the  $\beta$ -phase amount causes decrease of the shape memory effect. Also, shape memory effect can be limited when the coating is too thick and/or stiff [5].

In order to overcome such inconveniences another non-conventional techniques for coating deposition are adopted for covering of NiTi alloys. Especially, such techniques are considered, which can be applied at temperature not higher than 100-200°C. One of them, which fulfils thermal condition, is electrophoresis [6]. The paper reports results which were obtained for hydroxyapatite (HAP) deposited on the surface of NiTi alloys. In order to form thick coatings, special attention was put for optimization of the deposition parameters.

## Experimental data

The commercial NiTi alloy with nominal chemical composition: 49.4 at. % Ti and 50.6 at. % Ni was used as a substrate for hydroxyapatite coatings deposition. First, rectangular samples of the alloy with dimension of 15 mm x 12 mm x 0.8 mm were quenched from 850°C to the iced water followed by mechanical polishing with SiC papers down up to 1200 grit. Next diamond suspensions, up to 1  $\mu$ m, were used and final treatment was done using 0.1  $\mu$ m colloidal silica suspension. Before hydroxyapatite deposition, samples were passivated at 130°C for 20 minutes. Hydroxyapatite was deposited using electrophoresis with parameters presented in TABLE 1. HAP suspension was prepared in ratio as follows: 0.5 mg of powders per 500 ml of 99.8% ethanol.



W końcowym etapie przygotowania powierzchnię stopu polerowano w zawieszynie  $\text{SiO}_2$  o gradacji  $0,1 \mu\text{m}$ . Przed naniesieniem hydroksyapatytu powierzchnia próbek była pasywowana w autoklawie w temperaturze  $130^\circ\text{C}$  przez 20 minut. Hydroksyapatyt naniesiono metodą elektroforezy z zastosowaniem parametrów podanych w TABELI 1. Roztwór do nanoszenia przygotowano używając  $0,5$  proszku HAP na  $500 \text{ ml}$  etanolu ( $99,8\%$ ).

Strukturę stopów z naniesionymi warstwami hydroksyapatytu badano przy zastosowaniu dyfrakcji promieni rentgenowskich przy stałym kącie padania wiązki pierwotnej (SKP). Badania prowadzono za pomocą dyfraktometru X'Pert-Pro. Powierzchnię naniesionych warstw obserwowano przy zastosowaniu skaningowego mikroskopu elektronowego JSM-6480.

## Wyniki badań i ich dyskusja

### Charakterystyka materiałów w stanie wyjściowym

W celu przeprowadzenia procesu nanoszenia elektroforetycznego warstw HAP określony został potencjał zeta (RYS. 1a). Wartość potencjału dla otoczenia o neutralnym pH wynosiła  $42,3 \pm 0,74 \text{ mV}$ . Umożliwiło to przeprowadzenie osadzania katodowego.

Proszek hydroksyapatytu w stanie wyjściowym był w postaci krystalicznej o średniej wielkości ziarna około  $120 \text{ nm}$  (RYS. 1b). Na RYS. 2a przedstawiono dyfraktogram rentgenowski proszku przed jego naniesieniem na powierzchnię stopu NiTi. Linie dyfrakcyjne przypisano wzorcowi fazy  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  oznaczonej w kartotekach ICDD bazy PDF-2 numerem 024-0033.

**TABELA 1. Parametry nanoszenia hydroksapatytu metodą elektroforezy.**

**TABLE 1. Parameters of electrophoretic deposition.**

Numer próbki / Sample no.	Napięcie / Voltage [V]	Prąd / Current [mA]	Czas / Time [s]
1	30	1.0	5
2	30	1.0	15
3	30	1.0	30

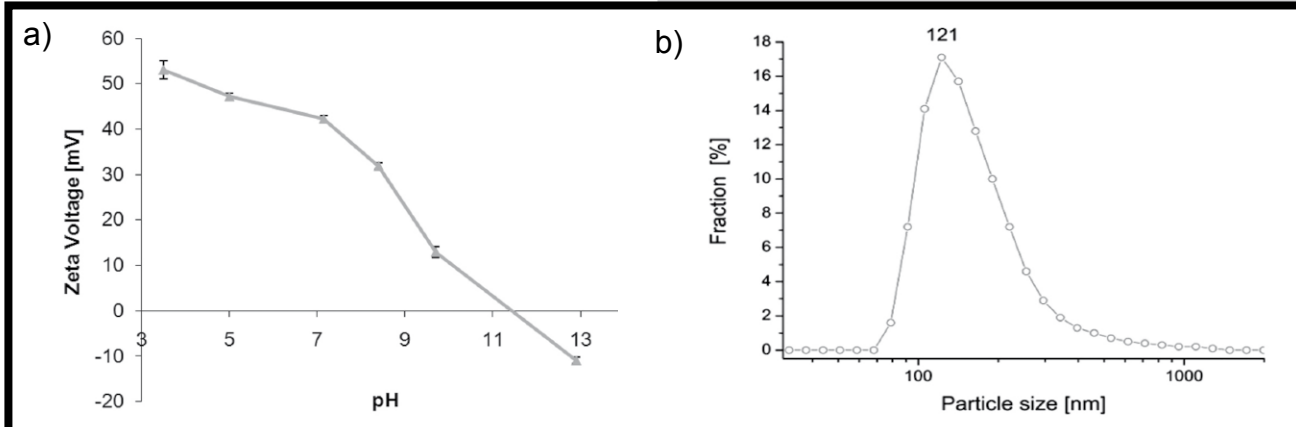
Structure of coated NiTi alloy was studied using the X-ray diffraction (XRD) in Bragg-Brentano geometry and grazing incidence X-ray diffraction technique (GIXRD) using X-ray diffractometer X'Pert-Pro. Surface of coated samples was observed using the scanning electron microscope JSM-6480.

## Results and discussion

### Materials before coatings deposition

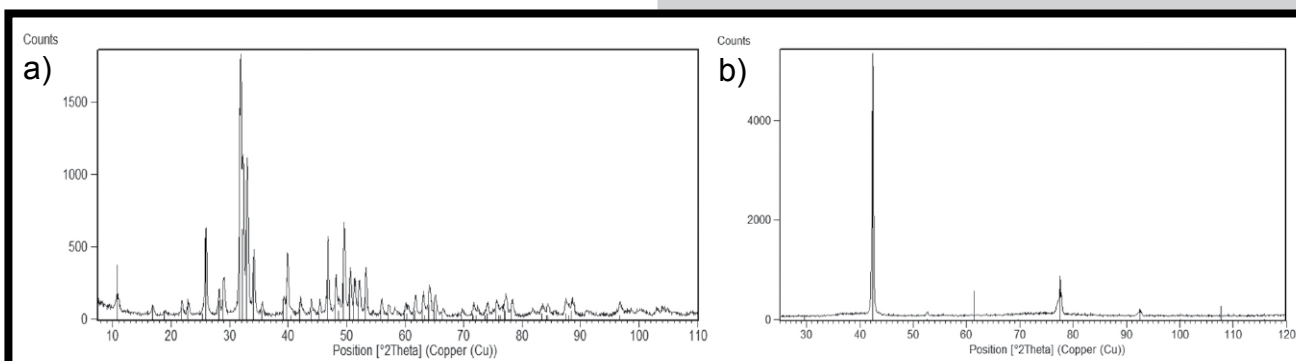
In order to carry out electrophoretic deposition the zeta potential was determined (FIG. 1a). It was revealed that at neutral pH its value reached  $42.3 \pm 0.74 \text{ mV}$ , which made possible carrying out cathodic deposition.

As received HAP powder was in crystalline state with average particle size of  $121 \text{ nm}$  (FIG. 1b). FIG. 2a shows X-ray diffraction pattern taken from the powder before its deposition. The diffraction lines were identified as belonging to the  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  phase assigned to 024-0033 ICDD card in PDF-2 database.



**RYS. 1. Potencjał zeta w zależności od zmian pH (a) oraz wielkość cząstek hydroksyapatytu mierzona przy neutralnym pH (b).**

**FIG. 1. Zeta potential vs. pH (a) and particle size distribution of HA measured at neutral pH (b).**



**RYS. 2. Dyfraktogramy rentgenowskie zarejestrowane dla hydroksyapatytu (a) oraz stopu NiTi (b) w stanie wyjściowym.**

**FIG. 2. XRD patterns as received HAP powder (a) and TiNi alloy (b).**

W celu uzyskania fazy  $\beta$  w temperaturze otoczenia próbki wygrzano w temperaturze 850°C przez 20 minut a następnie szybko schłodzono w wodzie z lodem. Na RYS. 2b przedstawiono dyfraktogram rentgenowski stopu NiTi zarejestrowany w temperaturze pokojowej. Zidentyfikowane linie dyfrakcyjne pochodziły od fazy  $\beta$  o strukturze typu B2 (ICDD, karta numer 065- 0917 PDF-2). Oznacza to, że temperatury charakterystyczne przemiany martenzytycznej dla tego stopu znajdują się poniżej temperatury pokojowej.

### Stop NiTi po osadzeniu hydroksyapatytu

Powierzchnia stopu NiTi pokrytego hydroksyapatytem była obserwowana w skaningowym mikroskopie elektronowym. RYS. 3 przedstawia przykładowy obraz powierzchni próbki 1. Relatywnie krótki czas nanoszenia (5 sekund) nie zapewnił dostatecznie jednorodnego rozkładu cząstek hydroksyapatytu. Widoczne były głównie większe cząstki hydroksyapatytu i jego aglomeraty o średniej średnicy około 2  $\mu\text{m}$ . Przeprowadzone pomiary składu chemicznego z zastosowaniem detektora EDS potwierdziły, że są to cząstki hydroksyapatytu.

Strukturę naniesionych warstw badano za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej. Do badania warstw zastosowano metodę stałego kąta padania wiązki pierwotnej. Dyfraktogramy rentgenowskie były mierzone przy stałym kącie  $\alpha$  o wartościach: 0,3; 0,5; 0,8 oraz 1,0°. Na RYS. 4a przedstawiono dyfraktogram rentgenowski dla próbki 1. Pomimo obecności na dyfraktogramie linii przynależących do fazy macierzystej stopu NiTi o strukturze B2, zidentyfikowano linie należące do krystalicznego hydroksyapatytu (PDF-2 karta numer 024-0033). Natężenie tych linii są jednak kilkakrotnie niższe od natężenia linii pochodzących od podłoża. Fakt ten dowodzi, iż pomimo niewielkiej głębokości wnikania promieniowania rentgenowskiego ciągle istniały obszary powierzchni stopu, na której nie osadziła się warstwa HAP. Zastosowane parametry procesu nanoszenia nie zapewniły utworzenia na powierzchni stopu jednorodnej warstwy hydroksyapatytu.

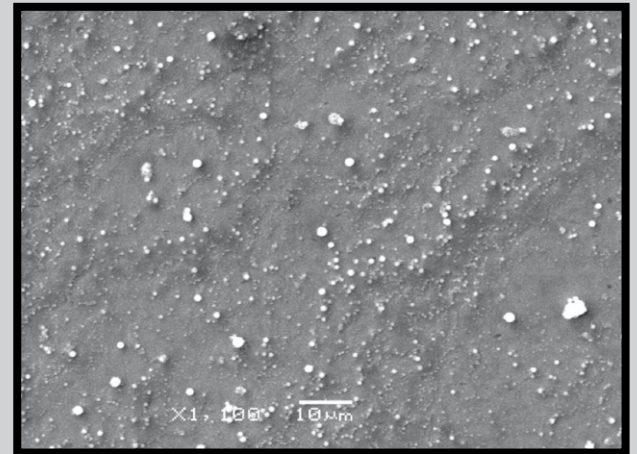
Wydłużenie czasu nanoszenia do 15 sekund (próbka 2) nie spowodowało poprawy jakości warstwy. Dopiero wydłużenie czasu do 30 sekund (próbka 3) spowodowało wzrost grubości warstwy oraz poprawę jej jakości. Na RYS. 5a przedstawiono obraz mikroskopowy, na którym widoczna jest warstwa złożona ze ściśle przylegających do siebie cząstek hydroksyapatytu. Jednorodny charakter warstwy został potwierdzony badaniami rentgenowskimi. RYS. 4b przedstawia dyfraktogram rentgenowski dla próbki 3 przy stałym kącie padania wiązki pierwotnej 0,5°. Głównie stwierdzono obecność linii pochodzących od hydroksyapatytu. Również stwierdzono obecność najsilniejszej linii pochodzącej od  $\text{TiO}_2$  (rutyl). Linia ta charakteryzowała się zwiększoną szerokością połówkową. Potwierdza to fakt, że rutil powstał podczas pasywacji stopu NiTi w autoklawie. Przeprowadzone badania rentgenowskie potwierdziły kolejność sekwencji naniesionych warstw: najpierw na stopie NiTi powstała warstwa rutylu, a następnie na niej został naniesiony hydroksyapatyt. W przypadku pozostałych próbek nie obserwowano obecności warstwy  $\text{TiO}_2$ .

W celu zbadania wpływu procesu nanoszenia warstw HAP na przebieg przemiany martenzytycznej zarejestrowano termogramy metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Na RYS. 5b porównano termogramy dla próbki 3 przed i po naniesieniu warstwy hydroksyapatytu. W obu przypadkach otrzymane krzywe grzania i chłodzenia wykazywały podobieństwo. Na obu termogramach wystąpiło jedno maksimum i minimum charakterystyczne dla odwracalnego przebiegu przemiany martenzytycznej.

In order to receive the NiTi alloy in the  $\beta$ -phase at room temperature, sample was annealed at 850°C for 20 minutes and quenched into water. Application of such thermal treatment ensures that characteristic temperatures of the martensitic transformation can be lowered and appear below to the room temperature. FIG. 2b shows X-ray diffraction pattern of the NiTi alloy taken at room temperature. All diffraction peaks belongs to the  $\beta$ -phase with crystal structure of the B2 type (ICDD card no 065- 0917 PDF-2).

### NiTi alloy after HAP deposition

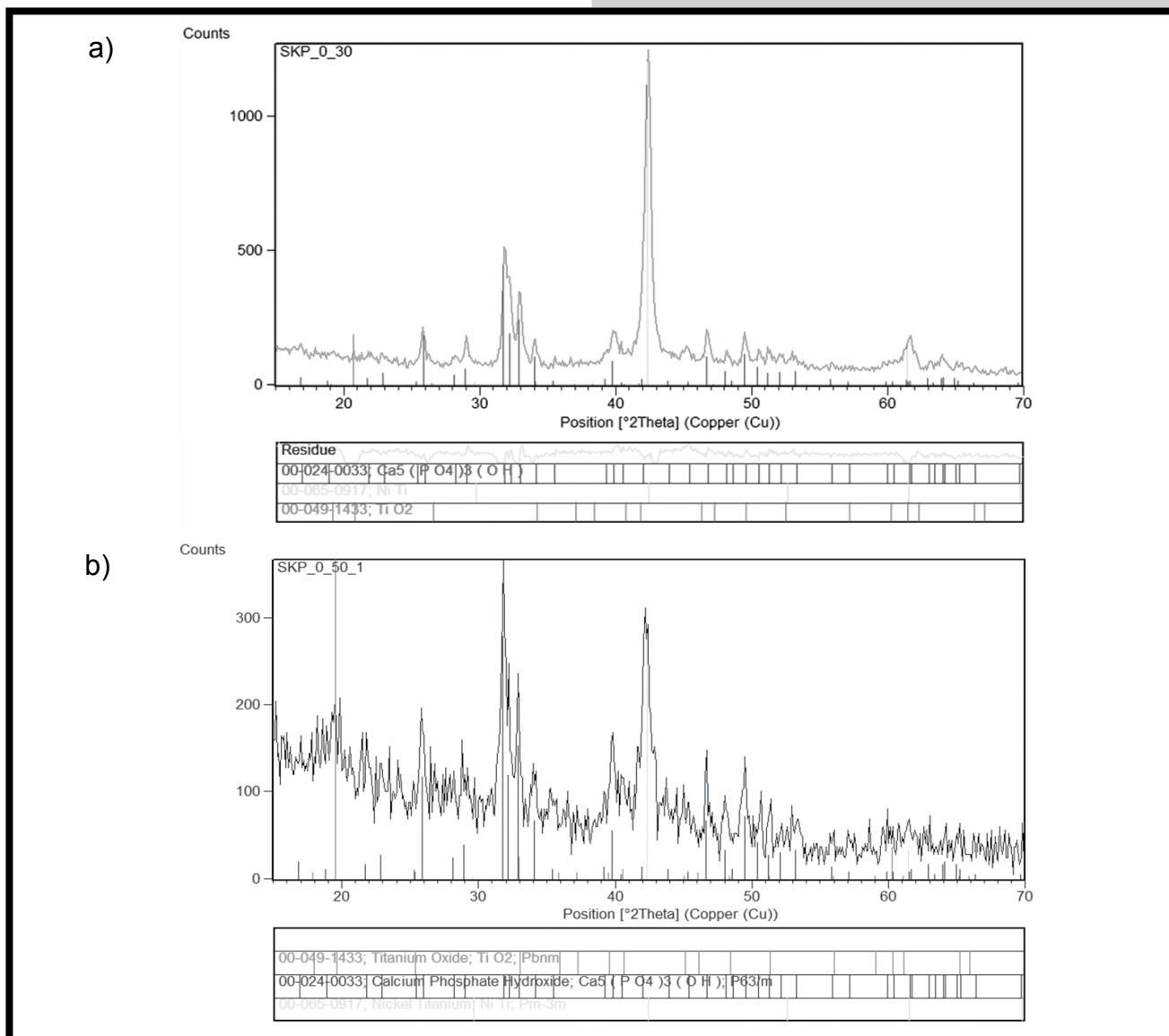
Surface of the coated NiTi samples was observed using scanning electron microscope. FIG. 3 shows an example of the image observed for sample no 1. Relatively short deposition time (5 seconds) resulted in inhomogeneous distribution of the particles. Mainly, some separated particles with average diameter higher than 2  $\mu\text{m}$ , were observed. Measurement of chemical composition, using EDS method, proved that these particles possess HAP chemical composition.



**RYS. 3. Obraz mikroskopowy powierzchni próbki 1.**  
**FIG. 3. SEM image observed for sample no 1.**

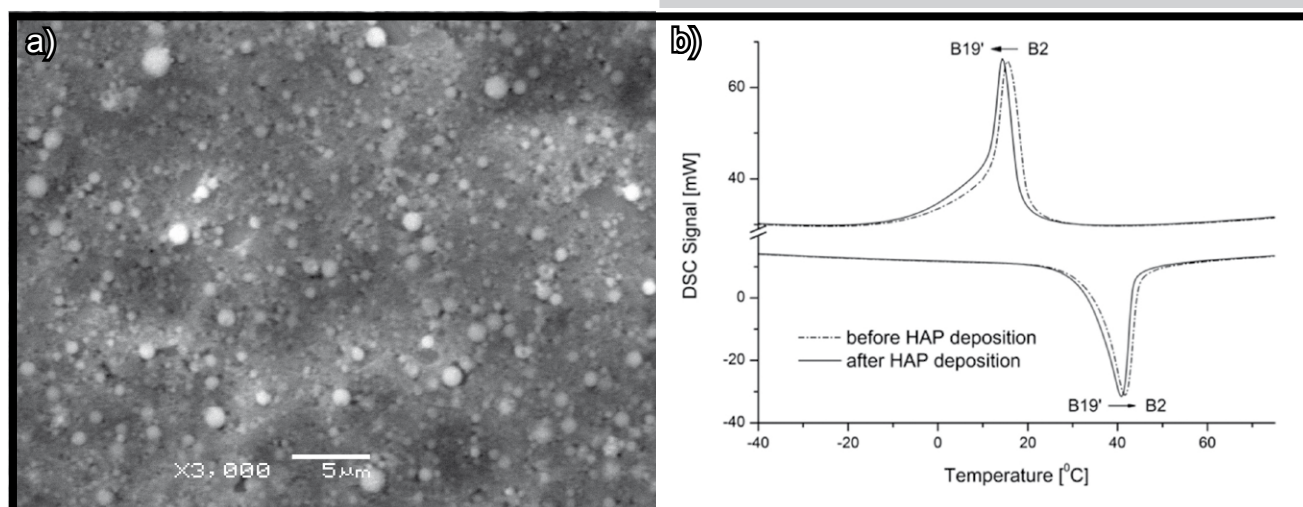
Structure of deposited coatings was studied from the X-ray diffraction measurement. GIXRD technique was used for examination of structure of deposited coatings. The GIXRD patterns were collected at constant incidence angle of: 0.3, 0.5, 0.8 and 1° degrees. FIG. 4a shows GIXRD pattern measured for the sample 1. Apart from diffraction line, which were identified as belonging to the HAP (PDF-2 card no 024-0033), diffraction line belonged to the B2 phase were still visible. Moreover, they revealed significantly higher intensity than lines coming from the HAP. It proves that the coating is very thin and inhomogeneous. Some regions of the alloy were not coated by HAP.

Increase of deposition time up to 15 seconds (sample 2) still did not improved quality of the deposited coating. Elongation of deposition time up to 30 second (sample 3) resulted in improvement of its thickness as well as quality. It can be visible that surface of the sample 3 was closely covered by HAP particles (FIG. 5a). Also, homogenous character of the coating was confirmed by the X-ray diffraction studies (FIG. 4b). Mainly, lines belonging to the HAP were observed. Moreover, presence the strongest line characteristic for the  $\text{TiO}_2$  phase was stated. This line shows broaden half width. It assures that the  $\text{TiO}_2$  phase was formed during passivation process before HAP deposition. X-ray measurement allowed to confirming ordering of the layers: on the NiTi matrix the  $\text{TiO}_2$  phase was formed and over that the layer from HAP was created.



RYS. 4. Dyfraktogramy rentgenowskie zarejestrowane przy stałym kącie padania wiązki pierwotnej (dla  $\alpha=0.5^\circ$ ) dla próbki 1 (a) oraz 2 (b).

FIG. 4. GIXRD patterns measured at incidence angle of  $0.5^\circ$  for sample 1 (a) and 3 (b).



RYS. 5. Obraz mikroskopowy powierzchni próbki 3 (a) oraz porównanie termogramów zarejestrowanych dla próbki 3 przed i po osadzeniu warstwy HAP (b).

FIG. 5. SEM image observed for surface of the sample 3 (a) and comparison of the DSC cooling/heating curves measured for the sample 3 before and after HAP deposition (b).

Zatem, spełniony został warunek na wystąpienie efektu pamięci kształtu. Niewielkie przesunięcie temperaturowe pików na termogramach (mniejsze niż 2°) może być powodem błędu pomiarowego, a nie wpływem na przemianę martenzytyczną warunków osadzania elektroforetycznego lub obecności osadzonej na powierzchni stopu warstwy.

## Wnioski

- Technika elektroforetycznego nanoszenia jest przydatną metodą do pokrywania stopów NiTi hydroksyapatytem.
- Jednorodne wielowarstwy złożone z TiO<sub>2</sub> oraz hydroksyapatytu zostały uzyskane przy zwiększeniu czasu nanoszenia do 30 sekund.
- Zastosowane parametry nanoszenia warstw nie wpłynęły na przebieg odwracalnej przemiany martenzytycznej.
- Powłoki wielowarstwowe zbudowane z TiO<sub>2</sub> oraz hydroksyapatytu mogą stanowić skuteczną ochronę powierzchni stopu NiTi i powodować zwiększenie bioaktywności wykonanych z tych stopów implantów medycznych.

## Podziękowania

*Badania były finansowane z projektu N N507 230540 fundowanego przez Narodowe Centrum Nauki.*

In order to studies influence of the deposition process on the course of the martensitic transformation, the DSC cooling/heating curves were measured. FIG. 5b shows comparison of the thermograms registered for the sample 3 before and after HAP deposition. In both cases, samples reveal similar thermal behavior. One thermal peak appeared on the cooling or heating curve, respectively. It proved reversible character of the martensitic transformation – fulfilling the basic requirement for shape memory effect. Small shift (lower than 2°) observed between thermograms lays rather in the error of the experiment than is the source of deposition influence on the course of the martensitic transformation.

## Conclusions

- Electrophoretic deposition appears to be useful method for covering surface of the NiTi alloy with hydroxyapatite.
- The homogeneous multi-layers coating consisted of the combined TiO<sub>2</sub> and HAP phases were obtained with elongation time of deposition up to 30 seconds.
- Applied processing parameters do not influence the course of the reversible martensitic transformation.
- Coated NiTi shape memory alloy with combination of TiO<sub>2</sub> and HAP layers can be useful way for surface protection, when it is applied in medicine for implants.

## Acknowledgements

*The studies were financially supported from the project N N507 230540 funded by The National Science Centre (NCN).*

## Piśmiennictwo

- [1] T. Yoneyama, S. Miyazaki, "Shape memory alloys for biomedical applications", Woodhead Publishing Ltd, Cambridge 2008.
- [2] Y.Y. Chu, L.C. Zhao; "Shape memory materials and its applications"; Proc. of SMST-SMM conference, Kunming 2001, China.
- [3] G.C. McKay, R. Mac Macnair, C. MacDonald, M.H. Grant, Biomaterials, 17 (1996) p. 1339.

## References

- [4] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Solid State Phenomena, 163 (2010) p. 127.
- [5] J. Lelątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Inżynieria Materiałowa, 5(171)(2009) p. 429.
- [6] B. Szaraniec, J. Chłopek, G. Dynia, Inżynieria Materiałowa, 30 (5) (2009) p. 449.

# KOMPOZYT NA BAZIE TYTANU – POTENCJALNY BIOMATERIAŁ IMPLANTACYJNY

PIOTR DEPTUŁA<sup>1</sup>, JAN R. DĄBROWSKI<sup>1</sup>, ANDRZEJ SOBOLEWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA,  
WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK,

E MAIL: JRD@PB.EDU.PL

<sup>2</sup> CHM, LEWICKIE 3B, 16-061 JUCHNOWIEC KOŚCIELNY,

E MAIL: CHM@CHM.EU

*[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 129-132]*

## Wprowadzenie

Do najczęściej stosowanych w medycynie stopów na implanty należą stale austenityczne, stopy kobaltu oraz tytan i jego stopy [1,2]. Z tych materiałów najbardziej obiecujące wydają się być stopy na bazie tytanu. Najczęściej stosowanym, handlowym stopem tytanu stosowanym w alloplastyce, jest dwufazowy stop tytanu z aluminium i wanadem (Ti-6Al-4V) [1-5]. Zastosowanie stopów tytanu, jako powierzchni tarcia w endoprotezoplastyce jest ograniczone przez słabe właściwości tribologiczne i słabą odporność na zużycie. Jest to poważny mankament tego typu stopów implantacyjnych, co znacznie ogranicza ich zastosowanie w węzłach tarcia układów biologicznych (stawy, układy stomatologiczne) [11,12].

Liczne badania tych materiałów skupione są na modyfikacji właściwości mechanicznych i tribologicznych [10-12]. Stopy tytanu ze względu na swoje właściwości są bardzo trudne do obróbki plastycznej i wiotrowej, dlatego poszukuje się nowych technologii, które dadzą nowe możliwości w otrzymywaniu bardziej konkurencyjnych stopów i kompozytów na bazie tytanu do zastosowań biomedycznych [6-10]. Coraz szersze zastosowanie w produkcji biomateriałów znajdują technologie, takie jak metalurgia proszków. Nowoczesna technologia pozwala tworzyć materiały kompozytowe z szeroką gamą wypełniaczy, które poprawiają właściwości tribologiczne czy mechaniczne materiałów [6-10].

W artykule przedstawione zostały wyniki badań nad materiałem kompozytowym na bazie tytanu do zastosowań w konstrukcjach biomedycznych, wytworzonym w Zakładzie Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej.

## Materiały i metodyka badań

Próbki kompozytów wykonane były metodą metalurgii proszków. Badano materiały kompozytowe na bazie tytanu z dodatkiem 10%<sub>obj</sub> grafitu (Ti+C). Proszki tytanu firmy Atlantic Equipment Engineers o czystości 99,7% i wielkości ziaren poniżej 150 μm i proszki grafitu o wielkości ziaren poniżej 40 μm mieszane były w młynku kulowo-odśrodkowym Pulverisette 6 przez 15 minut a następnie prasowane na zimno w matrycy pod ciśnieniem 600 MPa. Wypraski spiekane były w piecu rurowym, w atmosferze ochronnej przez 3 godziny w temperaturze 1230°C. Podczas spiekania zastosowano próżnię 10<sup>-5</sup> mbar. Spieki dognieciono obwiedniowo na prasie Marciniaka a następnie poddano obróbce cieplnej w temperaturze 1000°C przez jedną godzinę. Wykonano obserwację mikrostruktury złądów próbek porowatych materiałów implantacyjnych a także analizę składu chemicznego przy pomocy mikroskopu optycznego, a także skaningowego mikroskopu elektronowego HITACHI S-3000N. Badania twardości wykonano metodą Brinella. Badania mikrotwardości wykonano metodą Vickersa za pomocą głowicy Hanemanna na mikroskopie NEOPHOT 21.

# TITANIUM COMPOSITE – POTENTIAL IMPLANT BIOMATERIAL

PIOTR DEPTUŁA<sup>1</sup>, JAN R. DĄBROWSKI<sup>1</sup>, ANDRZEJ SOBOLEWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> BIAŁYSTOK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK, POLAND

E MAIL: JRD@PB.EDU.PL

<sup>2</sup> CHM, LEWICKIE 3B, 16-061 JUCHNOWIEC KOŚCIELNY, POLAND

E MAIL: CHM@CHM.EU

*[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 129-132]*

## Introduction

The most commonly used alloys in medicine are austenitic steels, cobalt alloys and titanium, and its alloys [1,2]. Among these materials, materials based on titanium are the most promising. The most often applied commercial titanium alloy used in alloplastics is the two-phase titanium alloy with aluminium and vanadium (Ti-6Al-4V) [1-5]. The use of titanium alloys as bearing surfaces in total human replacements is limited by very poor tribological properties and wear resistance. This is a serious fault on this type of implant alloys, which significantly limit their application in biotribological systems (joints, dental system) [11-12].

Numerous research studies on these materials are concentrated on modifying their mechanical and tribological properties [10-12]. Because of their properties, plastic forming and machining of titanium alloys are very difficult and that is why new technologies have been sought which would offer new possibilities to obtain more competitive titanium-based alloys and composites for biomedical application [6-10]. Modern technologies in production of biomaterials such as powder metallurgy are more and more widely applied. Furthermore, new technologies allow for creating composite materials with a wide range of fillers which improve tribological or mechanical properties of materials [6-10].

In this paper the results of research on composite material based on titanium for biomedical applications produced in the Department of Materials Science and Biomedical are presented.

## Materials and method

Specimens of composites were fabricated by means of the powder metallurgy method. The composite materials based on titanium powder with 10% volume fraction of graphite (Ti+C) were investigated. Commercially pure titanium powder Atlantic Equipment Engineers with the purity of 99.7% and particle size below 150 μm with graphite powders with the particle size below 40 μm were dry-mixed in a Pulverisette 6 ball mill for 15 minutes and cold pressed under the pressure of 600 MPa and then sintered in a pipe furnace in a protective atmosphere for 3 hours at the temperature of 1230°C. During sintering vacuum about 10<sup>-5</sup> mbar was applied. Specimens were pressed in envelope Marciniak press and then subjected to heat treatment at 1000°C for one hour. Observations of metallurgic samples of porous implant materials and analysis of chemical composition were made with an optical microscope and HITACHI S-3000N scanning microscope. Hardness was measured by Brinell method. Microtoughness of the obtained alloys was analyzed with the Vickers method with the use of a Hanemann head on NEOPHOT 21.

Parametry tribologiczne spieków badane były przy pomocy tribometru pin-on-disc. Współczynnik tarcia mierzony był przy maksymalnej wartości siły tarcia. Przeciwpórką były krążki ze stopu Ti-6Al-4V. Testy przeprowadzone były w środowisku wody destylowanej, w temperaturze pokojowej. Z uwagi na charakter próbek gotowe porowate materiały implantacyjne ściskane były na maszynie wytrzymałościowej INSTRON 8502, a następnie analizowane były krzywe ściskania.

Badania korozyjne metodą potencjodynamiczną wykonano z zastosowaniem zestawu do badań elektrochemicznych Atlas-Solich 9933 ELEKTROCHEMICAL INTERFACE. Badania odporności korozyjnej metodą impedancyjną przeprowadzono na urządzeniu AutoLab PGSTAT100. Próbkę badano w 0,5 M roztworze NaCl. Elektroda odniesienia była nasycona elektroda kalomelowa (NEK).

Porównano również interakcje biomateriał/komórka w hodowli pierwotnej ludzkich osteoblastów. Zastosowano szerokie spektrum metod badawczych, m.in. oceniano przyleganie komórek hodowli do próbek biomateriałów spiekanych, cytotoksyczność, żywotność komórek, ich aktywność wydzielniczą, prozapalną, a także oceniano morfologię komórek po 3 i 7 dniach testów.

## Wyniki i dyskusja

Uzyskane kompozyty na bazie tytanu z udziałem grafitu charakteryzowały się wysoką gęstością względną. Przy optymalnej temperaturze spiekania i czasie spiekania, które ustalono na podstawie wstępnych badań, uzyskano zagęszczalność powyżej 90%. Spowodowane jest to dobrymi właściwościami smarnymi grafitu podczas prasowania. Po dogniataniu obwiedniowym zagęszczalność uzyskanych materiałów sięgała 99%. Badania strukturalne materiałów ujawniły wieloskładnikową strukturę kompozytów. Widoczne były trzy fazy. Miękka tytanowa osnowa, pozostałości grafitu o udziale procentowym 2,6% oraz nowa faza będąca wynikiem interakcji osnowy i wypełniacza – węglików wtórnych (RYS. 1). Charakter materiału z fazą twardych węglików na miękkiej osnowie i pozostałości grafitu o dobrych właściwościach smarnych dawał przypuszczenie o dobrych właściwościach tribologicznych otrzymanych spieków.

Optymalna temperatura 1230°C pozwala na uzyskanie materiałów o twardości ok. 220 HB, gdzie twardość czystego tytanu wynosi ok. 84 HB. Mikrotwardość osnowy wynosiła średnio 350 HV<sub>0,1</sub>. Wyniki badań wytrzymałościowych przedstawione zostały w tabeli (RYS. 1). Widać, że materiały posiadają odpowiednią wytrzymałość na ściskanie i jednocześnie relatywnie niskie współczynniki sprężystości, co jest bardzo ważne w przypadku materiałów do zastosowań biomedycznych.

Tribological studies of the obtained sinters were carried out by means of a pin-on-disc tribometer. Friction coefficient was calculated from the maximum values of friction force to describe extreme resistances to motion. The counterspecimen in the form of a ring was made of Ti-6Al-4V alloy.

Tribological tests were carried out in distillation water environment in room temperature. Due to the nature of the samples, porous implantation materials were compressed with an INSTRON 8502 strength testing machine and further the compression curves were analysed.

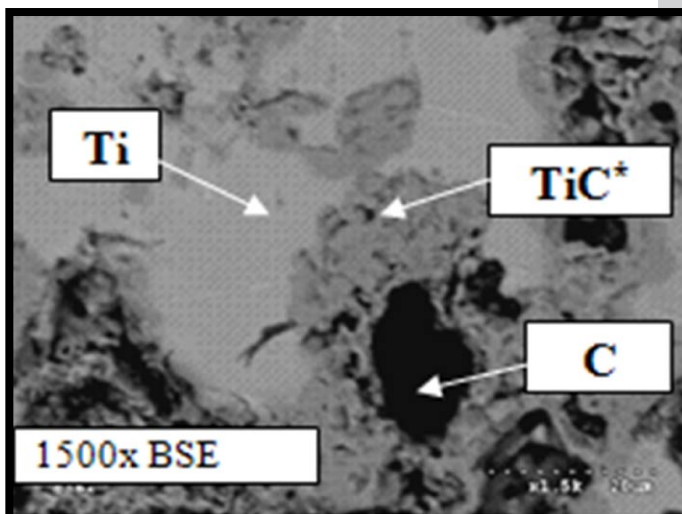
Potentiodynamic corrosion tests were performed by using a kit for electrochemical research Atlas-Solich 9933 ELEKTROCHEMICAL INTERFACE. Impedance corrosion tests were performed by using AutoLab PGSTAT100. Samples were tested in 0.5 M NaCl. Reference electrode was saturated calomel electrode (NEK).

We also compared the interaction biomaterial/cell in primary cultures of human osteoblasts. They were used a broad spectrum of research methods. Adhesion of culture cells were evaluated for samples sintered biomaterials, cytotoxicity, cell viability, their secretory activity, proinflammatory, and cell morphology was assessed after 3 and 7 days of testing.

## Results and discussion

The composites based on titanium with graphite were characterized by high relative density. At the optimum sintering temperature and sintering time, which are based on preliminary studies, were obtained compactibility than 90%. This is due to good lubrication properties of graphite during compaction. After envelope compaction obtained materials reached 99%. Structural studies have revealed a multi-material composite structure. Three phases were obtained. Soft titanium matrix, residual graphite a percentage of 2.6% and a new phase of the resulting interaction matrix and filler - secondary carbides (FIG. 1). The nature of the material with hard carbide phase in a soft matrix and the residual graphite with good lubricating give presumption of good tribological properties of obtained sinters.

The hardness of the composites largely depended on the sintering temperature. The optimum temperature of 1230°C allows to obtain materials with a hardness of about 220 HB, where the hardness of pure titanium is about 84 HB. Microhardness of matrix composites averaged 350 HV<sub>0,1</sub>. Results of strength tests are presented in the table (FIG. 1). One can see that the materials have sufficient compressive strength, while relatively low coefficients of elasticity, which is very important in the case of materials for biomedical applications.



Właściwości / Properties	Ti+10%C	Ti-6Al-4V www.veridiam.com
Twardość / Hardness	220 HB	334 HB
Mikrotwardość / Microhardness	350 HV <sub>0,1</sub>	-
RC [MPa]	1120	1000
R0,2 [MPa]	610	820
AC [%]	30	18
Moduł Younga / M. of elasticity [GPa]	80	114

RYS. 1. Mikrostruktura otrzymanego kompozytu oraz właściwości mechaniczne w porównaniu ze stopem handlowym.

FIG. 1. Microstructure of the obtained composite and the mechanical properties in comparison with the commercial alloy.

**TABELA 1. Charakterystyka korozyjna badanego materiału i stopu Ti-6Al-4V.****TABLE 1. Corrosion characteristics investigated material and the Ti-6Al-4V alloy.**

Materiał / Material	$E_{korL}$ [mV]	$I$ [ $\mu$ A]
Ti-6Al-4V	-267	0.0497
Ti+10%C	-157	1.28

W TABELI 1 zestawiono wartości potencjałów korozyjnych i prądów korozji obliczone metodą ekstrapolacji odcinków krzywych anodowej i katodowej z wykorzystaniem programu POL-99. W przypadku spieków porowatych trudno jest oszacować rzeczywistą powierzchnię spieku, co uniemożliwia porównanie gęstości prądu dla materiałów spiekanych i litego stopu. Dlatego też w tabelce zostały umieszczone wartości natężenia prądu. Uzyskane wyniki wskazują na odpowiednie właściwości korozyjne nowych materiałów otrzymanych metodą MP. Wartości natężenia prądu dla kompozytu jest na akceptowalnym poziomie.

Wyniki badań tribologicznych wskazują na dobre właściwości otrzymanych kompozytów do zastosowań biomedycznych. Kompozyty charakteryzowały się niższymi współczynnikami tarcia i wyższą odpornością na zużycie niż materiały handlowe. Współczynnik tarcia był prawie dwa razy mniejszy niż próbek z czystego tytanu i niższy niż dla stopu handlowego (TABELA 2). Jest to istotna zaleta tych materiałów, daje to możliwość zastosowania ich, jako pary tarciove w konstrukcjach biomedycznych.

Wyniki badań biologicznych (in vitro) otrzymanych materiałów wskazują na bardzo dobre cechy. Badania przylegania komórek wykazały niższe przyleganie na badanym kompozycie niż na materiale handlowym – stopie Ti-6Al-4V. Test cytotoxycznosci nie wskazał różnic między materiałami handlowymi a otrzymanymi kompozytami. Żywotność komórek NHOst oznaczona testem Vialight w 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni kontrolnej TCPS oraz na powierzchniach kompozytu była prawie dwukrotnie niższa niż na stopie tytanu handlowym (TABELA 3).

**TABELA 3. Wyniki badań in vitro (NHOst 7 dni).****TABLE 3. Results of biological tests (NHOst 7 days).**

Materiał / Material	Przyleganie komórek / Cell adhesion CV [OD]	Cytotoksyczność / Cytotoxicity Luminescence [CPS]	Żywotność / Vitality Lum. [CPS]	Tlenek azotu / Nitric Oxide NO [OD]	Białko / Protein [OD]
Ti+C	0.1	4200	16000	0.07	0.8
Ti-6Al-4V	0.15	4200	35000	0.055	0.65

Ze względu na obiecujące właściwości opracowany w Zakładzie Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej nowy materiał biomedyczny zastosowany został, przy współpracy z firmą ChM Lewickie, jako element dynamicznego stabilizatora biodrowego (RYS. 2).

Badana jest trwałość zmęczeniowa i odporność na zużycie tego elementu. Wyniki tych badań będą przedmiotem dalszych publikacji.

In TABLE 1 summarized the corrosion potentials and corrosion currents calculated by extrapolation of anodic sections and cathodic curves using the POL-99. In the case of porous sinters it is difficult to estimate the actual surface of the sinter, which makes it impossible to compare the current density for sintered materials and solid alloy. Therefore, in the table were placed the current value. The results indicate suitable corrosion properties of new materials received by PM. Current value for the composite is at an acceptable level.

The results show good tribological properties of the obtained composites for biomedical applications. The composites were characterized by lower coefficients of friction and higher wear resistance than the commercial materials. The coefficient of friction was almost two times smaller than the pure titanium and lower than the commercial alloy (TABLE 2). This is an important advantage for this materials, this gives the possibility to use them as a pair of friction in the construction of biomedical research.

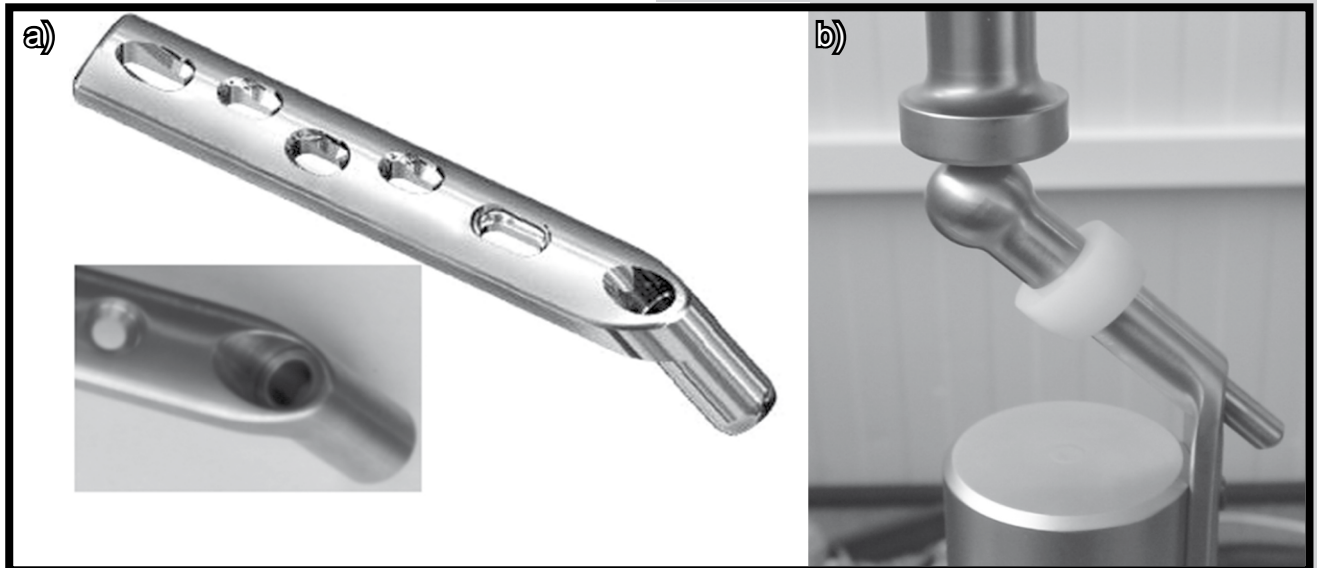
**TABELA 2. Współczynniki tarcia i zużycie badanych kompozytów.****TABLE 2. The friction coefficients and wear of composites.**

Materiał / Material	Współczynniki tarcia / Friction coefficient	Zużycie / Linear wear [ $\mu$ m]
Ti+C	0.35	16.6
Ti-6Al-4V	0.44	20.1
Pure Ti	0.65	30.4

Results of biological tests (in vitro) of obtained materials shows very good qualities. The study showed lower adhesion of cells to the composite than the commercial material - alloy Ti-6Al-4V. Cytotoxicity test showed no differences between the materials and the obtained composite trading. Cell viability test indicated NHOst Vialight at 3 and 7 day culture on TCPS control surfaces and surfaces of the composite was almost twice lower than the rate of commercial titanium (TABLE 3).

Due to the promising properties developed in the Department of Materials Science and Biomedical new biomedical material was used, in cooperation with ChM Lewickie, as part of a dynamic hip stabilizer (FIG. 2).

The fatigue strength and wear resistance of the element are examined. The results of these studies will be the subject of further publications.



**RYS. 2. Kompozyt w DSB: a) widok ogólny, b) stanowisko badawcze.**  
**FIG. 2. Composite material in DSB: a) general view, b) test stand.**

## Wnioski

Otrzymane wyniki świadczą, że opracowany w Zakładzie Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej nowy materiał do zastosowań biomedycznych charakteryzuje się korzystnymi cechami biofunkcyjnymi. W wielu przypadkach kompozyt na bazie tytanu z dodatkiem grafitu jest lepszy od materiałów handlowych szeroko stosowanych w medycynie. Kompozyty charakteryzują się dobrymi właściwościami tribologicznymi. Potwierdzeniem wszystkich badań laboratoryjnych okazały się wyniki badań w aplikacjach, gdzie opracowany materiał z powodzeniem wykorzystany został przy współpracy z zakładem ChM Lewickie w konstrukcjach biomedycznych. Wyniki tych badań potwierdziły bardzo dobre właściwości otrzymanych kompozytów i będą wkrótce opublikowane.

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana w ramach projektu NR15-0117-10 NCBR.*

## Conclusion

Obtained results shows that developed in the Department of Materials Science and Biomedical new material for biomedical applications is characterized by the beneficial biofunctional features. In many cases, a composite based on titanium with the addition of graphite is better than the commercial materials widely used in medicine. Composites are characterized by good tribological properties. Confirmation of all laboratory tests were the results of research in applications where the material developed was used successfully in cooperation with the plant ChM Lewickie in biomedical structures. The results of these studies confirmed the excellent properties of the composites and will be published soon.

## Acknowledgements

*This work was supported by grant number NR15-0117-10 NCBR.*

## Piśmiennictwo

- [1] Long M., Rack H.J.: Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective, *Biomaterials*, 19 (1998): 1621-1639.
- [2] Niinomi Mitsuo: Mechanical properties of biomedical titanium alloys, *Materials Science and Engineering*, A243 (1998), 231-236.
- [3] Eliopoulos D., Zinelis S., Papadopoulos T.: Porosity of cpTi casting with four different casting machines, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 4 (2004) Vol. 92, 377-381.
- [4] Semiatin S.L., Seetharaman V., Weiss I.: Hot workability of titanium and titanium aluminide alloys - an overview, *Materials Science and Engineering*, A243 (1998), 1-24.
- [5] Seagle S.R., Yu K.O., Giangordano S.: Consideration in processing titanium, *Materials Science and Engineering A243* (1999), 237-242.
- [6] Fujita T., Ogawa A., Ouchi Ch., Tajima H.: Microstructure and properties of titanium alloy produced in the newly developed blended elemental powder metallurgy process, *Materials Science and Engineering*, A213 (1996), 148-153.

## References

- [7] Henriques V.A.R., Bellinati C.E., da Silva C.R.M.: Production of Ti-6%Al-7%Nb alloy by powder metallurgy (P/M), *Journal of Materials Processing Technology*, 118 (2001), 212-215.
- [8] Azevedo C.R. F., Rodrigues D., Beneduce Neto F.: Ti-Al-V powder metallurgy (PM) via the hydrogenation – dehydrogenation (HDH) process, *Journal of Alloys and Compounds*, 353 (2003), 217-227.
- [9] Broomfield R.W., Turner N.G., Leat B. I.: Application of advanced powder process technology to titanium aeroengine components, *Powder Metallurgy*, 1 (1985) Vol.28.
- [10] Hagiwara M., Kim S. J., Emura S.: Blended elemental P/M synthesis of Ti-6Al-1.7Fe-0.1Si alloy with improved high cycle fatigue strength, *Scripta Materialia*, 39 (1998), 1185-1190.
- [11] Anokhin V.M., Ivasishin O.M., Petrunko A.N.: Structure and properties of sintered titanium alloyed with aluminium, molybdenum and oxygen, *Materials Science and Engineering*, A243 (1998), 269-272.
- [12] Kim Y. J., Kang S. J. L.: In situ formation of titanium carbide in titanium powder compacts by gas–solid reaction, *Composites*, A32 (2001): 731-738.



# WPLÝW WARSTW $TiO_2$ OTRZYMYWANYCH METODĄ ZOL-ŻEL NA WŁAŚCIWOŚCI KOROZYJNE BIOMEDYCZNEGO STOPU M30NW W ROZTWORZE 0,9% NaCl

BARBARA BURNAT\*, TADEUSZ BŁASZCZYK, ANDRZEJ LENIART, HENRYK SCHOLL

KATEDRA CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ,  
WYDZIAŁ CHEMII, UNIWERSYTET ŁÓDZKI,  
UL. TAMKA 12, 91-403 ŁÓDŹ

\* E-MAIL: BURNAT@OP.PL

## Streszczenie

Zbadano wpływ warstw ditlenku tytanu  $TiO_2$  otrzymanych metodą zol-żel na właściwości korozyjne biomedycznego stopu M30NW. Próbkę z naniesionymi warstwami  $TiO_2$  były wygrzewane w czterech temperaturach 200, 400, 600 i 800°C. Badania korozyjne z wykorzystaniem metod elektrochemicznych przeprowadzono w odtlenionym roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl) w temperaturze 37°C. Badania te wykonywane były dla próbek świeżo przygotowanych oraz dla próbek poddanych 30-dniowej ekspozycji w roztworze soli fizjologicznej. Wyniki przeprowadzonych badań korozyjnych porównano z analogicznymi wynikami uzyskanymi dla próbek stopu bez modyfikacji powierzchni. Stwierdzono, że wpływ warstw na właściwości korozyjne biomedycznego stopu M30NW jest uzależniony od temperatury wygrzewania tych warstw. Uzyskane wyniki badań wskazują, że najlepszą odporność korozyjną wykazują próbki stopu modyfikowane warstwą  $TiO_2$  w temperaturze 400°C, podczas gdy stosowanie wyższych temperatur (600 i 800°C) powoduje osłabienie odporności korozyjnej stopu.

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 133-139]

## Wprowadzenie

Stale biomedyczne od wielu lat są stosowane jako materiał na implanty. Rozwój techniczny prowadzi do uzyskiwania coraz to nowszych stali biomedycznych, charakteryzujących się coraz lepszymi właściwościami fizykochemicznymi i w konsekwencji lepszą biokompatybilnością i dłuższym „czasem życia”. W celu dodatkowego polepszenia właściwości stali biomedycznych (w tym: mechanicznych, korozyjnych, biotolerancji, itp.) ich powierzchnia poddawana jest modyfikacjom, np. poprzez nanoszenie różnego rodzaju pokryć, w tym pokryć ceramicznych. Jako powłoka ochronna na biomateriałach metalicznych zastosowanie znajduje ditlenek tytanu  $TiO_2$  [1,2]. Wykazuje on dużą biozgodność, odporność na korozję i na ścieranie. Jedną z wielu dostępnych i stosowanych metod modyfikacji powierzchni biomateriałów jest metoda zol-żel [3,4]. Umożliwia ona wytwarzanie różnorodnych ochronnych powłok tlenkowych, w tym  $TiO_2$ ,  $SiO_2$  i  $Al_2O_3$  [1,2,5-7], jak też powłok hydroksyapatytu [8]. Technika zol-żel pozwala uzyskać warstwy w warunkach niskotemperaturowych z różnych prekursorów. Zaletą techniki zol-żel jest możliwość stosowania próbek o różnych kształtach oraz możliwość kontrolowania parametrów powierzchni takich jak skład, grubość i topografia [3].

# THE EFFECT OF $TiO_2$ SOL-GEL LAYERS ON CORROSION PROPERTIES OF M30NW BIOMEDICAL ALLOY IN 0.9% NaCl SOLUTION

BARBARA BURNAT\*, TADEUSZ BŁASZCZYK, ANDRZEJ LENIART, HENRYK SCHOLL

DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,  
FACULTY OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,  
TAMKA 12, 91-403 ŁÓDŹ, POLAND

\* E-MAIL: BURNAT@OP.PL

## Abstract

The effect of titanium dioxide  $TiO_2$  layers obtained by sol-gel method on the corrosion properties of M30NW biomedical alloy was investigated. The samples of alloy with  $TiO_2$  sol-gel layers were annealed at temperatures of 200, 400, 600 and 800°C. Corrosion measurements using electrochemical methods were carried out in deoxygenated physiological saline solution (0.9% NaCl) at temperature of 37°C. These investigations were performed for freshly prepared samples and samples subjected to 30-day exposure in saline solution. The results of corrosion research were compared with the corresponding results obtained for samples of the alloy without surface modification. It was found that the influence of  $TiO_2$  sol-gel layers on the corrosion properties of M30NW biomedical alloy depends on the annealing temperature of these layers. Obtained results indicate that the best corrosion resistance is shown by the samples of alloy modified by  $TiO_2$  layer at temperature of 400°C, while the use of higher annealing temperatures (600 and 800°C) causes decreasing of corrosion resistance of alloy.

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 133-139]

## Introduction

Biomedical steels for many years are used as material for implants. Technological development leads to getting constantly innovating biomedical steels characterized by better physicochemical properties and consequently, better biocompatibility and longer “lifetime”. In order to further improve the properties of biomedical steels (including mechanical and corrosive properties, biotolerance, etc.), their surface is subjected to modification, for example by applying different types of coatings, including ceramic ones. As a protective coating on metallic biomaterials there is applied titanium dioxide  $TiO_2$  [1,2]. It exhibits high biocompatibility, resistance to corrosion and abrasion. One of the many available and used methods of biomaterials’ surface modification is the sol-gel method [3,4]. It allows to produce various protective oxide coatings including  $TiO_2$ ,  $SiO_2$  and  $Al_2O_3$  [1,2,5-7], as well as hydroxyapatite coatings [8]. Sol-gel technique allows to obtain a coating in low temperature conditions from different precursors. The advantage of sol-gel technique is the possibility of using samples of various shapes and the possibility of controlling the surface parameters such as composition, thickness and topography [3].

Celem tej pracy było określenie wpływu warstw  $\text{TiO}_2$  uzyskanych metodą zol-żel na właściwości korozyjne stopu biomedycznego M30NW. Cel ten realizowano poprzez wykonanie badań korozyjnych metodami elektrochemicznymi w roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl) dla próbek tego stopu z naniesioną warstwą  $\text{TiO}_2$  i wygrzanych w temperaturach z zakresu 200-800°C. Wspomniane badania wykonywane były dla próbek świeżo przygotowanych oraz dla próbek poddanych 30-dniowej ekspozycji w roztworze soli fizjologicznej. Wyniki przeprowadzonych badań korozyjnych porównano z analogicznymi wynikami uzyskanymi dla próbek stopu bez modyfikacji powierzchni. Efekty zmian korozyjnych określono z wykorzystaniem mikroskopii optycznej.

## Materiały i metodyka badań

Próbki badanego stopu M30NW (AUBERT & DUVAL, Francja) miały kształt walców o średnicy 22 mm i grubości ok. 3 mm. Stop ten spełnia wymogi normy ISO 5832-9 [9]. Jego skład (% wag.) według certyfikatu producenta jest następujący: Cr (20,62), Ni (9,53), Mn (4,13), Mo (2,12), N (0,40), Nb (0,31), C (0,032) i Fe (reszta).

Powierzchnie próbek stopu były szlifowane na papierze ściernym SiC, polerowane mechanicznie na zawieszinie  $\text{Al}_2\text{O}_3$  i oczyszczane w myjce ultradźwiękowej. W ostatnim etapie procedury przygotowawczej powierzchnie próbek były czyszczone chemicznie w mieszaninie zawierającej 2% HF, 10%  $\text{HNO}_3$  i 88%  $\text{H}_2\text{O}$  [10] i następnie poddawane pasywowaniu poprzez gotowanie w wodzie przez 10 min. Roztwór zolu sporządzony był na bazie izopropylanu tytanu (IV)  $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$  (Sigma-Aldrich) jako prekursora z dodatkiem HCl jako katalizatora wg preparatyki podanej w [11]. Warstwy  $\text{TiO}_2$  nanoszono z wykorzystaniem techniki zanurzeniowej przy użyciu dip-coatera typu DCMono 75 (NIMA Technology). Próbki zanurzano w zolu na 30 s, po czym wynurzano je z szybkością  $20 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Po naniesieniu pojedynczej warstwy, próbki suszono przez 2 godziny w temperaturze  $100^\circ\text{C}$  w piecu laboratoryjnym (NEOTERM KXP 3). Następnie wysuszone warstwy wygrzewano przez 1 godzinę w czterech temperaturach: 200, 400, 600 i  $800^\circ\text{C}$ . Szybkość wzrostu temperatury w piecu wynosiła  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Zastosowane warunki pozwoliły na uzyskanie warstw  $\text{TiO}_2$  o grubości ok. 30 nm i o różnicowanej strukturze krystalicznej. Przed pomiarami elektrochemicznymi próbki przemywano alkoholem etylowym i osuszano Ar. Pomiary korozyjne przeprowadzono w odtlenionym roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl) w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Ocena właściwości korozyjnych stopu M30NW przeprowadzona została z zastosowaniem klasycznych metod elektrochemicznych (pomiar potencjału korozyjnego  $E_{\text{cor}}$  w otwartym obwodzie, metoda Stern - Geary'ego, metoda elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej i metoda charakterystyki potencjodynamicznej w szerokim zakresie polaryzacji) z użyciem potencjostatu - galvanostatu PGSTAT 30/1 (Autolab). Wspomniane badania wykonywane były dla próbek świeżo przygotowanych (dzień 0) oraz dla próbek poddanych 30-dniowej ekspozycji w roztworze soli fizjologicznej (dzień 30). Przedstawiane w pracy wyniki są uśrednionymi wartościami z pomiarów 4 próbek. Wszystkie wartości potencjałów odniesione są względem stosowanej elektrody kalomelowej w nasyconym roztworze NaCl ( $E^\circ = 0,236 \text{ V}$  wzgl. NEW). Z kolei wszystkie wartości prądowe przeliczone zostały na jednostkę powierzchni (powierzchnia robocza próbek ok.  $0,64 \text{ cm}^2$ ). Charakter zmian korozyjnych powstających na badanych próbkach został określony z zastosowaniem optycznego mikroskopu metalograficznego METAR (PZO).

The aim of this study was to determine the effect of  $\text{TiO}_2$  sol-gel layers on corrosion properties of M30NW biomedical alloy. This objective was realized through the execution of corrosion investigations using electrochemical methods in physiological saline (0.9% NaCl) for alloy samples coated with a layer of  $\text{TiO}_2$  and annealed within the temperature range of 200-800°C. These investigations were performed for freshly prepared samples and samples subjected to 30-day exposure in saline solution. The results of corrosion research were compared with the corresponding results obtained for samples of the alloy without surface modification. The effects of corrosion were determined using optical microscopy.

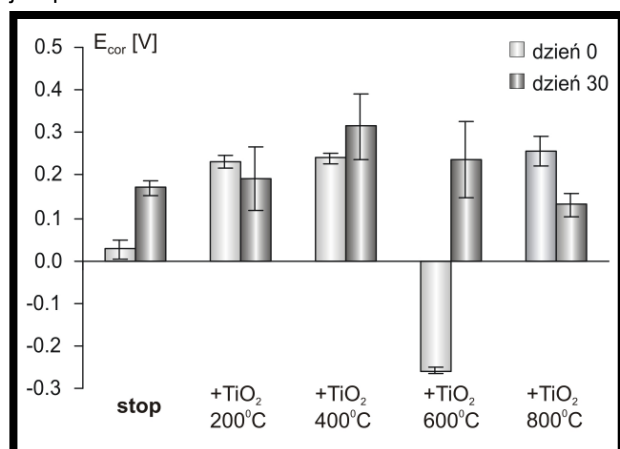
## Materials and methodology

Samples of investigated M30NW alloy (AUBERT & DUVAL, France) had the shape of cylinders with a diameter of 22 mm and a thickness of about 3 mm. This alloy meets the requirements of ISO 5832-9 standard [9]. Its composition (% wt.) according to manufacturer's certificate is as follows: Cr (20.62), Ni (9.53), Mn (4.13), Mo (2.12), N (0.40), Nb (0.31), C (0.032) and Fe (rest).

The surfaces of the alloy samples were grinded on SiC abrasive paper, mechanical polished on  $\text{Al}_2\text{O}_3$  slurry and cleaned in an ultrasonic bath. In the last stage of preparation procedure the samples surfaces were chemically cleaned in a mixture containing 2% HF, 10%  $\text{HNO}_3$  and 88%  $\text{H}_2\text{O}$  [10] and then passivated by boiling in water for 10 minutes. Sol solution was prepared based on titanium (IV) isopropoxide  $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$  (Sigma-Aldrich) as a precursor with the addition of HCl as a catalyst according to [11].  $\text{TiO}_2$  layers were applied by dip-coating technique using a dip-coater DCMono 75 (NIMA Technology). The samples were immersed in the sol for 30 s, and then were withdrawn with a speed of  $20 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . After applying a single layer, the samples were dried for 2 hours at  $100^\circ\text{C}$  in a laboratory furnace (NEOTERM KXP 3). Next the dried layers were annealed for 1 hour at four temperatures: 200, 400, 600 and  $800^\circ\text{C}$ . The furnace heating rate was  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Applied conditions allowed to obtain  $\text{TiO}_2$  layers with a thickness of about 30 nm and different crystal structure. Before electrochemical measurements samples were rinsed with ethanol and dried with Ar. Corrosion measurements were carried out in deoxygenated physiological saline solution (0.9% NaCl) at temperature of  $37^\circ\text{C}$ . Evaluation of corrosion properties of M30NW alloy was carried out using classical electrochemical methods (measurement of corrosion potential in open circuit  $E_{\text{cor}}$ , the Stern - Geary's method, electrochemical impedance spectroscopy and potentiodynamic characteristic in wide polarization range) with a potentiostat - galvanostat PGSTAT 30/1 (Autolab). The measurements were performed for freshly prepared samples (day 0) and for samples subjected to 30-day exposure to physiological saline (day 30). The results presented in this paper are averaged values obtained from measurements of 4 samples. All potentials are given versus used calomel electrode in saturated NaCl solution ( $E^\circ = 0.236 \text{ V}$  vs. SHE). All current values are converted per surface area (working area of each sample was ca.  $0.64 \text{ cm}^2$ ). The corrosion effects on investigated samples were determined using metallographic optical microscope METAR (PZO).

## Wyniki

Pomiary korozyjne próbek stopu M30NW rozpoczęto od pomiaru potencjału korozyjnego  $E_{cor}$ . Wyznaczone średnie wartości potencjału korozyjnego świeżo przygotowanych próbek stopu M30NW (dzień 0) oraz próbek stopu po 30-dniowej ekspozycji w roztworze 0,9% NaCl (dzień 30) wraz z odchyleniami standardowymi dla wszystkich rodzajów próbek zestawiono na RYS. 1.



**RYS. 1.** Wartości potencjału korozyjnego próbek stopu M30NW z warstwami TiO<sub>2</sub> przed i po 30-dniowej ekspozycji w roztworze 0,9% NaCl.

**FIG. 1.** The values of corrosion potential of M30NW alloy samples with TiO<sub>2</sub> layers before and after the 30-day exposure in 0.9% NaCl solution.

Analizując dane przedstawione na RYS. 1 można stwierdzić, że naniesienie warstwy TiO<sub>2</sub> na stop M30NW powoduje zmianę wartości jego potencjału korozyjnego. W zależności od temperatury wygrzewania warstw TiO<sub>2</sub> wpływ ten jest różny. Wartości potencjału korozyjnego w dniu 0 próbek z warstwą TiO<sub>2</sub> wygrzaną w temperaturach 200, 400 i 800°C są wyższe o ok. 0,2 V w porównaniu do potencjału  $E_{cor}$  stopu bez modyfikacji powierzchni. Z kolei wygranie próbek z warstwą TiO<sub>2</sub> w temperaturze 600°C powoduje znaczne obniżenie ich wartości  $E_{cor}$  – o ok. 0,28 V w stosunku do próbek stopu bez warstw TiO<sub>2</sub>.

Różne są również właściwości korozyjne tych próbek po ich 30-dniowej ekspozycji w roztworze pomiarowym. W przypadku próbek stopu M30NW bez warstw stwierdzono wzrost wartości potencjału korozyjnego  $E_{cor}$  o ok. 0,15 V w stosunku do próbek świeżo przygotowanych. Wzrost potencjału tych próbek jest najprawdopodobniej efektem tworzenia się warstewki pasywnej na powierzchni stopu w wyniku kontaktu z roztworem. Dla próbek z warstwami TiO<sub>2</sub> 30-dniowa ekspozycja w roztworze 0,9% NaCl w różny sposób wpływa na wartość potencjału korozyjnego. Wpływ ten jest zależny od temperatury wygrania tych warstw. Najbardziej widoczną zmianę obserwuje się dla próbek z naniesioną warstwą TiO<sub>2</sub> wygrzaną w temperaturze 600°C, dla której po 30-dniowym pobycie w roztworze korozyjnym wartość  $E_{cor}$  wzrosła o ok. 0,5 V. Wzrost potencjału korozyjnego obserwuje się również dla próbek z warstwą TiO<sub>2</sub> wygrzaną w 400°C. Natomiast w przypadku próbek z warstwą otrzymywaną w 200 i 800°C po 30 dniach obserwuje się spadek wartości potencjału korozyjnego.

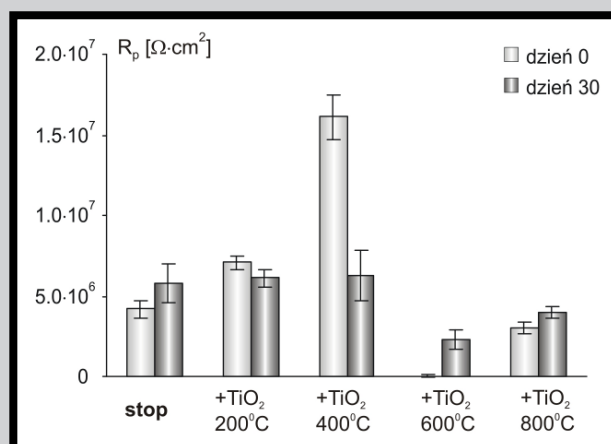
Z nachylenia zarejestrowanych charakterystyk Stern-Geary'ego wyznaczono wartości oporu polaryzacyjnego  $R_p$  dla wszystkich badanych typów próbek (RYS. 2). Następnie w oparciu o normę ASTM G102-89 obliczono wartości szybkości korozji CR (RYS. 3).

## Results

Corrosion measurements of M30NW alloy samples began with measuring the corrosion potential  $E_{cor}$ . Determined average values of corrosion potential of freshly prepared alloy samples (day 0) and samples of the alloy after 30-day exposure in 0.9% NaCl solution (day 30) along with standard deviations for all samples are summarized in FIG. 1.

Analyzing the data shown in FIG. 1 it can be stated that deposition of TiO<sub>2</sub> layer onto M30NW alloy changes the values of its corrosion potential. Depending on the annealing temperature of TiO<sub>2</sub> layers this effect is different. At day 0 the values of corrosion potential of samples with TiO<sub>2</sub> layer annealed at temperatures of 200, 400 and 800°C are higher by about 0.2 V compared to  $E_{cor}$  potential of the alloy without surface modification. Whereas annealing the samples with TiO<sub>2</sub> layer at 600°C causes significant reduction in value of  $E_{cor}$  - by about 0.28 V compared to alloy samples without TiO<sub>2</sub> layers. Different corrosion properties have also the samples after their 30-day exposure in corrosion solution. In the case of M30NW alloy samples without the layers it was stated that corrosion potential  $E_{cor}$  increase by about 0.15 V in relation to freshly prepared samples. The increase of potential of these samples is most probably the result of the formation of passive film on the surface of the alloy in contact with the solution. For samples with TiO<sub>2</sub> layers the 30-day exposure in 0.9% NaCl solution in different ways affects the value of corrosion potential. This influence is dependent on the annealing temperature of these layers. The most visible change is observed for samples coated with TiO<sub>2</sub> layer annealed at 600°C, for which the 30-day exposure in corrosion solution the  $E_{cor}$  value increased by about 0.5 V. The increase of corrosion potential is also observed for samples with TiO<sub>2</sub> layer annealed at 400°C. Whereas for samples with a layer obtained at 200 and 800°C after 30 days a decrease in the corrosion potential is observed.

From the slope of the registered Stern - Geary's characteristics there were determined values of polarization resistance  $R_p$  for all types of investigated samples (FIG. 2). Then, the values of corrosion rate CR were calculated (FIG. 3) based on the standard ASTM G102-89.



**RYS. 2.** Wartości oporu polaryzacyjnego próbek stopu M30NW z warstwami TiO<sub>2</sub> przed i po 30-dniowej ekspozycji w roztworze 0,9% NaCl.

**FIG. 2.** The values of polarization resistance of M30NW alloy samples with TiO<sub>2</sub> layers before and after the 30-day exposure in 0.9% NaCl solution.

Świeżo przygotowane próbki stopu M30NW bez modyfikacji powierzchni charakteryzują się oporem polaryzacyjnym  $R_p$  rzędu  $4 \cdot 10^6 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$  i szybkością korozji CR rzędu  $6,5 \cdot 10^{-5} \text{ mm} \cdot \text{rok}^{-1}$ . Modyfikacja ich powierzchni warstwą  $\text{TiO}_2$  wpływa na zmianę wartości tych parametrów korozyjnych. Z punktu widzenia wartości oporu polaryzacyjnego i szybkości korozji lepszymi właściwościami korozyjnymi charakteryzują się próbki stopu z warstwami uzyskanymi w niższych temperaturach tj., 200 i 400°C – próbki te mają wyższą wartość  $R_p$  i niższą wartość CR w porównaniu do próbek bez warstw. Z kolei modyfikacja powierzchni warstwami uzyskanymi w wyższych temperaturach tj. 600 i 800°C powoduje pogorszenie właściwości korozyjnych stopu M30NW w roztworze 0,9%

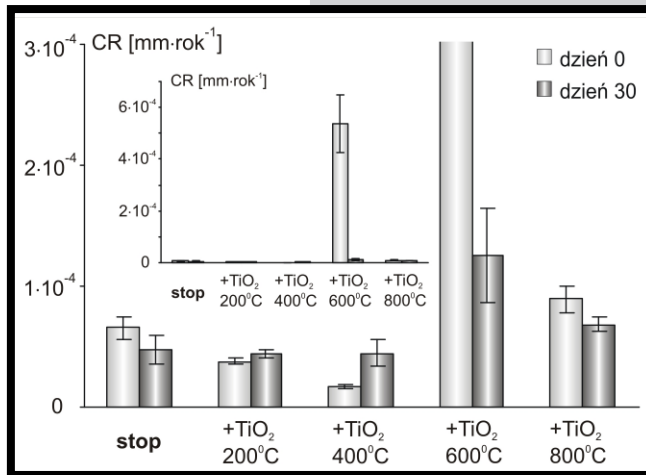
NaCl. Szczególnie negatywny wpływ warstw  $\text{TiO}_2$  widoczny jest w przypadku zastosowania temperatury ich wygrzewania równej 600°C – próbki z taką warstwą charakteryzują się ok. 80-krotnie wyższą wartością  $R_p$  i 80-krotnie niższą CR w porównaniu do próbek bez warstw.

W wyniku 30-dniowej ekspozycji próbek stopu M30NW w roztworze 0,9% NaCl wartości oporu polaryzacji i szybkości korozji tych próbek uległy zmianie. Z punktu widzenia tych wielkości korozyjnych, spośród wszystkich badanych rodzajów próbek najgorszą odpornością korozyjną po 30-dniowej ekspozycji w roztworze 0,9% NaCl charakteryzują się próbki z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzaną w temperaturze 600°C, pomimo iż właściwości ochronne tych próbek znacznie wzrosły w wyniku kontaktowania się ich z roztworem. Najbardziej odporne korozyjnie są natomiast próbki stopu M30NW z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzewaną w temperaturze 400°C mimo, że ich właściwości korozyjne pogorszyły się w wyniku przebywania przez 30 dni w roztworze 0,9% NaCl. Praktycznie niezmienną odporność korozyjną wykazują próbki z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzaną w temperaturze 200°C.

Badanie właściwości korozyjnych stopu M30NW z warstwami  $\text{TiO}_2$  w roztworze 0,9% NaCl oceniano także poprzez pomiary impedancyjne. Wyniki tych pomiarów przedstawiono są w postaci diagramów Nyquista na RYS. 4.

Wyniki impedancyjne dla próbek świeżo przygotowanych (RYS. 4a) potwierdzają stwierdzone wcześniej odmienne właściwości korozyjne próbek z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzaną w temperaturze 600°C. Na powiększonym wycinku wykresu Nyquista widoczne jest dla tych próbek charakterystyczne półkole, świadczące o reakcji (procesie korozyjnym) zachodzącej na powierzchni próbki. Półkole tego nie obserwuje się po 30-dniowym kontakcie tych próbek z roztworem korozyjnym (RYS. 4b), a kształt charakterystyki impedancyjnej zbliżony jest do charakterystyk wszystkich pozostałych badanych rodzajów próbek. Charakterystyki impedancyjne próbek stopu M30NW bez warstw i z warstwami  $\text{TiO}_2$  wygrzanymi w temperaturach 200, 400 i 800°C nie wykazują znaczących zmian przebiegu spowodowanych ekspozycją na działanie roztworu korozyjnego.

Kształt charakterystyk potencjodynamicznych rejestrowanych w szerokim zakresie polaryzacji anodowej dla wszystkich badanych rodzajów próbek jest typowy dla korozji lokalnej (RYS. 5).



**RYS. 3. Wartości szybkości korozji próbek stopu M30NW z warstwami  $\text{TiO}_2$  przed i po 30-dniowej ekspozycji w roztworze 0,9% NaCl.**  
**FIG. 3. The values of corrosion rate of M30NW alloy samples with  $\text{TiO}_2$  layers before and after the 30-day exposure in 0.9% NaCl solution.**

Freshly prepared samples of M30NW alloy without surface modification are characterized by a polarization resistance  $R_p$  of about  $4 \cdot 10^6 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$  and corrosion rate CR about  $6.5 \cdot 10^{-5} \text{ mm} \cdot \text{year}^{-1}$ . Modification of their surface by  $\text{TiO}_2$  layer alters the values of these corrosion parameters. From the viewpoint of the values of polarization resistance and corrosion rate, better corrosion properties have the alloy samples with the layers obtained at lower temperatures, i.e. 200 and 400°C - these samples have a higher  $R_p$  value and a lower value of CR compared to samples without layers. While the surface modification by the layers obtained at higher temperatures, i.e. 600

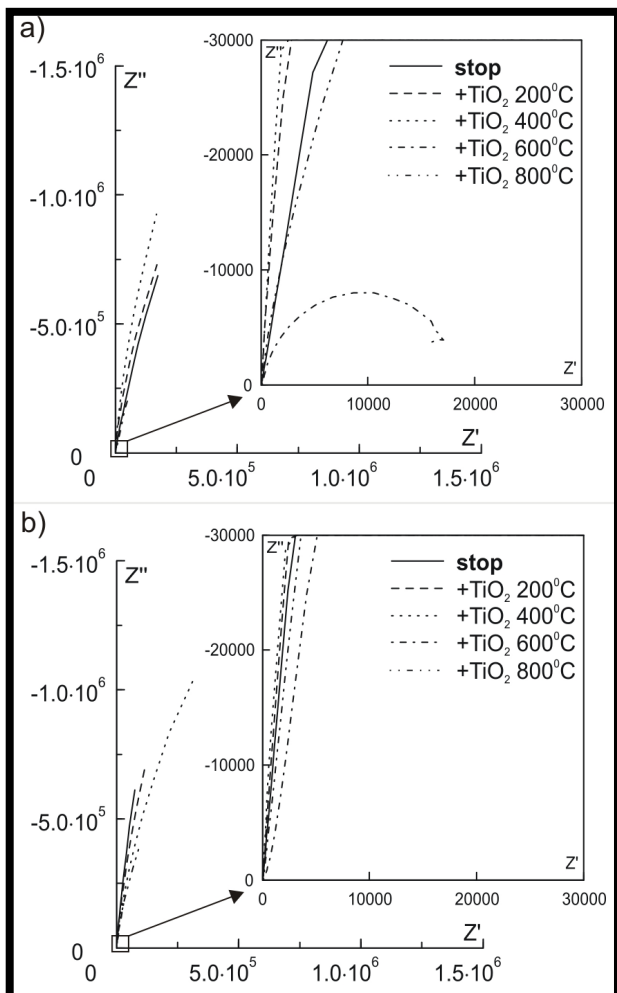
and 800°C causes the deterioration of corrosion properties of M30NW alloy in 0.9 % NaCl solution. Particularly negative effect of  $\text{TiO}_2$  layers is visible in case of application the annealing temperature of 600°C - samples with this layer are characterized by approximately 80-times higher value of  $R_p$  and 80-times lower value of CR compared to samples without layers.

As a result of 30-day exposure of M30NW alloy samples in 0.9% NaCl solution, the values of polarization resistance and corrosion rate of the samples have changed. From the perspective of these corrosion parameters, among all investigated types of samples the worst corrosion resistance after the 30-day exposure in 0.9% NaCl solution has a sample with  $\text{TiO}_2$  layer annealed at temperature of 600°C, although their protective properties significantly increased due to contacting the sample with a solution. Whereas the most corrosion resistant are the M30NW alloy samples with  $\text{TiO}_2$  layer annealed at 400°C, although their corrosion properties have deteriorated as a result of 30-day exposure in 0.9% NaCl solution. The corrosion resistance of samples with  $\text{TiO}_2$  layer annealed at 200°C remained practically unchanged.

Determination of corrosion properties of M30NW alloy with  $\text{TiO}_2$  layers in 0.9% NaCl solution was also assessed by measuring the impedance. The results of these measurements are presented in the form of Nyquist's diagrams in FIG. 4.

Impedance results for freshly prepared samples (FIG. 4a) confirm the previously stated different corrosion properties of samples with  $\text{TiO}_2$  layer annealed at temperature of 600°C. In the zoomed fragment of the Nyquist's diagram is shown for those samples characteristic semicircle, demonstrating the reaction (corrosion process) occurring on the sample surface. This semicircle is not observed after the 30-day contact of samples with a corrosive solution (FIG. 4b), and the shape of impedance characteristic is similar to the characteristics of all other types of investigated samples. Impedance characteristics of M30NW alloy samples without layers and  $\text{TiO}_2$  layers annealed at temperatures of 200, 400 and 800°C show no significant changes in the shape caused by exposure to corrosive solution.

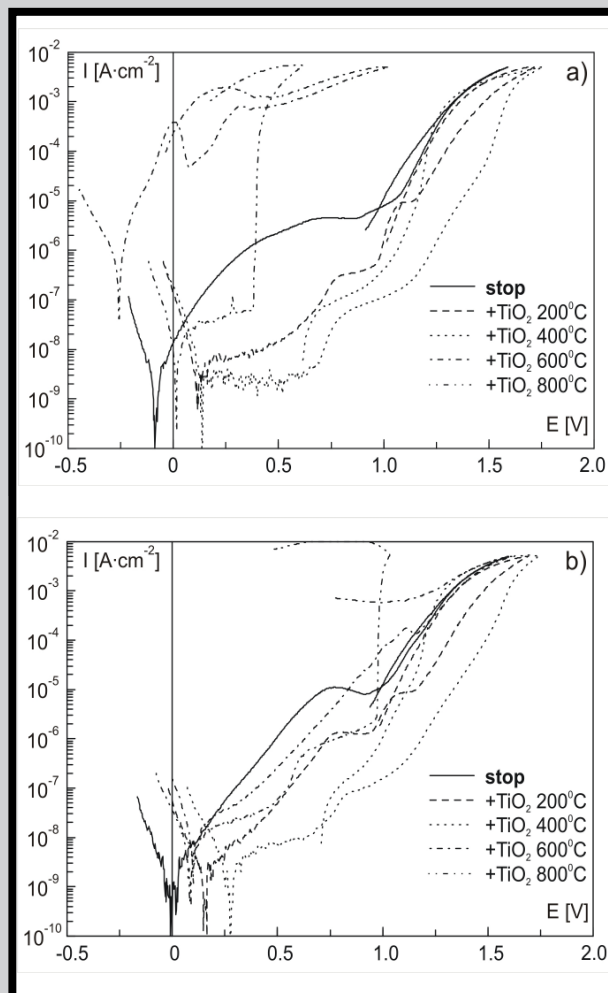
The shape of potentiodynamic characteristics in wide range of anodic polarization for all investigated types of samples is typical for localized corrosion (FIG. 5).



**RYS. 4.** Charakterystyki impedancyjne próbek stopu M30NW z warstwami  $\text{TiO}_2$  przed (a) i po 30-dniowej ekspozycji (b) w roztworze 0,9% NaCl.  
**FIG. 4.** Impedance characteristics of M30NW alloy samples with  $\text{TiO}_2$  layers before (a) and after the 30-day exposure (b) in 0.9% NaCl solution.

Pomiary potencjodynamiczne potwierdzają wyniki uzyskane innymi metodami - najlepszą odporność korozyjną wykazują próbki stopu z warstwą  $400^\circ\text{C}$ , natomiast znaczące pogorszenie odporności korozyjnej stopu obserwowane jest dla próbek z warstwą  $600^\circ\text{C}$ . Jedynie w przypadku próbek stopu z warstwami  $\text{TiO}_2$  uzyskanymi w wysokich temperaturach tj.  $600$  i  $800^\circ\text{C}$  30-dniowa ekspozycja w roztworze NaCl w znaczący sposób wpłynęła na przebieg charakterystyk potencjodynamicznych. Dla pozostałych próbek zmiany te są nieznaczne.

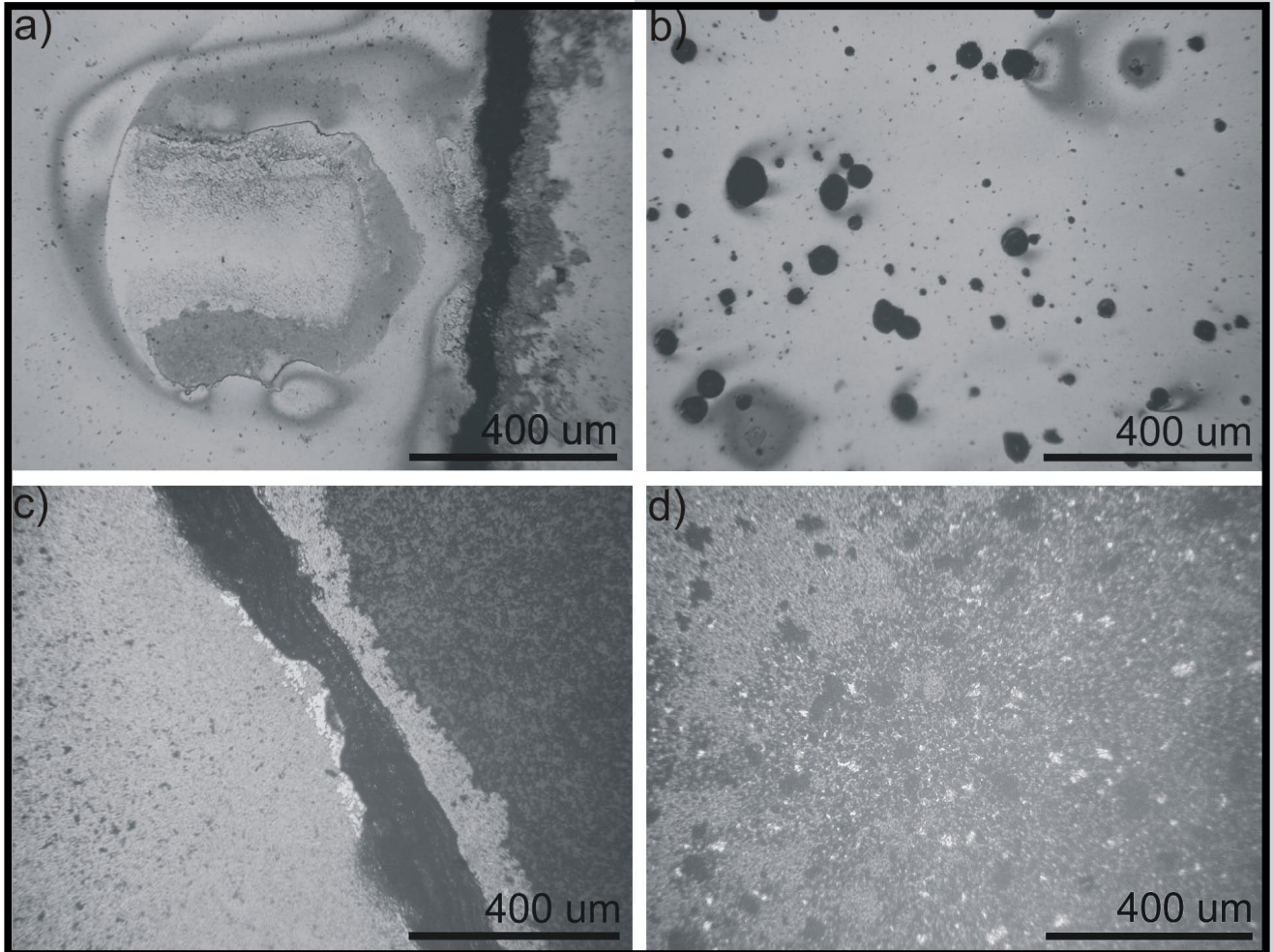
Analiza mikroskopowa zniszczeń korozyjnych powstałych w wyniku polaryzacji anodowej próbek potwierdziła charakter lokalny zachodzącej korozji. Obserwowane zniszczenia korozyjne zależały od warunków modyfikacji powierzchni próbek - w szczególności od temperatury wygrzania warstwy  $\text{TiO}_2$  - natomiast nie zależały od czasu ekspozycji próbek w roztworze 0,9% NaCl. W przypadku stopu M30NW bez naniesionych warstw  $\text{TiO}_2$  w wyniku polaryzacji anodowej na powierzchni powstawały zniszczenia w postaci szczeliny w miejscu styku próbki z uszczelką naczynia pomiarowego (RYS. 6a). Podobny charakter zniszczeń stwierdzono dla próbek z warstwą wygrzewaną w  $200^\circ\text{C}$ . W przypadku stopu M30NW z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzaną w temperaturze  $400^\circ\text{C}$  polaryzacja anodowa powodowała powstawanie dużej ilości punktowych wżerów korozyjnych o zróżnicowanej średnicy i głębokości (RYS. 6b).



**RYS. 5.** Charakterystyki potencjodynamiczne próbek stopu M30NW z warstwami  $\text{TiO}_2$  przed (a) i po 30-dniowej ekspozycji (b) w roztworze 0,9% NaCl.  
**FIG. 5.** Potentiodynamic characteristics of M30NW alloy samples with  $\text{TiO}_2$  layers before (a) and after the 30-day exposure (b) in 0.9% NaCl solution.

Potentiodynamic measurements confirm the results obtained by other methods - the best corrosion resistance show the alloy samples with a layer annealed at  $400^\circ\text{C}$ , while a significant deterioration of corrosion resistance is observed for samples with a layer annealed at  $600^\circ\text{C}$ . Only in the case of alloy samples with  $\text{TiO}_2$  layers obtained at high temperatures, i.e.  $600$  and  $800^\circ\text{C}$ , 30-day exposure in NaCl solution significantly influenced the shape of the potentiodynamic characteristics. For the other samples these changes are minor.

Microscopic analysis of corrosion damages resulting from anodic polarization of samples confirmed the local character of occurring corrosion processes. The observed corrosion damages depended on the conditions of surface modification of samples - in particular the annealing temperature, but do not depend on the exposure time of samples in 0.9% NaCl solution. In the case of M30NW alloy without  $\text{TiO}_2$  layers there were formed on the surface damages in form of crevice near the gasket as a result of anodic polarization (FIG. 6a). Similar character of the damages was found for samples annealed at  $200^\circ\text{C}$ . Whereas in the case of M30NW alloy with  $\text{TiO}_2$  layer annealed at  $400^\circ\text{C}$  anodic polarization caused forming of large amounts of corrosion pits of various diameters and depths (FIG. 6b).



**RYS. 6.** Zniszczenia korozyjne próbek stopu M30NW z warstwami  $\text{TiO}_2$  powstałe w wyniku polaryzacji anodowej w roztworze 0,9% NaCl.

**FIG. 6.** Corrosion damages of M30NW alloy samples with  $\text{TiO}_2$  layers resulting from anodic polarization of samples in 0.9% NaCl solution.

Nie stwierdzono śladów korozji szczelinowej przy uszczelce. Polaryzacja anodowa próbek stopu M30NW z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzaną w temperaturze  $600^\circ\text{C}$  powodowała praktycznie całkowite usunięcie warstwy ditlenku tytanu jak też powstanie regularnej szczeliny przy uszczelce naczynka (RYS. 6c). Inny charakter zniszczeń korozyjnych obserwowany był dla próbek z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzaną w  $800^\circ\text{C}$  (RYS. 6d) - w wyniku polaryzacji anodowej następowało „plackowate” złuszczenie się warstwy tlenku z nieznacznym punktowym odsłanianiem metalicznego podłoża.

## Podsumowanie

Przedstawione wyniki badań wskazują, że zastosowana procedura nanoszenia warstw  $\text{TiO}_2$  metodą zol-żel powoduje zmiany odporności korozyjnej stopu M30NW w roztworze 0,9% NaCl, które zależą przede wszystkim od temperatury wygrzewania tych warstw. Zmiany te powiązać można ze strukturą krystaliczną warstwy  $\text{TiO}_2$  oraz oddziaływaniem między podłożem (stopem) a naniesioną warstwą. Zastosowanie niskich temperatur wygrzewania warstw ( $200$  i  $400^\circ\text{C}$ ) polepsza odporność korozyjną stopu - wytworzona warstwa  $\text{TiO}_2$  stanowi barierę dla procesów korozyjnych. W przypadku zastosowania wyższych temperatur ( $600$  i  $800^\circ\text{C}$ ) stwierdzono pogorszenie właściwości korozyjnych stopu. Przyczyną tego mogą być interakcje nanoszonej warstwy i podłoża zachodzące w tym zakresie temperatur.

There were no signs of crevice corrosion near the gasket. Anodic polarization of M30NW alloy samples with  $\text{TiO}_2$  layer annealed at  $600^\circ\text{C}$  caused practically complete removal of titanium dioxide layer as well as the creation of a crevice near the gasket (FIG. 6c). Different character of corrosion damages was observed for samples with  $\text{TiO}_2$  layer annealed at  $800^\circ\text{C}$  (FIG. 6d) - anodic polarization caused the 'patchy' peeling of the oxide layer with a slight exposing of metallic substrate.

## Summary

The presented results indicate that the procedure used for deposition of  $\text{TiO}_2$  sol-gel layers alter the corrosion resistance of M30NW alloy in 0.9% NaCl solution, and this influence depends on the annealing temperature of these layers. These changes may be related with the crystal structure of formed  $\text{TiO}_2$  layer and the interaction between the substrate (alloy) and the deposited layer. The use of lower annealing temperatures of sol-gel layers ( $200$  and  $400^\circ\text{C}$ ) improves the corrosion resistance of the alloy - formed  $\text{TiO}_2$  layer is a barrier to corrosive processes. In the case of applying higher temperatures ( $600$  and  $800^\circ\text{C}$ ) there was stated a deterioration of corrosion properties of the alloy. The reason for this can be the interactions of deposited layer and substrate occurring in this temperature range.

Dane literaturowe i wyniki wcześniejszych badań wskazują na możliwość dyfuzji składników stopu (m.in. Ni i Fe) do warstwy ditlenku tytanu. Na tym etapie badań niemożliwe jest wyjaśnienie zachowania się stopu z warstwą  $\text{TiO}_2$  wygrzaną w temperaturze  $600^\circ\text{C}$ , a szczególnie poprawianie się odporności korozyjnej po 30-dniowej ekspozycji w roztworze 0,9% NaCl. Wyjaśnienie tego zjawiska będzie możliwe po przeprowadzeniu analiz składu powierzchni z zastosowaniem metod fizycznych takich jak np. analiza fazowa i głębokościowa.

Podsumowując otrzymane wyniki badań korozyjnych można stwierdzić, że z aplikacyjnego punktu widzenia modyfikacja powierzchni stopu biomedycznego M30NW poprawiająca te właściwości, powinna być przeprowadzana w zakresie temperatur poniżej  $600^\circ\text{C}$ .

## Podziękowania

Badania wykonane zostały w ramach grantu MNiSW Nr N N507 501339. Stop biomedyczny M30NW zakupiony został w firmie MEDGAL (Białystok, Polska).

Literature data and results of previous studies indicate the possibility of diffusion of alloying elements (e.g. Ni and Fe) to titanium dioxide layer. At this stage of our research it is impossible to explain the behavior of the alloy with  $\text{TiO}_2$  layer heated at  $600^\circ\text{C}$ , and especially improving its corrosion resistance after 30-day exposure in 0.9% NaCl solution. The explanation of this phenomenon will be possible after analysis of surface composition using physical methods such as phase analysis and depth profile.

Summarizing the results of corrosion measurements can be stated that from the application point of view the surface modification of M30NW biomedical alloy improving these properties should be carried out at temperatures below  $600^\circ\text{C}$ .

## Acknowledgements

The investigations were supported by grant No. N N507 501339 of Ministry of Science and Higher Education. The M30NW biomedical alloy was bought from MEDGAL (Białystok, Poland).

## Piśmiennictwo

- [1] Velten D., Biehl V., Aubertin F., Valeske B., Possart W., Brems J.; *Biomedical Materials* 59 (2002) 18-28.
- [2] Krzak-Roś J., Grygier D., Baszczuk A., Będziński R.; *Inżynieria Biomateriałów* 67-68 (2007) 35-37.
- [3] Głuszek J.; "Tlenkowe powłoki ochronne otrzymywane metodą sol-gel", Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [4] Chen X., Mao S. S.; *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 4 (2006) 906-925.
- [5] Miszczak S., Pietrzyk B., Gawroński Z.; *Inżynieria Materiałowa* 5 (2005) 682-684.

## References

- [6] Masalski J., Głuszek J., Zabrzęski J., Nitsch K., Głuszek P.; *Thin Solid Films* 349 (1999) 186-190.
- [7] Gallardo J., Durán A., de Damborenea J. J.; *Corrosion Science* 46 (2004) 795-806.
- [8] Liu D. M., Yang Q., Troczynski T.; *Biomaterials* 23 (2002) 691-698.
- [9] ISO Standard 5832-9:2007 Implants for surgery - Metallic materials - Part 9: Wrought high nitrogen stainless steel.
- [10] Zhao H., Humbeeck J., Sohler J., Scheerder I.; *Journal of Materials Science: Materials In Medicine* 13 (2002) 911-916.
- [11] Piwoński I.; *Thin Solid Films* 515 (2007) 3499-3506.

## WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI NA ODPORNOŚĆ KOROZYJNĄ STOPU Ti-6Al-7Nb

M. BASIAGA\*, J. SZEWCZENKO, Z. PASZENDA, J. MARCINIAK

INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH,  
POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLSKA

\* E-MAIL: MARCIN.BASIAGA@POLSL.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 140-144*]

### Wprowadzenie

Jednym z najczęściej stosowanych biomateriałów na podstawie tytanu, zwłaszcza w ortopedii jest stop Ti-6Al-4V. Jednakże z uwagi na zawartość wanadu, zaliczanego do pierwiastków o dużej toksyczności w latach osiemdziesiątych podjęto prace nad bezwanadowymi stopami tytanu. Wynikało to z potrzeby weryfikacji składu chemicznego dotychczas stosowanych stopów tytanu, do których zalicza się stop Ti-6Al-7Nb. W skład stopu wchodzi niob, który podobnie jak wanad stabilizuje fazę  $\beta$ , lecz w przeciwieństwie do wanadu jest pierwiastkiem witalnym, nie wywołującym stanów zapalnych i odczynów alergicznych. Stopy te charakteryzują się dobrą biokompatybilnością, korzystnym zespołem własności mechanicznych i dobrą odpornością korozyjną [1-3].

W celu ograniczenia przenikania jonów pierwiastków stopowych do organizmu stosuje się proces anodyzacji, w wyniku którego na powierzchni implantu wytwarza się warstwa tlenkowa, której własności uzależnione są od elektrolitu, metody wytwarzania, czasu utleniania oraz parametrów elektrycznych procesu. Wytworzona w ten sposób warstwa powierzchniowa stanowi lepszą barierę ochronną dla przenikania jonów metalicznych do roztworu i zabezpiecza stop przed oddziaływaniem środowiska korozyjnego [4,5]. Celem pracy było wytypowanie najkorzystniejszego wariantu modyfikacji powierzchni stopu Ti-6Al-7Nb stanowiącego skuteczną barierę dla jonów metalicznych przenikających do roztworu. Analizowano także wpływ procesu sterylizacji parowej oraz długotrwałej ekspozycji w roztworze Ringera na odporność korozyjną stopu Ti-6Al-7Nb.

### Materiał i metodyka badań

Do badań wykorzystano próbki ze stopu Ti-6Al-7Nb pobrane z pręta o średnicy  $d = 14$  mm. Próbkę poddano różnym modyfikacjom powierzchni, mianowicie: szlifowanie, obróbka wibracyjna, polerowanie elektrolityczne, anodyzacja, sterylizacja parą wodną pod ciśnieniem.

Proces szlifowania mechanicznego realizowano z wykorzystaniem wodnych papierów ściernych ze ścierniwem karborundowym o granulacji 120, 320 i 600. Obróbkę wibracyjną przeprowadzano z udziałem kształtek ceramicznych oraz środka zwilżającego. Po obróbce wibracyjnej próbki poddano procesowi polerowania elektrolitycznego, który prowadzono w kąpeli na bazie kwasu chromowego (E-395 Firmy POLIGRAT GmbH, przy gęstości prądu  $i = 10 \div 30$  A/cm<sup>2</sup>). W końcowym etapie przeprowadzono proces anodyzacji w elektrolicie na bazie: kwasów fosforowego i siarkowego (TitanColor Firmy POLIGRAT GmbH) przy potencjałach 57 V, 77 V, 87 V oraz 97 V. Dodatkowo próbki poddano procesowi sterylizacji parowej w autoklawie, w temperaturze  $T = 134^\circ\text{C}$  przy ciśnieniu  $p = 2,1$  bar przez  $t = 12$  minut.

## INFLUENCE OF SURFACE MODIFICATION ON CORROSION RESISTANCE OF Ti-6Al-7Nb ALLOY

M. BASIAGA\*, J. SZEWCZENKO, Z. PASZENDA, J. MARCINIAK

INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
KONARSKIEGO 18A STREET, 44-100 GLIWICE, POLAND

\* E-MAIL: MARCIN.BASIAGA@POLSL.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 140-144*]

### Introduction

One of the most widely used titanium alloy biomaterial, especially in orthopedics, is the Ti-6Al-4V. However, due to the content of vanadium, which is the element of a high toxicity, research on titanium alloys without vanadium was undertaken in late eighties. This resulted from the need to verify the chemical composition of titanium alloys, which include Ti-6Al-7Nb alloy. Niobium like vanadium stabilizes the  $\beta$  phase, but in contrast to the vanadium is a vital element not causing inflammation and allergic reactions. These alloys have good biocompatibility, good mechanical properties and corrosion resistance [1-3].

In order to reduce the penetration of ions of alloying elements into the body the anodizing process is used by which on the implant surface the oxide layer is produced. The layer properties depend on the electrolyte, the manufacturing method, time of oxidation and electrical parameters of the process. The surface layer is a better barrier against penetration of metal ions into the solution and protects the alloy from effects of the corrosion environment [4,5]. The aim of the work was to predict the most advantageous variant of surface modification of Ti-6Al-7Nb alloy, forming an effective barrier for the metal ions penetrating to the solution. The influence of steam sterilization and long-term exposure in Ringer's solution on the corrosion resistance of the Ti-6Al-7Nb alloy were also analyzed.

### Material and methods

The research was conducted on the samples of diameter  $d = 14$  mm made of Ti-6Al-7Nb alloy. The samples were surface modified by: grinding, vibration machining, electropolishing, anodizing and water steam sterilization under pressure.

Sand papers 120, 320 and 600 were applied for the mechanical grinding. Vibration machining was carried out by means of ceramic shapes and wetting agent. After vibration machining, the samples were subjected to electropolishing process, which was conducted in a bath based on chromic acid (E-395 Firms POLIGRAT GmbH), at a current density  $i = 10 \div 30$  A/cm<sup>2</sup>. In the final step the anodizing process, in an electrolyte consisted of: phosphoric and sulfuric acids (TitanColor POLIGRAT Company GmbH) at potentials 57 V, 77 V, 87 V and 97 V, was carried out. Additionally a steam sterilization in autoclave in temperature  $T = 134^\circ\text{C}$ , at a pressure  $p = 2.1$  bar by  $t = 12$  min was applied. In order to choose the most advantageous variant of surface modification of Ti-6Al-7Nb alloy the pitting corrosion tests were carried out. The samples before and after the time of exposure in Ringer's solution were tested (28 days).



W celu wytypowania najkorzystniejszego wariantu modyfikacji powierzchni stopu Ti-6Al-7Nb przeprowadzono badania odporności na korozję wżerową. Badania realizowano dla próbek przed i po czasie ekspozycji w roztworze Ringera (28 dni).

Badanie odporności korozyjnej przeprowadzono metodą potencjodynamiczną rejestrując krzywe polaryzacji anodowej. Zestaw pomiarowy składał się z potencjostatu VoltaLab PGP201, elektrody odniesienia (nasycona elektroda kalomelowa NEK typu KP-113), elektrody pomocniczej (elektroda platynowa typu PtP-201), anody (badana próbka) oraz komputera PC wraz z oprogramowaniem VoltaMaster 4. Przed przystąpieniem do badań powierzchnie wszystkich próbek zostały oczyszczone w 96% alkoholu etylowym z wykorzystaniem płuczki ultradźwiękowej SONICA 1200M przez czas ok.  $t = 6$  min. Badania korozyjne rozpoczynano od wyznaczenia potencjału otwarcia  $E_{OCP}$  w warunkach bezprądowych. Krzywe polaryzacji anodowej rejestrowano od wartości potencjału początkowego  $E_{pocz} = E_{OCP} - 100$  mV. Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością 3 mV/s. Po uzyskaniu gęstości prądu anodowego 1 mA/cm<sup>2</sup> zmieniano kierunek polaryzacji. W ten sposób rejestrowano krzywą powrotną. Badania przeprowadzono w roztworze symulującym płyn fizjologiczny człowieka – roztwór Ringera w temperaturze 37±1°C [6-9].

## Wyniki badań

Wyniki badań odporności na korozję wżerową próbek ze stopu Ti-6Al-7Nb o zróżnicowanym sposobie przygotowania powierzchni przed i po 28. dniach ekspozycji zestawiono w TABELI 1.

Oznaczenie próbek / The way of surface preparation	$E_{kor}$ , mV			$E_p$ , mV			$E_{cp}$ , mV			$R_p$ , MΩ*cm <sup>2</sup>		
	NS	S	28D	NS	S	28D	NS	S	28D	NS	S	28D
1/2	-286	-184	-153	-	-	-	-	-	-	0.44	0.45	7.45
1/2/57V	-149	47	184	-	-	-	-	-	-	5.04	5.54	8.11
1/2/77V	-231	-209	62	-	-	-	-	-	-	0.45	1.21	15.3
1/2/87V	-186	-235	140	-	-	-	-	-	-	0.62	1.13	10.6
1/2/97V	-159	-184	69	-	-	-	-	-	-	1.35	0.71	6.95
1/2/5	-198	-197	-102	-	-	-	-	-	-	0.26	0.41	3.45
1/2/5/57V	-216	-214	-58	3549	2974	-	2314	1774	-	1.98	2.02	9.83
1/2/5/77V	-229	-174	117	3229	2839	-	1961	-	-	2.30	2.62	11.4
1/2/5/87V	-250	-237	182	3396	2358	-	-	125	-	1.09	1.20	13.5
1/2/5/97V	-201	-258	193	2980	2445	-	-	772	-	4.21	0.61	8.65

1 - szlifowanie, 2 - obróbka wibracyjna, 5 - polerowanie elektrolityczne, XV - anodyzacja (gdzie X oznacza wartość potencjału, przy którym przeprowadzono proces), NS - bez sterylizacji, S - sterylizacja, 28D - ekspozycja po 28 dniach  
1 - grinding, 2 - vibration machining, 5 - electropolishing, XV - anodizing (where X is the value of the potential at which the process was carried out), NS - without sterilization, S - sterilization, 28D – exposure after 28 days

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że potencjał korozyjny dla próbek w stanie wyjściowym (szlifowanie oraz obróbka wibracyjna) przyjmował średnią wartość  $E_{kor} = -286$  mV. Tak wyznaczone krzywe polaryzacji anodowej wskazywały na istnienie zakresu pasywnego do wartości potencjału  $E = +4000$  mV. W tym przypadku nie zaobserwowano gwałtownego przyrostu gęstości prądu anodowego w analizowanym zakresie pomiarowym, świadczącego o zainicjowaniu procesu korozji wżerowej. Dodatkowo wyznaczono za pomocą metody Sterna wartość oporu polaryzacyjnego, który wynosił  $R_p = 0,44$  MΩcm<sup>2</sup>. W dalszej kolejności dla tak przygotowanych próbek przeprowadzono proces anodyzacji w elektrolicie na bazie kwasów: fosforowego i siarkowego przy różnych potencjałach 57 V, 77 V, 87 V oraz 97 V. Proces ten niezależnie od zastosowanego potencjału spowodował korzystne zwiększenie wartości potencjału korozyjnego oraz oporu polaryzacyjnego w odniesieniu do próbek jedynie szlifowanych i po obróbce wibracyjnej. Zakres pasywny również występował w całym zakresie anodowym - TABELA 1, RYS. 1.

The corrosion resistance tests were conducted by means of potentiodynamic method and by recording the anodic polarization curves. The measuring set was consisted of a potentiostat VoltaLab PGP201, the reference electrode (saturated calomel electrode KP-113), the auxiliary electrode (platinum electrode PtP-201), anode (test sample) and computer with VoltaMaster 4 software. Before testing the surfaces of all samples were cleaned in 96% ethanol by means of ultrasonic washer SONIC 1200M by  $t = 6$  min. The study was initiated from determining of the opening potential  $E_{OCP}$ . Anodic polarization curves have recorded from the initial potential  $E_{pocz} = E_{OCP} - 100$  mV. The applied scan rate in anodic direction was equal to 3 mV/s. After reaching current density 1 mA/cm<sup>2</sup>, the direction of anodic polarization of samples was changed. In this way, the return curve was recorded. The measurements were conducted in physiological Ringer's solution at temperature 37±1°C [6-9].

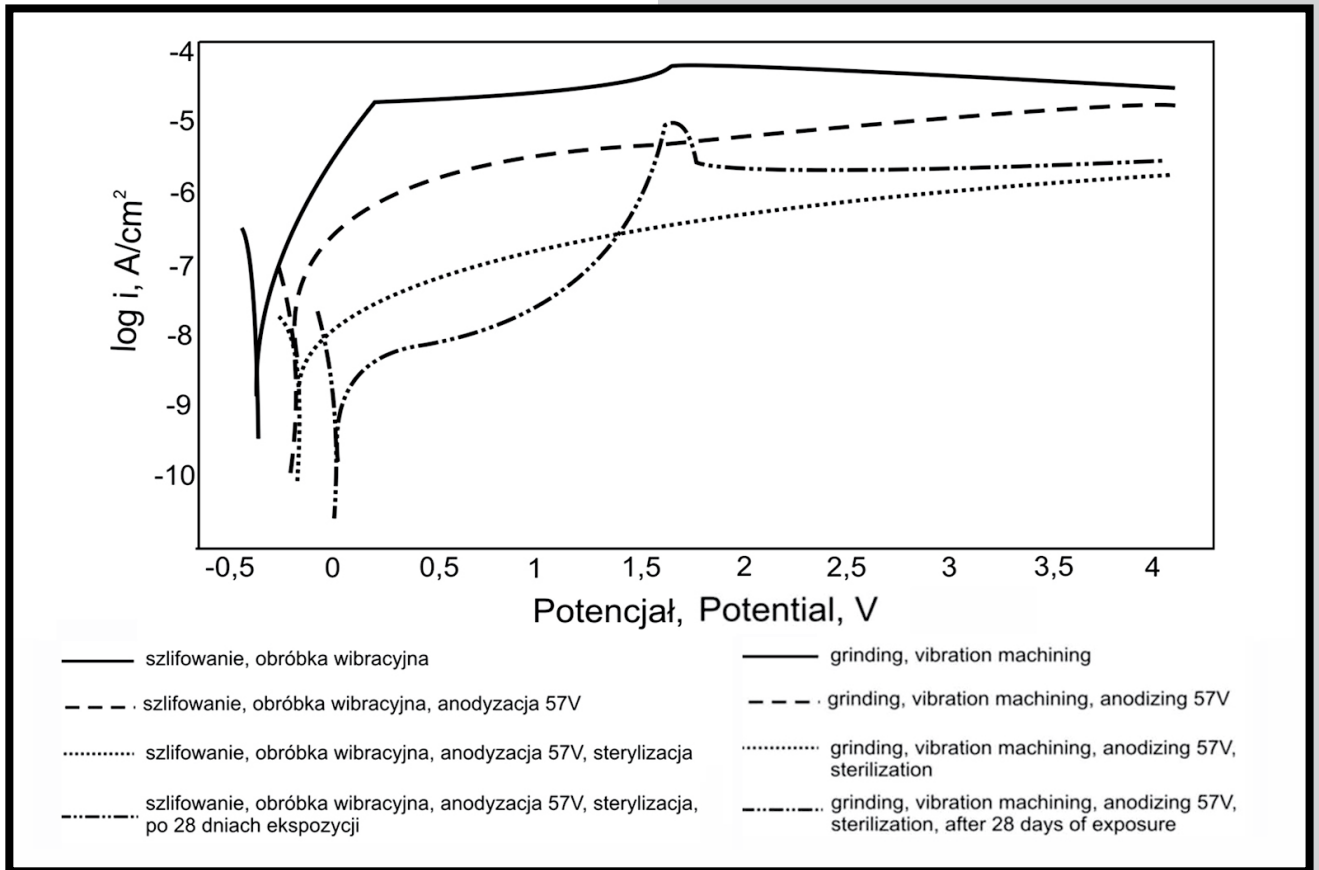
## Results

The results of pitting corrosion tests of samples made of Ti-6Al-7Nb alloy with different surface preparation, before and after the 28 of days of exposure are presented in TABLE 1.

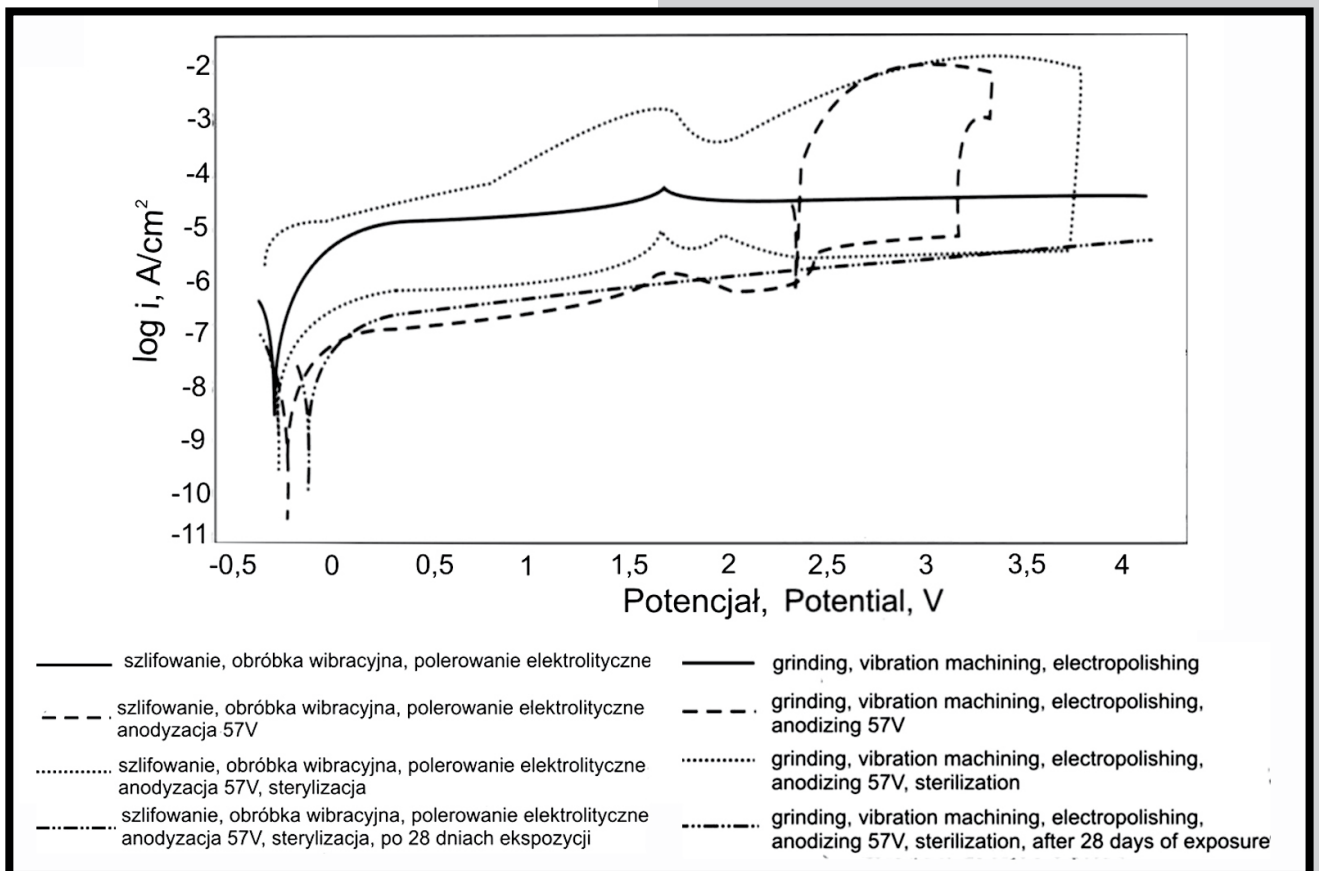
**TABELA 1. Wyniki badań odporności na korozję wżerową stopu Ti-6Al-7Nb.**

**TABLE 1. The results of pitting corrosion tests of Ti-6Al-7Nb alloy.**

On the basis of the results it was stated that the corrosion potential value of samples in initial state (grinding, vibration machining) was  $E_{kor} = -286$  mV. The recorded anodic polarization curves indicate the existence of passive range up to value  $E = +4000$  mV. It was no observed the sudden increase of anodic current density in the tested range of measurement, that was indicating the initiation of pitting corrosion process. On the basis of the Stern method the additional parameter describing the corrosion resistance of the samples were determined: polarization resistance which was equal to  $R_p = 0.44$  MΩcm<sup>2</sup>. Subsequently the anodizing process, in an electrolyte based on acid: phosphoric and sulfuric at different potentials 57 V, 77 V, 87 V and 97 V, was carried out for the prepared samples. This process caused the advantageous increase of corrosion potential as well polarization resistance in compare to samples only grinded and vibration machined, independently of applied potential. Passive range was also appeared in the all anodic range – TABLE 1, FIG. 1.



RYS. 1. Krzywe polaryzacji anodowej stopu Ti6Al7Nb o różnym sposobie przygotowania powierzchni.  
 FIG. 1. Anodic polarization curves of samples made of Ti-6Al-7Nb alloy after different surface preparation.



RYS. 2. Krzywe polaryzacji anodowej stopu Ti6Al7Nb o różnym sposobie przygotowania powierzchni.  
 FIG. 2. Anodic polarization curves of samples made of Ti-6Al-7Nb alloy after different surface preparation.

W dalszej kolejności analizowane próbki poddano procesowi sterylizacji parowej. W przypadku stanu wyjściowego (szlifowanie i obróbka wibracyjna) stwierdzono korzystny wpływ procesu sterylizacji na ich odporność korozyjną. Świadczą o tym wartości parametrów charakteryzujących ich odporność korozyjną – TABELA 1. Z kolei dla próbek anodowych poddanych procesowi sterylizacji parowej stwierdzono zróżnicowane wartości parametrów charakteryzujących ich odporność korozyjną. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano korzystne zwiększenie wartości potencjału korozyjnego oraz oporu polaryzacyjnego w przypadku próbek anodyzowanych przy potencjałach 57 V i 77 V. Wartości te wynosiły odpowiednio  $E_{kor} = 47$  mV,  $R_p = 8,11$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> (dla potencjału 57 V) oraz  $E_{kor} = -209$  mV,  $R_p = 1,21$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> (dla potencjału 77 V). Z kolei uzyskane wyniki przy potencjałach 87 V i 97 V nie są jednoznaczne. Stwierdzono zwiększenie potencjału korozyjnego oraz oporu polaryzacyjnego w przypadku anodyzacji przy potencjale 87 V. Wartości te wynosiły odpowiednio  $E_{kor} = -235$  mV oraz  $R_p = 1,13$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup>. W przypadku polaryzacji potencjałem 97 V zaobserwowano niekorzystne zmniejszenie potencjału korozyjnego oraz oporu polaryzacyjnego – TABELA 1.

Niezależnie od zastosowanego wariantu obróbki powierzchniowej 28 dniowa ekspozycja w roztworze Ringera wpłynęła korzystnie na odporność korozyjną. Świadczą o tym wyznaczone wartości parametrów charakteryzujących odporność korozyjną – TABELA 1, RYS. 1.

Proces polerowania elektrochemicznego zastosowany jako obróbka powierzchni poprzedzająca proces anodyzacji korzystnie wpłynęła na własności korozyjne stopu. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono korzystny wzrost wartości potencjału korozyjnego ( $E_{kor} = -198$  mV) oraz zmianę wartości oporu polaryzacyjnego ( $R_p = 0,26$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup>) w odniesieniu do próbek poddanych jedynie obróbce mechanicznej. Zakres pasywny występował w całym zakresie anodowym co jest zjawiskiem korzystnym – TABELA 1, RYS. 2.

W dalszej kolejności próbki poddano procesowi anodyzacji przy różnych wartościach potencjałów: 57 V, 77 V, 87 V oraz 97 V. Uzyskane wyniki wykazały zróżnicowane wartości tak wytworzonych warstw anodowych – TABELA 1. Zarejestrowane krzywe polaryzacji anodowej dla tej grupy próbek charakteryzowały się obecnością pętli histerezy, świadczącej o przebiegu korozji wżerowej. Gwałtowny wzrost natężenia prądu anodowego obserwowano dla wartości potencjałów z zakresu  $E_b = +2980 \div +3549$  mV.

Proces sterylizacji parowej wpłynęła korzystnie na odporność korozyjną próbek po obróbce mechanicznej i elektrolitycznej (szlifowanie, obróbka wibracyjna, polerowanie elektrolityczne), natomiast dla próbek po procesie anodyzacji nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach charakterystycznych parametrów. Wyjątek stanowiła anodyzacja przy potencjale 97 V, gdzie wykazano niekorzystne zmniejszenie oporu polaryzacyjnego z wartości  $R_p = 4,21$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> do wartości  $R_p = 0,61$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup>. Zaobserwowano również zmniejszenie wartości potencjału przebicia  $E_b = +2358 \div +2974$  mV – TABELA 1, RYS. 2.

Ekspozycja w roztworze Ringera niezależnie od sposobu przygotowania powierzchni wpłynęła korzystnie na odporność korozyjną stopu Ti-6Al-7Nb – TABELA 1, RYS. 2. Dla wszystkich próbek stwierdzono perfekcyjną pasywację w całym zakresie anodowym. Ekspozycja w roztworze Ringera spowodowała przesunięcie wartości potencjału korozyjnego w kierunku wartości dodatnich. Zaobserwowano również wzrost oporu polaryzacyjnego średnio do ok.  $R_p = 10$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> co jest zjawiskiem korzystnym.

In the next the samples were steam sterilized. For initial state (grinding, vibration machining) the beneficial influence of the sterilization process on corrosion resistance was stated. It is evidenced by the values of the parameters characterizing their corrosion resistance – TABLE 1. While for the anodized samples subjected to steam sterilization process different values of their corrosion resistance were stated. On the basis of the tests it was shown favourable increase of the corrosion potential and polarization resistance, observed for anodizing samples at potential 57 V and 77 V. These values were equal to  $E_{kor} = 47$  mV,  $R_p = 8.11$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> (for 57 V) and  $E_{kor} = -209$  mV,  $R_p = 1.21$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> (for 77 V) respectively. The results obtained for 87 V and 97 V potentials are not clear. The increase of corrosion potential and polarization resistance was observed for anodizing process at potential 87 V. These values were equal to  $E_{kor} = -235$  mV and  $R_p = 1.13$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> respectively. In the case of polarization potential of 97 V adverse decrease of the corrosion potential and polarization resistance was observed – TABLE 1.

Independently of the way of surface preparation favourable influence on the corrosion resistance after 28 days of exposure in Ringer's solution was confirmed. It was evidenced by the corrosion resistance parameters determined in the tests – TABLE 1, FIG. 1.

The electropolishing process applied as a surface treatment, which preceded the anodizing process favourable influence on the corrosion properties of the alloy. On the basis of the measurement it was stated the favourable increase of the corrosion potential ( $E_{kor} = -198$  mV) as well change of polarization resistance ( $R_p = 0.26$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup>) for samples subjected to mechanical treatment only. Passive range was observed over the entire anodic range which is an advantageous effect – TABLE 1, FIG. 2.

Subsequently, samples were subjected to the process of anodizing at different potentials: 57 V, 77 V, 87 V and 97 V. The measurements carried out indicate diverse parameters for the so constituted anodic layer – TABLE 1. The anodic polarization curves recorded for this group of samples were characterized by the presence of hysteresis loop, which show the progress of pitting corrosion. The values of the breakdown potential were equal to  $E_b = +2980 \div +3549$  mV.

The process of steam sterilization favourably influenced on the corrosion resistance of samples after mechanical and electrolytic treatment (grinding, vibration machining, electropolishing). While for the samples after the anodizing process, no significant differences in the values of characteristic parameters were stated. The exception was the case of anodizing at potential of 97 V, where the unfavourable decrease of the polarization resistance from  $R_p = 4.21$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> to  $R_p = 0.61$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup> was shown. It was also observed the decrease of the breakdown potential to the range of  $E_b = +2358 \div +2974$  mV – TABLE 1, FIG. 2.

Independently of the way of surface preparation, the exposure in Ringer's solution influence advantageously on the corrosion resistance of Ti-6Al-7Nb alloy – TABLE 1, FIG. 2. The perfect passivation in the whole anodic range was confirmed for all the samples. Exposure in Ringer's solution resulted in the shifting of the corrosion potential to its positive values. It was also observed an increase of polarization resistance, average up to  $R_p = 10$  M $\Omega$ cm<sup>2</sup>, which is a favourable effect.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono korzystny wpływ procesu anodyzacji na odporność korozyjną próbek po obróbce mechanicznej jak i elektrochemicznej. Przeprowadzone badania potencjodynamiczne wykazały, iż zabiegi modyfikacji powierzchni stopu Ti-6Al-7Nb poprzedzające proces anodyzacji wpływają na jego odporność korozyjną. Najkorzystniejszym wariantem modyfikacji powierzchni jest zastosowanie anodyzacji przy wartości potencjału 57 V przeprowadzone bezpośrednio po obróbce wibracyjnej. Świadczą o tym wartości parametrów charakteryzujących jego odporność korozyjną – TABELA 1, RYS. 1, 2. Proces sterylizacji parowej, który jest nieodzownym zabiegiem przed implantacją, wpływa korzystnie na odporność korozyjną stopu Ti6Al7Nb niezależnie od sposobu przygotowania powierzchni. Jedynie anodyzacja przy wartości potencjału 97 V spowodowała nieznaczne obniżenie odporności korozyjnej po procesie sterylizacji – TABELA 1. Przeprowadzone badania wykazały korzystny wpływ długoterminowego oddziaływania roztworu Ringera na zmodyfikowaną powierzchnię stopu Ti-6Al-7Nb. Świadczą o tym wartości charakterystycznych wielkości opisujących odporność na korozję wżerową wyznaczone po 28. dniach ekspozycji stopu w roztworze Ringera. Nie stwierdzono występowania potencjału przebicia w całym zakresie pomiarowym co świadczy o szczelnej i trwałej warstwie pasywnej wytworzonej również wskutek oddziaływania roztworu. Uwzględniając parametry charakteryzujące odporność korozyjną zmodyfikowanego powierzchniowo stopu Ti6Al7Nb najkorzystniejszym wariantem wstępnego przygotowania powierzchni próbek poprzedzającym proces anodyzacji jest szlifowanie i obróbka wibracyjna.

## Conclusions

On the basis of the obtained results it was confirmed the positive effect of the anodizing process on the corrosion resistance of samples after machining and electrochemical treatment. The measurements carried out by means of potentiodynamic method indicate that way of surface preparation of Ti-6Al-7Nb alloy, which precedes anodizing process, influence on its corrosion resistance. The most preferred option of surface preparation is applying the anodizing with potential of 57 V that should be conducted immediately after the vibration machining. It was evidenced by the values of the parameters characterizing its corrosion resistance – TABLE 1, FIG. 1,2. The steam sterilization process which is indispensable procedure before implantation, affect favourably on corrosion resistance of Ti-6Al-7Nb alloy. Only the anodizing process at the potential of 97 V caused a slight decrease of corrosion resistance after the sterilization process – TABLE 1. On the basis of the results it was shown the advantageous influence of long-term impact of a Ringer's solution on the surface of the Ti-6Al-7Nb alloy. This confirm the characteristic values describing the resistance to pitting corrosion determined after the 28 days of exposure in Ringer's solution. The existence of breakdown potential has not been stated in the whole measuring range, which proves high tightness and durability of the passive layer additionally constituted by solution interaction. Taking into account the parameters characterizing the corrosion resistance of the Ti6Al7Nb alloy the most advantageous variant of surface pretreatment of samples, which is preceding the anodizing process is grinding and vibration machining.

## Piśmiennictwo

- [1] M.A. Khan, R.L. Williams, D.F. Williams, The corrosion behavior of Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solution, *Biomaterials* 20, 1999, pp. 631-637.
- [2] Marciniak J.: *Biomateriały*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [3] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: *Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.
- [4] Szewczenko J., Walke W., Nowińska K., Marciniak J.: Corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy after diverse surface treatments, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech* 41, 2010, pp. 360-371
- [5] Szewczenko J., Marciniak J., Kaczmarek M., Jadacka S.: Wpływ modyfikacji powierzchni stopu Ti6Al4V ELI na odporność korozyjną, *Inż. Biomater.*, 13, 96/98, 2010, pp. 77-82.

## References

- [6] Norma PN-EN ISO 10993-15: 2009. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji metali i stopów.
- [7] Ohtsuka T., Nomura N.: The dependence of the optical property of Ti anodic oxide film on its growth rate by ellipsometry. *Corrosion Science*, 39/1997, 7, pp.1253-1263.
- [8] Pochrzast M., Walke W., Marciniak J., Kaczmarska D.: Zachowanie elektrochemiczne stopu Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb po różnym okresie ekspozycji w SBF. *Inżynieria Biomateriałów*, 89-91 2009, pp. 151-153.
- [9] Paszenda Z, Walke W., Jadacka S.: Elektrochemiczne badania odporności korozyjnej stopu Ti-6Al-7Nb w warunkach symulujących środowisko układu kostnego, *Ochrona przed korozją Ochrona przed Korozją*, 53, 2010, pp. 670-674.

# ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ DO OCENY PASYWOWANYCH POWIERZCHNI DRUTÓW STALOWYCH WYKORZYSTYWANYCH NA PROWADNIKI KARDIOLOGICZNE

WITOLD WALKE<sup>1\*</sup>, JOANNA PRZONDZIO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA W GLIWICACH, UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

<sup>2</sup> KATEDRA TECHNOLOGII MATERIAŁÓW, POLITECHNIKA ŚLĄSKA W KATOWICACH, UL. KRASIŃSKIEGO 8, 40-019 KATOWICE

\* E-MAIL: WITOLD.WALKE@POLSL.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 145-148*]

## Wstęp

Choroba wieńcowa spowodowana zmianami miażdżycowymi i jej powikłania prowadzące do niewydolności krążenia, jest jedną z głównych przyczyn umieralności. Zastosowanie nowoczesnych metod wielokierunkowej farmakoterapii i leczenia inwazyjnego – zarówno chirurgicznego, jak i przeszczepnego przyczynia się do wydłużenia życia. O ogromne znaczenie ma dynamiczny rozwój kardiologii małoinwazyjnej zarówno w zakresie realizacji angioplastyki wieńcowej połączonej z wprowadzaniem stentów, jak i elektroterapii. Istotne znaczenie w prawidłowej realizacji angioplastyki, wprowadzania stentów, czy też implantowania kardiostymulatora mają różnego typu przewodniki [1-3].

Podstawowym kryterium przydatności materiału metalowego dla kardiologii jest jego biokompatybilność. Jest ona w głównej mierze związana z właściwościami fizykochemicznymi powierzchni, które powinny być dostosowane do cech środowiska układu krążenia człowieka [4]. Dla poprawy biokompatybilności drutów stalowych na ich powierzchni często wytwarzane są warstwy pasywne. Z kolei w celu weryfikacji przydatności wytworzonych warstw pasywnych na drutach ze stali nierdzewnej X10CrNi18-8 wykonano badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (ESI). Badania te pozwoliły na ocenę właściwości fizykochemicznych powierzchni drutów przeznaczonych do wyrobu przewodników kardiologicznych.

## Materiał i metodyka badań

Do badań przygotowano 10 próbek drutu o długości  $l = 25$  mm i średnicy  $d = 0,5$  mm wykonanego ze stali X10CrNi18-8 powszechnie stosowanej na przewodniki kardiologiczne. Proces szlifowania realizowano przy użyciu wodnego papieru ściernego o ziarnistości 800 ziaren/mm<sup>2</sup>, co pozwoliło na uzyskanie chropowatości powierzchni  $R_a = 0,38$  μm. Z kolei polerowanie mechaniczne prowadzono na podłożu filcowym przy udziale Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, co zapewniło chropowatość powierzchni  $R_a = 0,14$  μm. Badania chropowatości powierzchni zostały przeprowadzone z wykorzystaniem metody liniowego mechanicznego pomiaru stykowego przy użyciu profilometru SURTRONIC 3+ firmy Taylor/Hobson. Pomiar przeprowadzono na odcinkach o długości  $l = 0,8$  mm z dokładnością  $\pm 0,02$  μm. Tak przygotowane próbki podzielono na dwie grupy.

# APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY IN ANALYSIS OF SURFACE PASSIVATION OF STEEL WIRES USED FOR CARDIOLOGICAL LEADERS

WITOLD WALKE<sup>1\*</sup>, JOANNA PRZONDZIO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS, SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF TECHNOLOGY MATERIALS, SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, UL. KRASIŃSKIEGO 8, 40-019 KATOWICE, POLAND

\* E-MAIL: WITOLD.WALKE@POLSL.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 145-148*]

## Introduction

Coronary disease caused by atherosclerotic changes and its complications leading to circulatory failure is one of the main causes of deaths. Application of modern methods of multidirectional medicinal treatment and invasive treatment – both surgical and percutaneous - contributes to extension of life span in a society. Dynamic development of invasive cardiology, both within the range of coronary angioplasty in connection with stent implantation and for example electrotherapy, is of great importance. What is crucial for proper realisation of angioplasty, stent insertion or pacemaker implantation, are guide wires of various types [1-3].

Basic criterion for applicability of metallic material for cardiology is its biocompatibility. It is mainly connected with physical and chemical characteristics of its surfaces, which should be accommodated to characteristics of human blood vascular system environment [4]. In order to improve biocompatibility of steel wires, passive layers are often created on their surface. In order to verify the application fitness of passive layers created on stainless steel X10CrNi18-8 wires, tests that employed electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were made. Those tests enabled to assess physical and chemical characteristics of the surface of wires used for production of cardiological guide wires.

## Material and method

Samples prepared for tests were made of X10CrNi18-8 steel wire (10 samples:  $l = 25$  mm and  $d = 0.5$  mm every one of them) a popular material used for production of cardiological guide wires. Grinding process was realised by means of water-paper with granularity of 800 grains/mm<sup>2</sup>, which enabled to obtain surface roughness  $R_a = 0.38$  μm. Next, mechanical polishing was made on felt base in the presence of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, which gave surface roughness of  $R_a = 0.14$  μm. Tests of surface roughness were carried out with application of linear mechanical contact measurement method by means of profilometer SURTRONIC 3+ by Taylor/Hobson. The measurement was made on the sections with  $l = 0.8$  mm and precision  $\pm 0.02$  μm. Samples prepared in such a way were divided into two groups. The first group (5 samples) was also subject to chemical passivation, realised in 40% HNO<sub>3</sub> in the temperature  $T = 65^\circ\text{C}$ , and time  $t = 60$  min [5].

Pierwszą grupę (5 próbek) poddano dodatkowo procesowi pasywacji chemicznej, którą realizowano w 40% HNO<sub>3</sub> w temperaturze T = 65°C, i czasie t = 60 min [5]. Następnie obydwie grupy próbek poddano sterylizacji parowej w autoklawie Basic Plus firmy Mocom w temperaturze T = 134°C, ciśnieniu p = 1,1 bar i w czasie t = 20 min [6]. W celu zasymulowania warunków występujących w środowisku krwi, wszystkie próbki poddawano ekspozycji w sztucznym osoczu w temperaturze T = 37±1°C przez okres 60 min.

W celu uzyskania informacji o własnościach fizykochemicznych powierzchni próbek przeprowadzono badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem systemu pomiarowego Auto Lab PGSTAT 302N wyposażonego w moduł FRA2 (Frequency Response Analyser). Jako elektrodę odniesienia zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową (NEK) typu KP-113. Elektrodę pomocniczą stanowiła elektroda platynowa PtP-201. Zastosowany układ pomiarowy umożliwił prowadzenie badań w zakresie częstotliwości 10<sup>4</sup> ÷ 10<sup>-3</sup> Hz. Badania zrealizowano w roztworze Ringera o temperaturze T = 37±1°C i pH = 7,2±0,2. W badaniach wyznaczono impedancyjne widma układu i dopasowano uzyskane dane pomiarowe do układu zastępczego. Na tej podstawie wyznaczono wartości liczbowe oporności i pojemności analizowanych układów. Widma impedancyjne badanego układu przedstawiono w postaci wykresów Nyquista dla różnych wartości częstotliwości oraz w postaci wykresów Bode.

## Wyniki badań

Widmo impedancyjne zarejestrowane dla próbki ze stali X10CrNi18-8 o powierzchni szlifowanej oraz polerowanej mechanicznie poddanej procesowi sterylizacji parowej przedstawiono na RYS. 1, natomiast dla próbki ze stali dodatkowo poddanej procesowi pasywacji chemicznej po procesie polerowania mechanicznego na RYS. 2. Diagramy Nyquista wyznaczone dla tak przygotowanych powierzchni próbek przedstawiają fragmenty dużych niepełnych półokręgów, które są typową odpowiedzią impedancyjną dla cienkich warstw tlenkowych (pasywnych) – RYS. 1a, 2a.

Przedstawiona na diagramach Bode maksymalna wartość kąta przesunięcia fazowego w szerokim zakresie częstotliwości wynosiła odpowiednio dla próbek o powierzchni niespasywowanej θ ≈ 75°, spasywowanej - θ ≈ 67°. Nachylenia log |Z| w całym zakresie zmian częstotliwości są bliskie -1, co świadczy o pojemnościowym charakterze warstwy tlenkowej – RYS. 1b. Z kolei duże wartości impedancji |Z| > 10<sup>6</sup> Ωcm<sup>2</sup> w zakresie najmniejszych częstotliwości wskazują na dobre właściwości dielektryczne i ochronne warstwy tlenkowej powstałej na powierzchni próbki spasywowanej i sterylizowanej parą wodną pod ciśnieniem.

Charakterystykę impedancji granicy faz elektroda – warstwa tlenkowa – roztwór dla próbek po procesie polerowania elektrochemicznego i sterylizacji parowej oraz procesie pasywacji chemicznej i sterylizacji parowej dokonano poprzez aproksymację danych eksperymentalnych za pomocą modelu elektrycznego obwodu zastępczego - RYS. 3.

Matematyczny model impedancji układu stal X10CrNi18-8 – warstwa tlenkowa – roztwór przedstawia równanie [7]:

$$Z = R_s + \frac{1}{1/R_{ct} + Y_0(j\omega)^n}$$

gdzie:

Z – impedancja, Ω·cm<sup>2</sup>

R<sub>s</sub> – opór roztworu Ringera, Ω·cm<sup>2</sup>

R<sub>ct</sub> – opór przejścia jonów przez granicę faz elektroda – roztwór, Ω·cm<sup>2</sup>

CPE (Y<sub>0</sub>(jω)<sup>n</sup>) – element stałofazowy (n – współczynnik niedoskonałości elementu), F·s<sup>n-1</sup>/cm<sup>2</sup>

Then, both sample groups went through steam sterilisation in autoclave steriliser Basic Plus by Mocom in the temperature T = 134°C, pressure p = 1.1 bar and time t = 20 min [6]. To simulate conditions of blood environment, all samples were subject to exposure to artificial plasma in the temperature T = 37±1°C for 60 min.

In order to obtain information concerning physical and chemical characteristics of sample surface, tests that employed electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were carried out. Measurements were made by means of Auto Lab PGSTAT 302N measurement system equipped with module FRA2 (Frequency Response Analyser). Saturated calomel electrode (NEK) of KP-113 type served as the reference electrode. Platinum electrode served as an auxiliary electrode PtP-201. The employed measurement system enabled to carry out tests within frequency range of 10<sup>4</sup> ÷ 10<sup>-3</sup> Hz. The test was made in a Ringer's solution at a temperature of T = 37±1°C and pH = 7.2±0.2. The tests enabled to determine impedance spectra of the system and match obtained measurement data to the equivalent circuit. It created the ground for determination of numerical values of analysed systems resistance and capacity. Impedance spectra of tested system were shown as Nyquist diagrams for various frequencies and as Bode diagrams.

## Test results

Impedance spectrum registered for the sample of X10CrNi18-8 steel with ground and mechanically polished surface after steam sterilisation process is presented in FIG. 1, whereas the same for the sample made of steel that was also subject to chemical passivation after mechanical polishing – in FIG. 2. Nyquist diagrams made for such prepared sample surfaces show fragments of large, incomplete semicircles, which are a typical impedance response for thin (passive) oxide layers – FIG. 1a, 2a.

Maximum value of phase angle in a wide range of frequencies, presented in Bode diagrams, was: for samples with non-passivated surface θ ≈ 75°, passivated - θ ≈ 67°, respectively. Inclination log |Z| within the whole range of frequency changes are close to -1, which proves capacitive character of oxide layer – FIG. 1b. Next, big values of impedance |Z| > 10<sup>6</sup> Ωcm<sup>2</sup> within the range of the smallest frequencies show good dielectric and protective properties of the oxide layer created on the surface of passivated and pressure steam sterilised sample.

Characteristics of impedance of phase boundary: electrode – oxide layer – solution for samples after electrochemical polishing and steam sterilisation and after the process of chemical passivation and steam sterilisation, was made by means of experimental data approximation on a model of electrical equivalent circuit - FIG. 3.

Mathematical model of impedance of the system X10CrNi18-8 steel – oxide layer – solution is also presented in the equation [7]:

$$Z = R_s + \frac{1}{1/R_{ct} + Y_0(j\omega)^n}$$

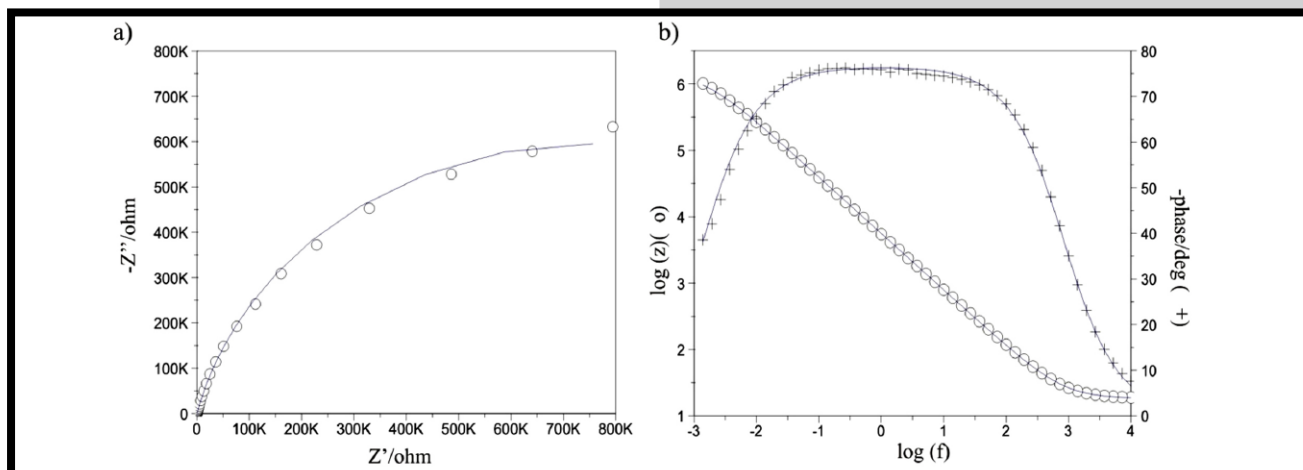
where:

Z – impedance, Ω·cm<sup>2</sup>

R<sub>s</sub> – resistance of the Ringer's solution, Ω·cm<sup>2</sup>

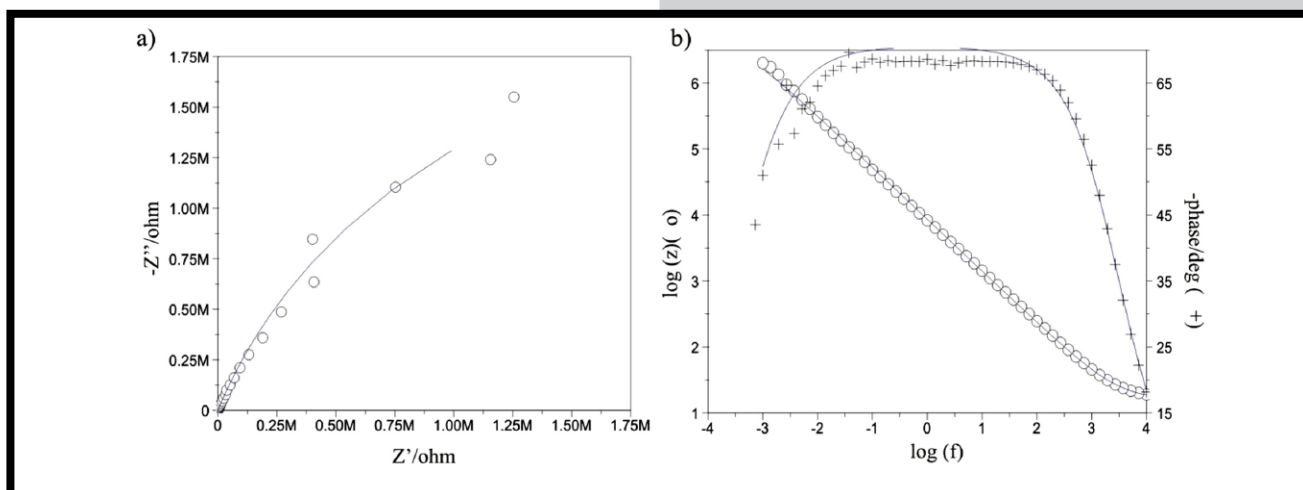
R<sub>ct</sub> – resistance of ion transition through phase boundary: electrode – solution, Ω·cm<sup>2</sup>

CPE (Y<sub>0</sub>(jω)<sup>n</sup>) – Constant Phase Element (n – imperfection rate of element), F·s<sup>n-1</sup>/cm<sup>2</sup>



**RYS. 1.** Widma impedancyjne dla próbek ze stali X10CrNi18-8 po procesach szlifowania, polerowania mechanicznego i sterylizacji parowej: a) wykres Nyquista, b) diagram Bode.

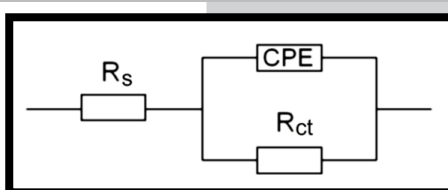
**FIG. 1.** Impedance spectra for samples made of X10CrNi18-8 steel after grinding, mechanical polishing and steam sterilisation: a) Nyquist diagram, b) Bode diagram.



**RYS. 2.** Widma impedancyjne dla próbek ze stali X10CrNi18-8 po procesach szlifowania, polerowania mechanicznego, pasywacji chemicznej i sterylizacji parowej: a) wykres Nyquista, b) diagram Bode.

**FIG. 2.** Impedance spectra for samples made of X10CrNi18-8 steel after grinding, mechanical polishing, chemical passivation and steam sterilisation: a) Nyquist diagram, b) Bode diagram.

Wyniki pomiarów dla próbek po procesie polerowania elektrochemicznego i sterylizacji parowej oraz poddanych procesowi pasywacji chemicznej i sterylizacji parowej dopasowano do najprostszego modelu warstwy tlenkowej, tzn. złożonego z równoległego układu elementu stałofazowego (Constans Phase Element – CPE) połączonego z oporem przejścia jonów przez granicę faz elektroda – roztwór  $R_{ct}$  i oporu przy wysokich częstotliwościach, który może być przypisany oporowi elektrolitu  $R_s$  [7]. W elektrycznym układzie zastępczym rezystor  $R_{ct}$  i element stałofazowy CPE reprezentują odpowiednio opór przejścia jonów oraz pojemność pasywnej warstwy tlenkowej wytworzonej na powierzchni stali. Proces pasywacji chemicznej w sposób zasadniczy wpłynął na wartości charakterystycznych parametrów opisujących własności elektryczne analizowanego układu. Pasywacja chemiczna spowodowała 3-krotny wzrost wartości oporu przejścia jonów metalicznych do roztworu, co należy uznać za zjawisko korzystne – TABELA 1.



**RYS. 3.** Model elektrycznego obwodu zastępczego dla układu: stal X10CrNi18-8 – warstwa tlenkowa – sztuczne osocze.

**FIG. 3.** Model of electrical equivalent circuit for the system: X10CrNi18-8 steel – oxide layer – artificial plasma.

The results of measurement for samples after electrochemical polishing and steam sterilisation and for those subject to chemical passivation and steam sterilisation were matched to the simplest model of oxide layer, i.e. that consists of a parallel system of CPE (Constant Phase Element) connected with resistance of ion transition through phase boundary: electrode – solution  $R_{ct}$  and resistance at high frequencies, that can be attributed to the resistance of electrolyte  $R_s$  [7]. In the electrical equivalent circuit resistor  $R_{ct}$  and CPE represent the resistance of ion transition and capacitance

of passive oxide layer, created on steel surface, respectively. Process of chemical passivation influenced in substance values of distinctive parameters describing electrical properties of the analysed system. Chemical passivation brought about triple increase of the value of metallic ion transition to solution resistance, which should be found as a favourable phenomenon – TABLE 1.

TABELA 1. Wyniki EIS. / TABLE 1. EIS results.

Sposób przygotowania powierzchni / Method of surface preparation	Parametr elektrochemiczny / Electrochemical parameter		CPE	
	$R_s$ , $\Omega\text{cm}^2$	$R_{ct}$ , $k\Omega\text{cm}^2$	$Y_0$ , $\Omega^{-1}\text{cm}^{-2}\text{s}^{-n}$	n
Szlifowanie, polerowanie mechaniczne i sterylizacja parowa Grinding, mechanical polishing and steam sterilisation	18	1506	0,3743e-4	0,85
Szlifowanie, polerowanie mechaniczne, pasywacja chemiczna i sterylizacja parowa Grinding, mechanical polishing, chemical passivation and steam sterilisation	16	4900	0,2755e-4	0,78

## Podsumowanie

W pracy przeprowadzono badania elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, które są liniowym pomiarem elektrycznej odpowiedzi badanego materiału metalowego na pobudzenie elektromagnetycznym sygnałem w szerokim paśmie częstotliwości. EIS jest powszechnie stosowanym testem do prób korozyjnych i elektrochemicznych. Na podstawie otrzymanych wyników uzyskujemy istotną informację o właściwościach fizykochemicznych badanego stopu. W ramach tego badania dla każdej próbki zarejestrowano dwa wykresy: wykres Nyquista ( $|Z|=f_1(\omega)$  i  $\Phi=f_2(\omega)$ , gdzie  $Z(\omega)=Z^{\circ}$ ) oraz wykres Bode'go ( $Z'=f(Z'')$ , gdzie  $Z(\omega)=Z'+jZ''$ ), które pozwoliły na właściwą interpretację wyników. Przeprowadzone badania umożliwiły bezpośrednie porównanie zachowania się rzeczywistego obiektu z jego układem zastępczym, który jest modelem odnoszącym się do fizycznie realizowanej impedancji.

Przeprowadzona analiza EIS warstw pasywnych powstałych na stali X10CrNi18-8 pozwoliła na wyznaczenie widm impedancyjnych badanego układu i dopasowanie danych do układu zastępczego zbudowanego z równoległego układu elementu stałofazowego CPE połączonego z oporem przejścia  $R_{ct}$  i resztkowego oporu  $R_s$  przy wysokich częstotliwościach przypisanego omowemu oporowi roztworu Ringera. Zatem, można stwierdzić, że proces pasywacji chemicznej oraz sterylizacji parowej stali X10CrNi18-8 prowadzony w celu zapewnienia odpowiednich procedur dotyczących jakości wytwarzanych z niej drutów prowadzących i bezpiecznego ich użytkowania w zabiegach kardiologicznych przyczynia się do korzystnych zmian, wpływając na poprawę odporności korozyjnej tego typu materiału metalowego. Wyznaczone wartości admittancji ( $Z^{-1}$ ) oraz współczynnika n dla próbek po ekspozycji w sztucznym osoczu w temperaturze  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$  przez okres 60 min. wykazały, że warstwa pasywna nie uległa zniszczeniu. Zaobserwowano jedynie zmiany własności elektrycznych warstw pasywnych (zmniejszenie wartości oporu przejścia  $R_{ct}$ ).

Na podstawie przeprowadzonych badań impedancyjnych jednoznacznie wykazano, że zastosowanie procesu pasywacji chemicznej stali X10CrNi18-8 stosowanej na prowadniki kardiologiczne jest uzasadnione.

W dalszej kolejności przewiduje się przeprowadzenie badań warstw tlenkowych wytworzonych na powierzchni, celem wyjaśnienia zmian składu chemicznego i stechiometrycznego utworzonych związków chemicznych.

## Summary

This study presents carried out tests of electrochemical impedance spectroscopy, that are linear measurement of electrical response of the tested metallic material to activation from electromagnetic signal in a wide frequency band. EIS is a test that is in common use for corrosion and electrochemical tests. Analysis of the obtained results enables to get crucial information on physical and chemical characteristics of the respective tested alloy. As a part of this test, for each sample two diagrams were registered: Nyquist diagram ( $|Z|=f_1(\omega)$  and  $\Phi=f_2(\omega)$ , where  $Z(\omega)=Z^{\circ}$ ) and Bode diagram ( $Z'=f(Z'')$ , where  $Z(\omega)=Z'+jZ''$ ), that enabled to analyse the results properly. Carried out tests enabled direct comparison of real object behaviour and its equivalent circuit, that is a model related to physically realised impedance.

The EIS analysis of the X10CrNi18-8 steel passive layers created as the result of made it possible to determine the impedance spectrums of the examined system and to adjust data to the substitute system. This substitute system consisted of the arrangement in parallel of the CPE combined with the transition resistance  $R_{ct}$  and a residuary resistance  $R_s$  for high frequencies, which is assigned to an ohm resistance of the Ringer's solution. Consequently, it can be ascertained that chemical passivation process and steam sterilization of X10CrNi18-8 steel, performed in order to assure proper procedures concerning the quality of manufactured guide wires and their safe application in cardiological treatment, contributes to beneficial changes, influencing the improvement of corrosion potential of this type of metal. The results of admittance ( $Z^{-1}$ ) and n coefficient for the samples exposed to artificial plasma in the temperature  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$  for 60 min showed that passive layer was not damaged. Only changes of electrical properties of the passive layers were observed (decrease of charge transfer resistance  $R_{ct}$ ).

On the ground of impedance tests it was explicitly proved that application of chemical passivation process of X10CrNi18-8 steel used for cardiological guide wires is fully justified. Next, it is planned to perform tests of oxide layers made on the surface in order to explain changes in chemical and stoichiometrical composition of the formed chemical compounds.

## Piśmiennictwo

- [1] Dąbrowski M. i in.: Kardiologia interwencyjna, Instytut Kardiologii im. Prymasa Tysiąclecia Stefana Kardynała Wyszyńskiego, Warszawa, 2000.
- [2] Marchena E. Ferreira A.: Sekrety kardiologii interwencyjnej. Urban & Partner, Wrocław, 2006.
- [3] Kargul W., Młynarski R., Piłat E.: Implantowanie stymulatorów serca i kardiowerterów-defibrylatorów, Chirurgia Polska, 7, 2005, 4, 267-279.
- [4] Marciniak J., Paszenda Z., Walke W., Kaczmarek M., Tyrlik-Held J., Kajzer W.: Stenty w chirurgii małoinwazyjnej. Monografia. Wyd. Pol. Śl., Gliwice, 2006.

## References

- [5] Paszenda Z., Tyrlik-Held J., Marciniak J.: Badania odporności korozyjnej stentów wieńcowych ze stali Cr-Ni-Mo pokrytych warstwą pasywną. Acta of Bioengineering and Biomechanics, 3, 2001, 1, s. 169-178.
- [6] Marciniak J., Tyrlik-Held J., Walke W., Paszenda Z.: Influence of steam sterilization on the corrosion resistance of Cr-Ni-Mo steel. Inżynieria Biomateriałów, 10, 2007, 69-72, s. 90-93.
- [7] Łosiewicz B., Budniok A.: Zastosowanie techniki elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej w badaniach pasywacji stopu międzymetalicznego Fe24Al w kwasie siarkowym. Ochrona przed Korozją, 2003, 11s/A/, s. 49-54.



# ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ DO OCENY STOPU Ti-6Al-4V ELI STOSOWANEGO W ORTOPEDII

M. POCHRZĄST\*, J. MARCINIAK, W. WALKE, M. KACZMAREK, J. SZEWCZENKO, S. LOSKA

INSTYTUT MATERIALÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH,  
POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

\* E-MAIL: MAGDALENA.POCHRZAST@POLSL.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 149-153*]

## Wprowadzenie

Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS) jest metodą liniowego pomiaru elektrycznej odpowiedzi badanego stopu na pobudzenie elektromagnetycznym sygnałem w szerokim paśmie częstotliwości. EIS jest powszechnie stosowanym testem do prób korozyjnych i elektrochemicznych. Tego typu badania umożliwiają porównywanie zachowania się rzeczywistego obiektu z jego układem zastępczym będącym modelem odnoszącym się do fizycznie realizowanej impedancji [1-4].

Celem pracy było, na podstawie analizy uzyskanych wyników elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, określenie przydatności przewodzenia poszczególnych wariantów obróbki powierzchniowej stopów Ti6-Al-4V ELI.

## Material i metody

W badaniach wykorzystano stop Ti-6Al-4V ELI, w postaci pręta o średnicy  $d = 14$  mm i wysokości  $h = 4$  mm. Skład chemiczny badanego stopu spełniał wymagania zawarte w normie ISO 5832-3:2007. Modyfikacja powierzchni próbek została przeprowadzona za pomocą zabiegów, którym przyporządkowano następujące oznaczenia: 1 - szlifowanie, 2 - obróbka wibracyjna, 4 - piaskowanie, 5 - polerowanie elektrolityczne, XV - anodyzację (X oznacza wartość potencjału, przy którym przeprowadzano proces). W celu uzyskania informacji o własnościach fizykochemicznych powierzchni 8 próbek ze stopu Ti-6Al-4V ELI przeprowadzone zostały badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Pomiar przeprowadzono z wykorzystaniem systemu pomiarowego AutoLab PGSTAT 302N wyposażonego w moduł FRA2 (Frequency Response Analyser). Zastosowany układ pomiarowy umożliwił prowadzenie badań w zakresie częstotliwości  $10^4$ - $10^{-3}$  Hz. W badaniach wyznaczono impedancyjne widma układu i dopasowano uzyskane dane pomiarowe do układu zastępczego. Widma impedancyjne badanego układu przedstawiono w postaci diagramów Nyquista dla różnych wartości częstotliwości oraz w postaci diagramów Bode. Otrzymane spektra EIS interpretowano po dopasowaniu metodą najmniejszych kwadratów do zastępczego układu elektrycznego. Dobór tej metody umożliwił scharakteryzowanie impedancji granicy faz: stop Ti-6Al-4V ELI – warstwa powierzchniowa – roztwór Ringera na drodze aproksymacji danych impedancyjnych za pomocą modelu elektrycznego obwodu zastępczego.

# ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY STUDY OF Ti-6Al-4V ELI ALLOY USED IN ORTHOPEADIC

M. POCHRZĄST\*, J. MARCINIAK, W. WALKE, M. KACZMAREK, J. SZEWCZENKO, S. LOSKA

INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

\* E-MAIL: MAGDALENA.POCHRZAST@POLSL.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 149-153*]

## Introduction

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is a method of linear measurement of electric response of an analyzed system to the application of a periodic small amplitude electromagnetic signal in the wide range of frequencies. EIS is commonly applied in corrosion and electrochemical tests. This type of research provides comparison of a real object and its equivalent system which is the model relating to physically realized impedance [1-4].

The main aim of the work was evaluation of usefulness of individual variants of surface treatment of Ti-6Al-4V alloy on the basis of the results of electrochemical impedance spectroscopy.

## Material and methods

The Ti6Al4V ELI alloy, in the form of bar of  $d = 14$  mm diameter and  $h = 4$  mm height, was used in the research. Chemical composition of the alloy met the requirements of ISO 5832-3:2007 standard. The following surface treatment was applied: 1 – grinding, 2 – shot peening, 4 – sandblasting, 5 – electropolishing, XV – anodization (X represents the applied potential). In order to obtain information on physicochemical properties of 8 samples made of the Ti-6Al-4V ELI alloy electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was applied. Measurements were carried out with application of the measurement system AutoLab PGSTAT 302N equipped with FRA2 module (Frequency Response Analyser). The applied system allowed to carry out the measurements in the frequency range  $10^4$ - $10^{-3}$  Hz. Impedance spectra of the tested system have been presented as Nyquist diagrams for various values of frequency and as Bode diagrams. The obtained EIS spectra were interpreted, after application of the method of least squares, to equivalent electric circuit. Application of this method allowed to characterize the impedance of the Ti-6Al-4V ELI alloy – surface coating – Ringer solution interface.

Przeprowadzona analiza impedancyjna umożliwiła wyznaczenie widm impedancyjnych dla próbek o powierzchni polerowanej elektrochemicznie i anodyzowanej przy różnych wartościach napięcia – RYS. 1-4.

Następnie na podstawie uzyskanych wykresów dopasowano modele zastępcze, które są modelami fizycznymi opisującymi zjawiska występujące w danym obiekcie. Stwierdzono, że najlepsze dopasowanie eksperymentalnych widm impedancyjnych uzyskuje się, stosując elektryczny obwód zastępczy złożony:

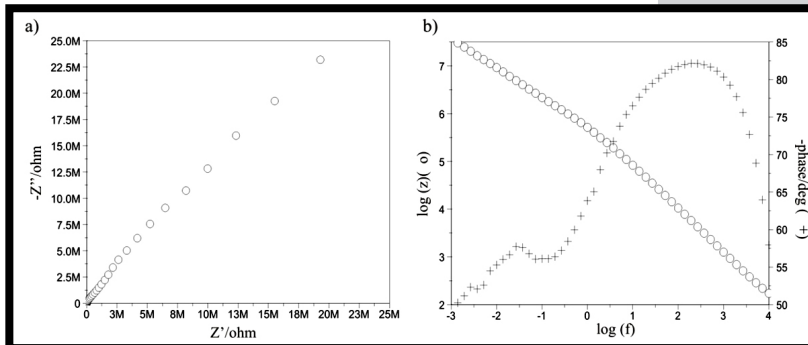
- dla próbek 1/2/4/5/57V, 1/2/4/5/77V, 1/2/4/5/87V, 1/2/4/5/97V z trzech kolejno następujących po sobie równoległych układów elementu stałofazowego połączonego z oporem w porach, oporem przejścia, oporem warstwy pasywnej i z oporem przy wysokich częstotliwościach, który może być przypisany omowemu oporowi elektrolitu - RYS. 5.

## Results

The applied impedance analysis allowed to calculate impedance spectra for the electropolished and anodized (by application of diverse voltage) samples – FIGs. 1-4.

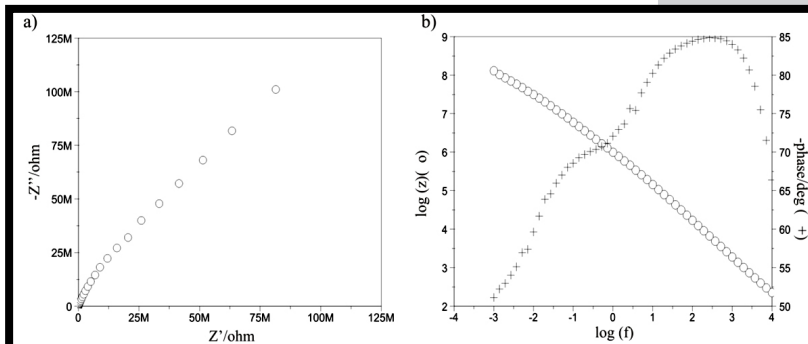
On the basis of the obtained plots, equivalent electrical circuits, which are physical models describing phenomena in the given object, were adapted. It was observed that the best fit of experimental impedance spectra is obtained for equivalent electrical circuit consisting of:

- for the samples 1/2/4/5/57V, 1/2/4/5/77V, 1/2/4/5/87V, 1/2/4/5/97V three successive, parallel capacitance systems connected with the following elements: resistance in pores, transition resistance, passive layer resistance and high frequency resistance (electrolyte resistance) – FIG. 5.



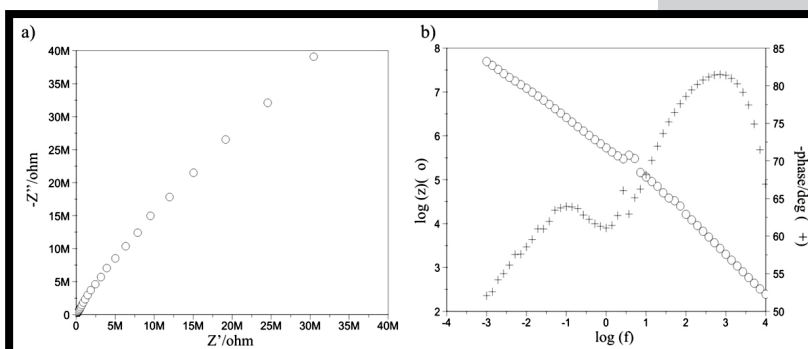
**RYS. 1.** Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/5/57V: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode.

**FIG. 1.** Impedance spectra for 1/2/4/5/57V samples: a) Nyquist plot, b) Bode plot.



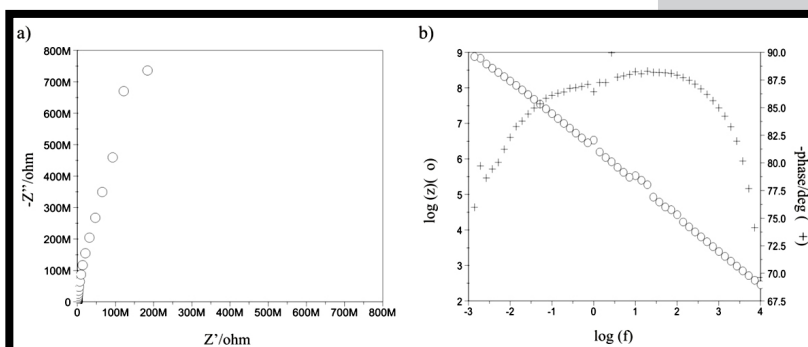
**RYS. 2.** Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/5/77V: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode.

**FIG. 2.** Impedance spectra for 1/2/4/5/77V samples: a) Nyquist plot, b) Bode plot.



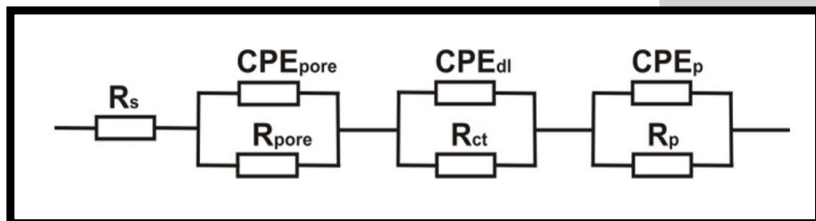
**RYS. 3.** Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/5/87V: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode.

**FIG. 3.** Impedance spectra for 1/2/4/5/87V samples: a) Nyquist plot, b) Bode plot.



**RYS. 4.** Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/5/97V: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode.

**FIG. 4.** Impedance spectra for 1/2/4/5/97V samples: a) Nyquist plot, b) Bode plot.



RYS. 5. Elektryczny obwód zastępczy układu Ti-6Al-4V ELI -warstwa potrójna-roztwór Ringera.

FIG. 5. Electrical model of the equivalent circuit for the Ti-6Al-4V ELI alloy-triple layer-Ringer solution system.

Matematyczny model impedancji dla układu: stop Ti-6Al-4V ELI – warstwa potrójna – roztwór Ringera przedstawia równanie (1).

Mathematical impedance model of the Ti-6Al-4V ELI alloy-triple layer-Ringer' solution system is presented in equation (1).

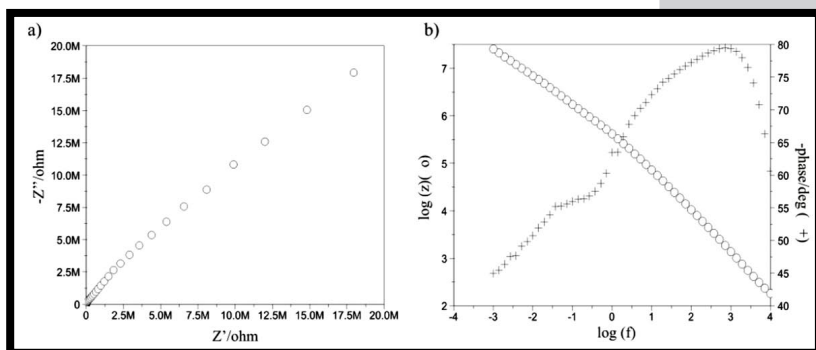
$$Z = R_s + \frac{1}{\frac{1}{R_{\text{pore}}} + Y_{\text{pore}}(j\omega)^{n_3}} + \frac{1}{\frac{1}{R_{\text{ct}}} + Y_{\text{dl}}(j\omega)^{n_2}} + \frac{1}{\frac{1}{R_p} + Y_p(j\omega)^{n_1}} \quad (1)$$

Na RYS. 5  $R_{\text{pore}}$  oznacza rezystancję elektrolitu w porach, a  $CPE_{\text{pore}}$  pojemność powierzchniowej strefy materiału o dużym stopniu rozwinięcia powierzchni (porowatej),  $R_{\text{ct}}$  oznacza opór przeniesienia ładunku na granicy faz (charakteryzuje szybkość procesu korozyjnego), a element  $CPE_{\text{dl}}$  odwzorowuje właściwości elektrochemicznej warstwy podwójnej na granicy stop Ti-6Al-4V ELI - roztwór elektrolitu, z kolei  $R_p$  i  $CPE_p$  – opór i pojemność warstwy pasywnej.

Widma impedancyjne zarejestrowane dla próbek ze stopu Ti-6Al-4V ELI o powierzchni anodyzowanej przy zróżnicowanych wartościach napięcia (bez procesu polerowania elektrochemicznego) przedstawiono na RYS. 6-9.

In FIG. 5  $R_{\text{pore}}$  means resistance of the electrolyte in pores and  $CPE_{\text{pore}}$  – capacitance of porous layer,  $R_{\text{ct}}$  is recognized as charge transition resistance (it determines corrosion rate) and  $CPE_{\text{dl}}$  represents electrochemical properties of the double layer occurred on the Ti-6Al-4V ELI alloy-Ringer' solution interface, and  $R_p$  and  $CPE_p$  – resistance and capacitance of passive layer.

Impedance spectra recorded for the samples made of Ti-6Al-4V ELI alloy after anodization realized with the use of diverse voltage (without electropolishing) were presented in FIGs. 6-9.

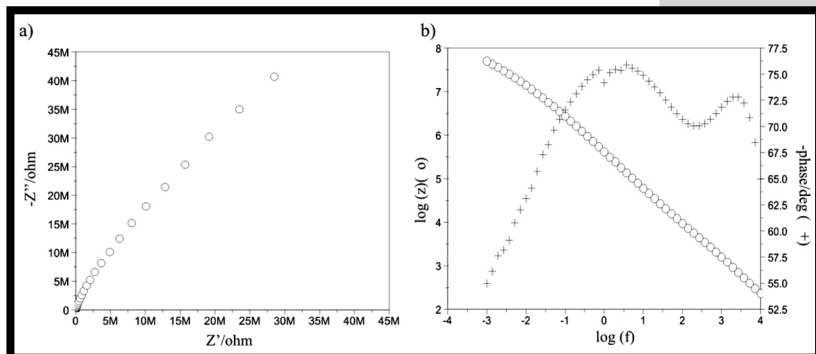


RYS. 6. Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/57V:

a) diagram Nyquista,  
b) diagram Bode.

FIG. 6. Impedance spectra for 1/2/4/57V samples:

a) Nyquist plot,  
b) Bode plot.

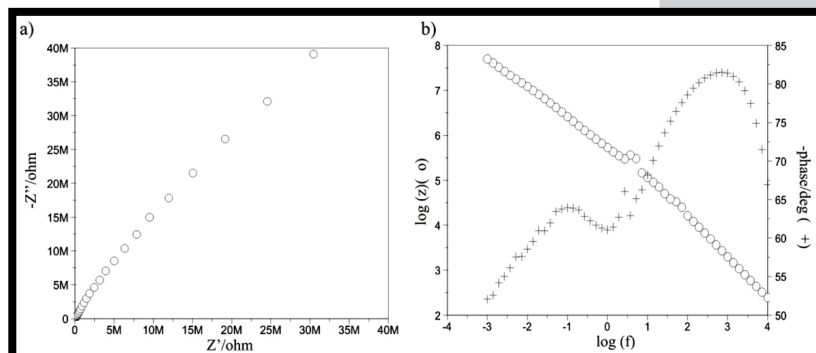


RYS. 7. Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/77V:

a) diagram Nyquista,  
b) diagram Bode.

FIG. 7. Impedance spectra for 1/2/4/77V samples:

a) Nyquist plot,  
b) Bode plot.

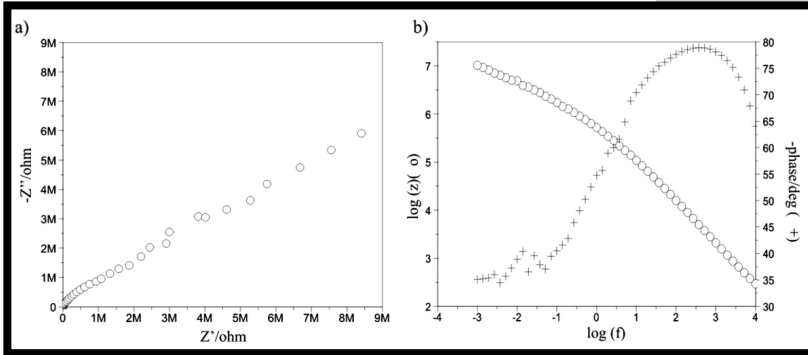


RYS. 8. Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/87V:

a) diagram Nyquista,  
b) diagram Bode.

FIG. 8. Impedance spectra for 1/2/4/87V samples:

a) Nyquist plot,  
b) Bode plot.



**RYS. 9. Widma impedancyjne wyznaczone dla próbek 1/2/4/97V:**  
**a) diagram Nyquista,**  
**b) diagram Bode.**  
**FIG. 9. Impedance spectra for 1/2/4/97V samples:**  
**a) Nyquist plot,**  
**b) Bode plot.**

Następnie na podstawie uzyskanych wykresów dopasowano modele zastępcze, które są modelami fizycznymi opisującymi zjawiska występujące w danym obiekcie. Stwierdzono, że najlepsze dopasowanie eksperymentalnych widm impedancyjnych uzyskuje się, stosując elektryczny obwód zastępczy złożony:

- dla próbek 1/2/4/57V z dwóch kolejno następujących po sobie równoległych układów elementu stałofazowego połączonego z oporem przejścia i oporem przy wysokich częstotliwościach, który może być przypisany omowemu oporowi elektrolitu.

Matematyczny model impedancji dla układu: stop Ti-6Al-4V ELI – warstwa podwójna – roztwór Ringera przedstawia równanie (2).

Na RYS. 10.  $R_{ct}$  oznacza opór przeniesienia ładunku, a  $CPE_{dl}$  pojemność warstwy podwójnej (porowatej), z kolei  $R_p$  i  $CPE_p$  – opór i pojemność warstwy pasywnej.

- w przypadku próbek 1/2/4/77V, 1/3/4/87V, 1/2/4/97V z dwóch kolejno następujących po sobie równoległych układów elementu stałofazowego połączonego z oporem przejścia i impedancją Warburga oraz z oporem przy wysokich częstotliwościach, który może być przypisany omowemu oporowi elektrolitu - RYS. 11.

Matematyczny model impedancji dla układu: stop Ti-6Al-4V ELI – warstwa podwójna (porowata) – roztwór Ringera przedstawia równanie (3).

$$Z = R_s + \frac{1}{R_{ct} + Y_{dl}(j\omega)^{n_2}} + \frac{1}{R_p + W + Y_p(j\omega)^{n_1}} \quad (3)$$

On the basis of the obtained plots, equivalent electrical circuits, which are physical models describing phenomena in the given object, were adapted. It was observed that the best fit of experimental impedance spectra is obtained for equivalent electrical circuit consisting of:

- for the samples 1/2/4/57V two successive, parallel capacitance systems connected with the following elements: transition resistance and high frequency resistance (electrolyte resistance) – FIG. 10.

Mathematical impedance model of the Ti-6Al-4V ELI alloy-double layer-Ringer' solution system is presented in equation (2).

$$Z = R_s + \frac{1}{R_{ct} + Y_{dl}(j\omega)^{n_2}} + \frac{1}{R_p + Y_p(j\omega)^{n_1}} \quad (2)$$

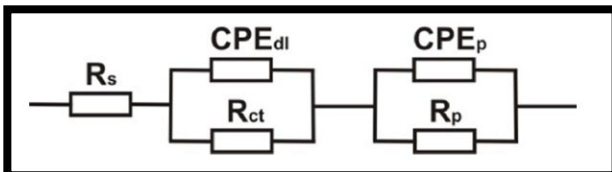
In FIG. 10  $R_{ct}$  means the resistance of charge transition and  $CPE_{dl}$  – capacitance of double layer (porous), whereas  $R_p$  and  $CPE_p$  – resistance and capacitance of passive layer.

- for the samples 1/2/4/77V, 1/3/4/87V, 1/2/4/97V two successive, parallel capacitance systems connected with the following elements: transition resistance and Warburg' impedance and high frequency resistance (electrolyte resistance) – FIG. 11.

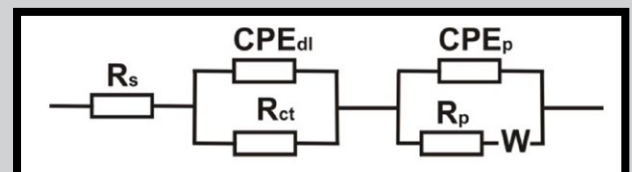
Mathematical impedance model of the Ti-6Al-4V ELI alloy-double layer (porous)-Ringer' solution system is presented in equation (3).

**TABELA 1. Wyniki analizy EIS.**  
**TABLE 1. Results of EIS analysis.**

Ti-6Al-4V	$R_s$ , $\Omega cm^2$	$R_{pore}$ , $k\Omega cm^2$	$CPE_{pore}$		$R_{ct}$ , $k\Omega cm^2$	$CPE_{dl}$		$R_p$ , $k\Omega cm^2$	$CPE_p$		W
			$Y_{03}$ , $\Omega^{-1}cm^{-2}s^{-n}$	$n_3$		$Y_{02}$ , $\Omega^{-1}cm^{-2}s^{-n}$	$n_2$		$Y_{01}$ , $\Omega^{-1}cm^{-2}s^{-n}$	$n_1$	
1/2/4/57V	57	-	-	-	817	0.6278e-6	0.88	35000	0.1359e-5	0.81	-
1/2/4/77V	58	-	-	-	3	0.1551e-5	0.79	47	0.3908e-6	0.90	0.1814e-6
1/2/4/87V	57	-	-	-	108	0.3872e-6	0.98	3850	0.2502e-6	0.89	0.2380e-6
1/2/4/97V	54	-	-	-	273	0.3874e-6	0.88	2082	0.5822e-6	0.87	0.1270e-5
1/2/4/5/57V	59	561	0.4522e-6	0.92	63000	0.1897e-5	0.88	3950	0.1350e-5	0.89	-
1/2/4/5/77V	56	593	0.3180e-6	0.96	252900	0.4326e-6	0.92	19240	0.4326e-6	0.92	-
1/2/4/5/87V	57	231	0.2586e-6	0.95	123100	0.1304e-5	0.86	5630	0.9486e-6	0.86	-
1/2/4/5/97V	58	605	0.5879e-6	0.87	137800	0.9275e-6	0.82	4380	0.9697e-6	0.84	-



**RYS. 10. Elektryczny obwód zastępczy układu Ti-6Al-4V ELI -warstwa podwójna-roztwór Ringera.**  
**FIG. 10. Electrical equivalent circuit for the Ti-6Al-4V ELI alloy-double layer-Ringer solution system.**



**RYS. 11. Elektryczny obwód zastępczy układu Ti-6Al-4V ELI -warstwa podwójna-roztwór Ringera.**  
**FIG. 11. Electrical equivalent circuit for the Ti-6Al-4V ELI alloy-double layer-Ringer solution system.**

Przyjęta struktura obwodu elektrycznego sugeruje występowanie w badanym układzie strefy wierzchniej, która charakteryzuje się porowatością i dużym stopniem rozwinięcia powierzchni oraz sugeruje proces korozyjny przez dyfuzję reagentów. Na RYS. 11  $R_{ct}$  oznacza rezystancję elektrolitu w porach, a  $CPE_{di}$  pojemność powierzchniowej strefy materiału o dużym stopniu rozwinięcia powierzchni (porowatej), z kolei  $R_p$  i  $CPE_p$  – opór i pojemność warstwy pasywnej. Trzeci element dołączony do struktury układu jest charakteryzowany przez impedancję Wartburga ( $W$ ) odwzorowującą wpływ reagentów na proces korozji.

## Podsumowanie

Przeprowadzona analiza impedancyjna wykazała, że w przypadku próbek anodyzowanych potencjałem o wartościach:  $E = +57V$ ,  $E = +77V$ ,  $E = +87V$  oraz  $E = +97V$  po procesie polerowania elektrochemicznego, występuje warstwa potrójna ze szczelną warstwą pasywną (tlenkową) znajdującą się bezpośrednio na powierzchni stopu, skutecznie zabezpieczając go przed oddziaływaniem środowiska korozyjnego. Z kolei na powierzchni próbek anodyzowanych potencjałem  $E = +57V$  bezpośrednio po piaskowaniu zaobserwowano występowanie pojedynczej warstwy porowatej o dużym rozwinięciu na powierzchni warstwy pasywnej. W przypadku próbek anodyzowanych potencjałem  $E = +77V$ ,  $E = +87V$  oraz  $E = +97V$  ujawniono w układzie zastępczym impedancję Wartburga ( $W$ ) sugerującą możliwość inicjacji procesów korozyjnych w wyniku dyfuzji reagentów, co jest zjawiskiem niekorzystnym. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, iż uzasadnione jest zastosowanie polerowania elektrochemicznego jako obróbki ostatecznej przed procesem anodyzacji dla poprawy odporności korozyjnej stopu Ti6-Al-4V ELI.

Proposed structure of the electric circuit suggests the presence of surface zone characterized by high porosity and also suggests corrosion process realized by diffusion of the reagents. In FIG. 11  $R_{ct}$  means the resistance of the electrolyte in pores and  $CPE_{di}$  – capacitance of porous surface zone, whereas  $R_p$  and  $CPE_p$  – resistance and capacitance of passive layer. The third element of the structure is characterized by Wartburg' impedance ( $W$ ), reflecting influence of reagents on corrosion.

## Summary

The impedance analysis showed that for the samples anodized with the potential of  $E = +57V$ ,  $E = +77V$ ,  $E = +87V$  and  $E = +97V$  followed by electropolishing, the presence of a triple layer with a tight passive layer is observed. The passive layer successfully protects the alloy against influence of corrosion environment. For the samples anodized with the potential of  $E = +57V$  directly after the sandblasting, the presence of single porous layer was observed. For the samples anodized with the potential of  $E = +77V$ ,  $E = +87V$  and  $E = +97V$ , the Wartburg' impedance ( $W$ ) in the equivalent circuit was revealed. The presence of the Wartburg' impedance suggests possibility of corrosion initiation as the result of reagents diffusion, which is an unfavorable phenomenon. The obtained results indicate that application of electropolishing directly before anodization should be considered as the final surface treatment.

## Piśmiennictwo

- [1] Łosiewicz B., Budniok A: Use of electrochemical impedance spectroscopy technique to investigate the passivation of intermetallic Fe24Al alloy in sulphuric acid. *Corrosion of Protection* 11s, 2003, pp. 49-54.
- [2] A. K. Shukla, R. Balasubramaniam: Effect of surface treatment on electrochemical behavior of CP Ti, Ti-6Al-4V and Ti-13Nb-13Zr alloys in simulated human body fluid, *Corrosion Science* 48, 2006, pp. 1696-1720.

## References

- [3] Blanco G., Bautista A., Takenouti H.: EIS study of passivation of austenitic and duplex stainless steels reinforcements in simulated pore solutions. *Cement & Concrete Composites* 28 (2006) 212-219.
- [4] Trzaska M., Trzaska Z.: Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna w inżynierii materiałowej. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2010.

# BIOKOMPATYBILNOŚĆ MODYFIKOWANEGO POWIERZCHNIOWO STOPU Ti6Al4V ELI BADANEGO W SBF

S. LOSKA<sup>1\*</sup>, J. SZEWCZENKO<sup>1</sup>, J. TYRLIK-HELD<sup>1</sup>, Z. PASZENDA<sup>1</sup>,  
M. POCHRZĄST<sup>1</sup>, K. NOWIŃSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH,  
POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

<sup>2</sup> INSTYTUT GEOLOGII STOSOWANEJ, POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
UL. AKADEMICKA 2, 44-100 GLIWICE

\* E-MAIL: SONIA.LOSKA@POLSL.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 154-158*]

## Wprowadzenie

Stopy tytanu charakteryzują się dobrą biokompatybilnością i odpornością korozyjną w środowisku tkankowym, jednak skład chemiczny stopu Ti6Al4V ELI budzi zastrzeżenia, głównie ze względu na udział aluminium i wanadu. Głównym produktem degradacji biologicznej V jest  $V_2O_5$ , charakteryzujący się dużą rozpuszczalnością w organizmie, a ze względu na dużą cytotoksyczność może powodować w organizmie zaburzenia neurogenne. Aluminium wpływa natomiast na rozmiękczenie kości, uszkadza komórki nerwowe oraz niekorzystnie wpływa na aktywność i funkcje enzymów i neuroprzekazników, co w konsekwencji może wywoływać schorzenia mózgu i naczyń krwionośnych [1,2].

Decydujący wpływ na jakość finalną implantów ze stopów tytanowych, w tym szczególnie na biokompatybilność, ma struktura i grubość warstwy powierzchniowej. W celu ograniczenia przenikania jonów pierwiastków stopowych do organizmu opracowano liczne metody modyfikacji powierzchni stopów tytanu, wśród których dominują metody mechaniczne, chemiczne, elektrochemiczne i termiczne. W rezultacie na powierzchni stopów tytanu oprócz tlenków tytanu występują inne tlenki skorelowane ze składem chemicznym podłoża. Jedną z finalnych metod modyfikacji powierzchni implantów jest anodyzacja, w wyniku której wytwarza się na powierzchni implantu warstwę tlenkową o grubości od kilkunastu do kilkuset nm. Grubość, struktura oraz skład chemiczny warstwy tlenkowej wytworzonej w procesie anodyzacji uzależniona jest od rodzaju elektrolitu, metody wytwarzania, czasu utleniania, parametrów elektrycznych procesu (napięcie, gęstość prądu) [3,4].

Warstwa powstała na powierzchni implantu w wyniku anodyzacji powierzchni, powinna charakteryzować się stabilnością termodynamiczną, zwartością, jednorodnością, niskim współczynnikiem cieplnym oraz zdolnością do repasywacji po uszkodzeniu w obecności płynów fizjologicznych. Warstwa pasywna charakteryzująca się takimi właściwościami ogranicza przenikanie jonów pierwiastków stopowych do organizmu. Właściwości fizykochemiczne powierzchni implantów dodatkowo mogą być uzależnione od zastosowanej w końcowym procesie wytwarzania implantów metody sterylizacji [5,6].

Celem pracy była próba optymalizacji warunków wstępnej obróbki mechanicznej stopu poprzedzającej proces anodyzacji przeprowadzany w kontrolowanych warunkach prądowych, z uwzględnieniem procesu sterylizacji parowej oraz długotrwałej ekspozycji w roztworze Ringera, dla uzyskania poprawy biotolerancji stopu Ti6Al4V ELI.

# BIOCOMPATIBILITY OF SURFACE MODIFIED Ti6Al4V ELI ALLOY TESTED IN SBF

S. LOSKA<sup>1\*</sup>, J. SZEWCZENKO<sup>1</sup>, J. TYRLIK-HELD<sup>1</sup>, Z. PASZENDA<sup>1</sup>,  
M. POCHRZĄST<sup>1</sup>, K. NOWIŃSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF APPLIED GEOLOGY,  
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
UL. AKADEMICKA 2, 44-100 GLIWICE, POLAND

\* E-MAIL: SONIA.LOSKA@POLSL.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 154-158*]

## Introduction

Titanium alloys have good biocompatibility and corrosion resistance in tissue environments, however chemical composition of Ti6Al4V ELI alloy raises questions, mainly due to Al and V participation. The main product of biological degradation of V is  $V_2O_5$ , characterized by high solubility in the body, and because of its high cytotoxicity in the body can cause neurogenic disorders. Aluminium has an effect on the softening of the bones, nerve cell damage and impair the activity and function of enzymes and neurotransmitters, which in turn can cause diseases of the brain and blood vessels [1,2].

Decisive impact on the final quality of implants made of titanium alloys, especially on biocompatibility, has the structure and thickness of the surface layer. In order to reduce the penetration of ions of alloying elements into the body have been developed numerous methods of surface modification of titanium alloys, among which the following are predominant: mechanical, chemical, electrochemical and thermal. As a result, on the surface of titanium alloys, beside titanium oxides, other oxides which are correlated to the chemical composition of the substrate are appeared. One of the final methods of surface modification of implants is anodization process, which produce on the implant surface the oxide layer with a thickness from several to several hundred nm. Thickness, structure and chemical composition of the oxide layer produced in the anodization process depends on the type of electrolyte, method of manufacturing, time of oxidation, the electrical parameters (voltage, current density) [3,4].

Layer, formed on the surface of the implant by anodization process, should be characterized by thermodynamic stability, compactness, uniformity, low thermal coefficient and the ability to repassivation after injury in the presence of physiological fluids. The passive layer characterized by such properties limits the release of ions of alloying elements into the body. Physical and chemical properties of implant surfaces can be additionally dependent on the method of sterilization used as a final process in the production of implants [5,6].

The aim of study was attempt to optimize the conditions for pre-machining alloy prior to anodizing process carried out under controlled current conditions, including the process of steam sterilization and long-term exposure in Ringer's solution, in order to improve biocompatibility of Ti6Al4V ELI alloy.

## Materiał i metodyka badań

W badaniach wykorzystano stop Ti6Al4V ELI, w postaci pręta o średnicy 6, 8 i 14 mm. Skład chemiczny badanego stopu spełniał wymagania zawarte w normach ISO 5832-3 i ASTM F-136. Z prętów o średnicy 8 i 14 mm pobrano próbki do badań odporności na korozję odpowiednio szczelinową i wżerową. W badaniach wykorzystano próbki, których modyfikacja powierzchni została przeprowadzona za pomocą zabiegów, którym przyporządkowano następujące oznaczenia: 1 – szlifowanie, 2 – obróbka wibracyjna, 3 – polerowanie mechaniczne, 5 – polerowanie elektrolityczne, XV – anodyzację (X oznacza wartość potencjału, przy którym przeprowadzano proces). Ponadto część próbek poddano zabiegowi sterylizacji parowej (S).

Szlifowanie mechaniczne prowadzono kolejno na papierach ściernych o gradacji 120÷600. Obróbkę wibracyjną przeprowadzono z udziałem kształtek ceramicznych oraz środka zwilżającego. Polerowanie mechaniczne przeprowadzono na polerce ręcznej z wykorzystaniem szczotek szalowych i pasty polerskiej. Polerowanie elektrolityczne prowadzono w kąpeli na bazie kwasu chromowego (E-395 Firmy POLIGRAT GmbH), przy gęstości prądu 10÷30 A/cm<sup>2</sup>. Proces anodyzacji prowadzono przy użyciu elektrolitu na bazie kwasów fosforowego i siarkowego (TitanColor Firmy POLIGRAT GmbH) przy potencjałach 57 V, 77 V, 87 V oraz 97 V. W wyniku anodyzacji przeprowadzonej po polerowaniu elektrolitycznym, w zależności od zastosowanego napięcia, uzyskano próbki o różnym zabarwieniu. Sterylizację parową przeprowadzono w autoklawie Basic Plus firmy Mocom, w temperaturze 134°C przy ciśnieniu 2,1 bar przez 12 minut.

Badania chropowatości powierzchni przeprowadzono z wykorzystaniem metody liniowego mechanicznego pomiaru stykowego przy użyciu profilografometru SURTRONIC 3+ firmy Taylor/Hobson. Parametr chropowatości Ra wyznaczano z dokładnością 0,02 μm.

Badania odporności na korozję wżerową zostały przeprowadzone metodą potencjodynamiczną zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-13. Natomiast badania odporności na korozję szczelinową przeprowadzono zgodnie z normą ASTM F 746. Do obu badań wykorzystano potencjostat VoltaLab@PGP201 firmy Radiometer. Jako elektrodę odniesienia zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową (NEK) typu KP-113, elektrodę pomocniczą stanowił drut platynowy.

Badania odporności na korozję wżerową i szczelinową rozpoczynano od potencjału  $E_{pocz} = E_{OCP} - 100$  mV. Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością 3 mV/s do osiągnięcia zakresu pomiarowego +4000 mV lub uzyskania gęstości prądu anodowego 1 mA/cm<sup>2</sup> po czym zmieniano kierunek polaryzacji. Badania przeprowadzono w roztworze Ringera, firmy B. Braun Melsungen AG w temperaturze 37±1°C. Na podstawie zarejestrowanych krzywych polaryzacji anodowej wyznaczono charakterystyczne wielkości opisujące odporność na korozję wżerową, tj.: potencjał korozyjny  $E_{kor}$ , potencjał transpasywacji  $E_{tr}$ , potencjał przebiccia  $E_b$ , potencjał repasywacji  $E_{cp}$ , opór polaryzacyjny  $R_p$ . Opór polaryzacyjny wyznaczono metodą Sterna. Ze względu na konieczność zachowania linowej zależności pomiędzy gęstością prądu a potencjałem próbki analizowano zakres ±10 mV w stosunku do potencjału korozyjnego.

Badania odporności na korozję szczelinową przeprowadzono rejestrując przez 15 minut dla próbek spolaryzowanych potencjałem +800 mV krzywą gęstości prądu w funkcji czasu.

## Material and methods

The Ti6Al4V ELI alloy, in the form of bars of 6, 8 and 14 mm diameter, was used in the research. The chemical composition of the alloy met the requirements of ISO 5832-3 and ASTM F-136 standards. The bars of 8 and 14 mm diameter were used for the samples for crevice and pitting corrosion tests, respectively. The following surface treatment was applied: 1 – grinding, 2 – vibration machining, 3 – mechanical polishing, 5 – electropolishing, XV – anodization (X represents the applied potential). In addition, some samples were steam sterilized (S).

Sand papers 120÷600 were applied for the grinding. Vibration machining with ceramic molders and a wetting agent was used. The mechanical polishing was carried out with the use of sisal brushes and polishing paste. The electropolishing was carried out in the bath based on chromic acid (E-395 POLIGRAT GmbH) with current density 10÷30 A/cm<sup>2</sup>. The anodization was carried out in the electrolyte based on phosphoric and sulphuric acids (Titan Color POLIGRAT GmbH) by applying the following potentials 57, 77, 87 and 97 V. In the result of anodization conducted after electropolishing process, depending on the applied voltage, different colours of the samples have been obtained. The steam sterilization was carried out for the following parameters: temperature – 134°C, pressure – 2,1 bar, time – 12 minutes, in the Basic Plus autoclave (Mocom).

The study of surface roughness was carried out using a linear method of measurement of the mechanical pin with 3+ profilografometer SURTRONIC's Taylor / Hobson. Parameter Ra was determined with an accuracy of 0.02 μm.

Pitting corrosion tests were carried out by means of potentiodynamic method in accordance with the PN-EN ISO 10993-13 standard. The study of resistance to crevice corrosion was carried out in accordance with ASTM F 746 standard. For both tests VoltaLab@PGP201 potentiostat (Radiometer) was applied. As the reference electrode, saturated calomel electrode (SCE) was applied and the auxiliary electrode was a platinum wire.

The pitting and crevice corrosion resistance tests started with the potential  $E_{pocz} = E_{OCP} - 100$  mV. The change of potential was followed at a rate of 3 mV/s in anodic direction until the range of +4000 mV or anodic current density of 1 mA/cm<sup>2</sup> was achieved. Then the scanning direction was reversed. The tests were carried out in Ringer's (B. Braun Melsungen AG) at the temperature of 37±1°C. On the basis of anodic polarization curves the characteristic parameters describing the resistance to pitting corrosion, i.e. corrosion potential  $E_{kor}$ , transpassivation potential  $E_{tr}$ , breakdown potential  $E_b$ , repassivation potential  $E_{cp}$  and polarization resistance  $R_p$ , have been determined. Polarization resistance was determined by Stern method. Because of the need to preserve the linear relationship between current density and sample potential, the range of ±10 mV relative to corrosion potential was analyzed.

Research of crevice corrosion resistance was carried out by recording the current density as a function of time by at least 15 minutes for samples polarized with potential of +800 mV.

Próbki wykonane z pręta o średnicy 6 mm i długości 48 mm po zabiegach modyfikacji powierzchni i w procesie sterylizacji wykorzystano do badań mających na celu oznaczenie ilości jonów Ti, Al, V oraz Cr, które przeniknęły do roztworu. Próbki zanurzono na okres 28 dni w 100 ml płynu fizjologicznego Ringera o temperaturze  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Stężenia jonów metalicznych w roztworze zmierzono za pomocą spektrometru JY 2000, firmy Yobin – Yvon, wykorzystującego metodę emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-AES). Przy sporządzaniu krzywej wzorcowej wykorzystano rozcieńczone materiały wzorcowe firmy Merck. Próbki po 28 dniach przebywania w roztworze Ringera poddano ponownie badaniom odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną.

## Wyniki badań

Parametr chropowości Ra próbek po różnych zabiegach modyfikacji powierzchni wynosił 0,22  $\mu\text{m}$ .

Wyniki badań odporności na korozję wżerową dla próbek niesterylizowanych (NS), sterylizowanych (S) oraz sterylizowanych i zanurzonych na 28 dni w roztworze Ringera (28D) przedstawiono w TABELI 1.

Wyniki analizy składu chemicznego roztworu Ringera po 28 dniach przetrzymywania w nim próbek ze stopu Ti6Al4V ELI poddanych różnym zabiegom modyfikacji powierzchni oraz wartości odchylenia standardowego (SD) dla poszczególnych pomiarów przedstawiono w TABELI 2.

Przeprowadzone badania odporności na korozję szczelinową wykazały, iż w całym czasie badania nie stwierdzono wzrostu gęstości prądu przy polaryzacji powierzchni próbek potencjałem  $E = +800\text{mV}$ .

The samples made of the rod of 6 mm diameter and length equal to 48 mm were applied in the tests carried out in order to evaluate concentration of Ti, Al, V and Cr ions released to the solution. Samples were submerged in 100 ml of the Ringer's physiological solution at the temperature of  $37\pm 1^\circ\text{C}$  for 28 days. The ions concentration was measured by means of JY 2000 spectrometer (Yobin – Yvon), with the use of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Pattern curve was worked out on the basis of diluted model materials by Merck. For the samples after 28 days exposure, pitting corrosion tests by means of potentiodynamic method were also carried out.

## Results

The roughness parameter Ra of samples of Ti6Al4V ELI alloy after different methods of surface modification was equal to 0.22  $\mu\text{m}$ .

The results of pitting corrosion resistance for no sterilized specimens (NS), sterilized (S) and sterilized and then immersed for 28 days in Ringer's solution (28D) are shown in TABLE 1.

Results of ions release, from samples after different surface modifications, into the Ringer's solution after 28 days exposure, as well as the values of standard deviation (SD) for individual measurements are presented in the TABLE 2.

The study of resistance to crevice corrosion showed that, after polarization of the samples with potential of  $E = +800\text{mV}$ , no increase in current density has been stated over all the time of test.

**TABELA 1. Wyniki badań odporności na korozję wżerową stopu Ti6Al4V ELI dla próbek niesterylizowanych (NS), po sterylizacji (S) oraz po 28 dniach przebywania w roztworze Ringera (28D).**  
**TABLE 1. Results of pitting corrosion resistance of Ti6Al4V ELI alloy for no sterilized (NS) samples, sterilized (S) and immersed by 28 days in Ringer's solution (28D).**

Oznaczenie próbek / Sample number	$E_{kor}$ , mV			$E_{tr}$ , mV			$E_b$ , mV			$E_{cp}$ , mV			$R_p$ , $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$		
	NS	S	28D	NS	S	28D	NS	S	28D	NS	S	28D	NS	S	28D
1/2/3	-20	85	-170	1500	1520	-	-	-	-	-	-	-	490	405	380
1/2/3/57V	65	133	410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2677	2069	340
1/2/3/77V	-20	127	465	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3050	5645	465
1/2/3/87V	115	126	385	-	-	-	-	-	4000	-	-	1830	3867	3230	525
1/2/3/97V	49	186	336	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2200	4690	760
1/2/3/5	-276	-65	75	-	-	-	-	-	2490	-	-	1690	283	307	585
1/2/3/5/57V	104	133	225	-	-	-	2309	2398	3055	1856	2008	1730	6477	5238	2190
1/2/3/5/77V	85	24	235	-	-	-	2378	2233	2750	1905	1907	1805	11710	10906	1930
1/2/3/5/87V	-62	-76	225	-	-	-	2397	2360	2850	1904	1881	1770	12015	11523	1755
1/2/3/5/97V	49	38	165	-	-	-	2365	2190	2840	1886	1860	1675	13057	8830	1990

**TABELA 2. Wyniki badań stężenia jonów metalicznych w roztworze Ringera.**  
**TABLE 2. Results of ions release into the Ringer's solution.**

Oznaczenie próbek / Sample number	Ti		Al		V		Cr	
	ppm	SD	ppm	SD	ppm	SD	ppm	SD
1/2/3	1.59	0.09	0.333	0.01	0.048	0.003	-	-
1/2/3/57V	3.92	0.028	1.52	0.01	1.45	0.02	-	-
1/2/3/77V	3.87	0.038	1.49	0.011	1.33	0.15	-	-
1/2/3/87V	3.43	0.023	1.10	0.005	1.25	0.13	-	-
1/2/3/97V	3.84	0.055	1.53	0.003	1.20	0.01	-	-
1/2/3/5	2.99	0.054	1.23	0.009	0.98	0.076	0.334	0.035
1/2/3/5/57V	2.88	0.012	1.01	0.004	0.85	0.05	0.283	0.008
1/2/3/5/77V	2.54	0.01	0.989	0.008	0.62	0.07	0.25	0.025
1/2/3/5/87V	2.47	0.076	0.988	0.006	0.62	0.01	0.223	0.009
1/2/3/5/97V	2.17	0.068	0.894	0.003	0.59	0.01	0.199	0.019



## Omówienie wyników badań

W przebiegu krzywych polaryzacji anodowej zaobserwowano, iż w przypadku próbek z grupy (1/2/3/XV) proces anodyzacji spowodował wzrost potencjału korozyjnego  $E_{kor}$  do zakresu  $+49 \div +115$  mV (TABELA 1), wyjątek stanowiły próbki z grupy (1/2/3/77V). Natomiast dla próbek z grupy (1/2/3/5/XV) proces anodyzacji we wszystkich przypadkach spowodował znaczny wzrost potencjału korozyjnego. Proces sterylizacji próbek z grupy (1/2/3/XV) wpłynął korzystnie na dalszy znaczny wzrost wartości potencjału korozyjnego  $E_{kor}$  do wartości  $+85 \div +186$  mV. W przypadku próbek sterylizowanych po procesie anodyzacji, poprzedzonym polerowaniem elektrolitycznym (1/2/3/5/XV) nie zaobserwowano jednoznacznego wpływu sterylizacji na wartość potencjału korozyjnego  $E_{kor}$ . Natomiast przetrzymywanie próbek w roztworze Ringera przez 28 dni spowodowało, w większości przypadków, wyraźnie zaznaczony wzrost potencjału korozyjnego, z wyjątkiem próbek z grupy 1/2/3.

W przypadku próbek z grupy (1/2/3) zarówno przed jak i po procesie sterylizacji zarejestrowano na krzywej polaryzacji anodowej potencjał transpasywacji w zakresie  $E_{tr} = +1500 \div +1520$  mV, co wskazuje na zmianę własności fizykochemicznych warstwy pasywnej. Natomiast po 28 dniach przebywania w roztworze Ringera próbki charakteryzowały się perfekcyjną pasywacją w całym zakresie pomiarowym. Dla próbek (1/2/3/5) niesterylizowanych i sterylizowanych obserwowano perfekcyjną pasywację, natomiast po 28 dniach ekspozycji w roztworze Ringera zaobserwowano na krzywej polaryzacji anodowej występowanie pętli histerezy. Podobne zmiany odporności korozyjnej stwierdzono dla próbek z grupy (1/2/3/87V). Dla pozostałych grup próbek anodyzowanych (1/2/3/XV) występowanie perfekcyjnej pasywacji stwierdzono w całym zakresie pomiarowym. Krzywe polaryzacji anodowej dla próbek anodyzowanych po polerowaniu elektrolitycznym (1/2/3/5/XV) charakteryzowały się występowaniem pętli histerezy. Wyznaczone wartości potencjału przebicia  $E_b$  dla próbek zarówno przed jak i po procesie sterylizacji utrzymywały się na zbliżonym poziomie w zakresie  $+2190 \div +2398$  mV. Przetrzymywanie próbek w roztworze Ringera przez okres 28 dni spowodowało natomiast dalszy wzrost wartości potencjału przebicia – TABELA 1. Potencjał repasywacji  $E_{cp}$  dla tych próbek utrzymywał się na zbliżonym poziomie.

Proces anodyzacji próbek z grup (1/2/3/XV) i (1/2/3/5/XV) spowodował wyraźny wzrost wartości oporu polaryzacyjnego  $R_p$  – TABELA 1. Dotyczyło to zarówno próbek niesterylizowanych jak i sterylizowanych. Większe wartości oporu polaryzacyjnego  $R_p$  obserwowano dla próbek anodyzowanych po polerowaniu elektrolitycznym (1/2/3/5/XV). Badania próbek po 28-dniowej ekspozycji w roztworze Ringera wykazały natomiast, iż wartości oporu polaryzacyjnego  $R_p$  uległy znacznemu zmniejszeniu.

Najmniejsze stężenie jonów Ti, Al, V w roztworze Ringera, w którym przebywały próbki ze stopu Ti6Al4V ELI po różnych zabiegach modyfikacji powierzchni, zaobserwowano dla próbek po polerowaniu mechanicznym (1/2/3) – TABELA 2. Dla próbek anodyzowanych z grupy (1/2/3/XV) stwierdzono wzrost stężenia wymienionych jonów metalicznych. Stężenie to w niewielkim zakresie ulegało zmniejszeniu wraz ze wzrostem potencjału anodyzacji. W efekcie zastosowania procesu polerowania elektrolitycznego (1/2/3/5) nastąpiło zwiększenie stężenia jonów Ti, Al, V przenikających do roztworu Ringera. Ponadto w grupie tej zaobserwowano występowanie jonów Cr w przypadku wszystkich badanych próbek. Proces anodyzacji próbek z grupy (1/2/3/5/XV) skutkowało zmniejszeniem stężenia jonów w roztworze. Wraz ze wzrostem potencjału utleniania anodowego obserwowano zmniejszenie stężenia jonów metalicznych, które przeniknęły do roztworu Ringera.

## Discussion

On the anodic polarization curves has been observed, that in samples from group (1/2/3/XV) the anodizing process has increased the corrosion potential  $E_{kor}$  to the range of  $+49 \div +115$  mV (TABLE 1), with the exception of samples from group (1/2/3/77V). However, for samples from group (1/2/3/5/XV) anodizing process in all cases caused a significant increase in the corrosion potential. The sterilization process of samples from group (1/2/3/XV) positively influenced further increase in the corrosion potential to values  $E_{kor} = +85 \div +186$  mV. For samples sterilized after the anodizing process, preceded by electrolytic polishing (1/2/3/5/XV), there was no clear effect of sterilization on the corrosion potential value  $E_{kor}$ . While keeping the samples in Ringer's solution for 28 days, in most cases, a pronounced increase of corrosion potential was observed, with the exception of samples from group (1/2/3).

For samples of the (1/2/3) group both before and after the sterilization process, the transpassivation potential in range of  $E_{tr} = +1500 \div +1520$  mV was recorded on the anodic polarization curves. It indicates the changes in the physicochemical properties of the passive layer. However, after 28 days of keeping in Ringer's solution the samples were characterized by a perfect passivation in whole measuring range. For no sterilized and sterilized samples of (1/2/3/5) group the perfect passivation was also observed, while after 28 days of exposure in Ringer's solution the hysteresis loop on the anodic polarization curve was appeared. Similar changes were found for the corrosion resistance of samples from group (1/2/3/87V). For other groups of anodized samples (1/2/3/XV) the existence of perfect passivation was found in the whole measurement range. Anodic polarization curves, for samples anodized after an electrolytic polishing (1/2/3/5/XV), were characterized by the presence of hysteresis loop. The values of breakdown potential  $R_p$  for the samples, both before and after the sterilization process, remained at a similar level of  $+2190 \div +2398$  mV. Keeping the samples in Ringer's solution for 28 days resulted in a further increase in the values of the breakdown potential – TABLE 1. Repassivation potential  $E_{cp}$  for these samples remained at a similar level.

Anodizing process of samples from groups (1/2/3/XV) and (1/2/3/5/XV) has caused a marked increase in the value of polarization resistance  $R_p$  – TABLE 1. This concerned both no sterilized samples and sterilized. Higher values of polarization resistance  $R_p$  was observed for samples anodized after an electrolytic polishing (1/2/3/5/XV). Samples after 28-day exposure in Ringer's solution showed, however, that the values of polarization resistance  $R_p$  were significantly reduced.

The minimum Ti, Al and V ions concentrations in Ringer's solution, in which the sample were kept after different surface modification treatments, were observed for the samples after mechanical polishing (1/2/3) – TABLE 2. For anodized samples from (1/2/3/XV) group the increased concentrations of these metallic ions were stated. This concentration range was subject to a small decrease with increasing anodizing potential. As a result of the application of electropolishing process (1/2/3/5) there was an increase of concentrations of Ti, Al and V ions, penetrating to the Ringer's solution. In addition, in this group the presence of Cr ions was observed for all tested samples. Anodizing process of samples from the group (1/2/3/5/XV) resulted in a decrease of ions concentration in the solution. With the growth of the potential of anodic oxidation, the reduce of concentration of metal ions that have penetrated into Ringer's solution, was observed.

Przeprowadzone badania odporności na korozję szczelinową wykazały w przypadku wszystkich badanych próbek brak wzrostu gęstości prądu przy polaryzacji ich powierzchni potencjałem  $E = +800\text{mV}$ .

## Podsumowanie

Proces anodyzacji nie powodował zmiany chropowatości powierzchni próbek, niezależnie od poprzedzających go zastosowanych metod modyfikacji, jak również niezależnie od wartości napięcia, dla której przeprowadzano anodyzację.

Badania odporności na korozję szczelinową wykazały, iż niezależnie od sposobu modyfikacji powierzchni stop Ti-6Al-4V ELI posiada całkowitą odporność na ten rodzaj korozji.

Przeprowadzone badania potencjodynamiczne wykazały, iż wstępne zabiegi modyfikacji powierzchni (poprzedzające proces anodyzacji) wpływają na odporność korozyjną stopu Ti6Al4V ELI, zarówno dla próbek niesterylizowanych, sterylizowanych, jak i przetrzymywanych przez 28 dni w roztworze Ringera. W szczególności proces sterylizacji powoduje zwiększenie wartości potencjału korozyjnego  $E_{kor}$  dla próbek anodyzowanych po uprzednim polerowaniu mechanicznym (1/2/3/XV). Długotrwała ekspozycja na roztwór Ringera spowodowała znaczący wzrost wartości potencjału korozyjnego  $E_{kor}$  dla wszystkich próbek poddanych procesowi anodyzacji (1/2/3/XV, 1/2/3/5/XV).

Proces anodyzacji poprzedzony polerowaniem mechanicznym (1/2/3/XV) powodował występowanie dla badanych próbek perfekcyjnej pasywacji w całym zakresie pomiarowym. Natomiast proces polerowania elektrolitycznego (1/2/3/5/XV) poprzedzający anodyzację powodował występowanie pętli histerezy na krzywych polaryzacji anodowej oraz zjawiska repasywacji. Pomimo występowania perfekcyjnej pasywacji w grupie próbek anodyzowanych po polerowaniu mechanicznym (1/2/3/XV) stężenia jonów Ti, Al, oraz V występujące po 28 dniach przebywania w roztworze Ringera były wyższe w porównaniu z grupą próbek anodyzowanych po polerowaniu elektrolitycznym (1/2/3/5/XV).

Niestety niekorzystnym zjawiskiem obserwowanym w grupie próbek poddanych polerowaniu elektrolitycznemu poprzedzającym proces utleniania anodowego (1/2/3/5/XV) było występowanie w roztworze Ringera jonów Cr charakteryzujących się wysoką toksycznością.

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę jako projekt badawczy Nr N N507 513338.*

The study of crevice corrosion showed the lack of increase in current density after the polarization of surface with potential  $E = +800\text{mV}$  for all tested samples.

## Summary

Anodizing process did not cause changes in surface roughness of the samples, regardless of the preceding methods of surface modification, and regardless of the voltage for which the anodization was carried out.

The study on the crevice corrosion showed that independently of how surface modification was applied, Ti-6Al-4V ELI alloy is resisted to this type of corrosion.

The potentiodynamic study showed, that the pretreatment surface modification (prior to anodizing process) affect the corrosion resistance of Ti6Al4V ELI alloy for no sterilized samples, sterilized as well for kept by 28 days in Ringer's solution. In particular, the beneficial effects of sterilization process on the increase of corrosion potential  $E_{kor}$  for the samples anodized after mechanical polishing (1/2/3/XV) was observed. Long-term exposure to Ringer's solution caused a significant increase in the corrosion potential  $E_{kor}$  for all samples subjected to the process of anodizing (1/2/3/XV, 1/2/3/5/XV).

The anodizing process preceded by mechanical polishing (1/2/3/XV) caused the occurrence of perfect passivation in whole measurement range for all tested samples. While electrolytic polishing process (1/2/3/5/XV) prior to anodizing caused the occurrence of hysteresis loop on the anodic polarization curves and the phenomenon of repassivation. In spite of perfect passivation, that was observed in group of samples anodized after mechanical polishing (1/2/3/XV), the concentrations of Ti, Al, and V ions in Ringer's solution after 28 days were higher in comparison with the group of samples that were anodized after electrolytic polishing (1/2/3/5/XV).

Unfortunately, the adverse phenomenon observed in group of samples subjected to electrolytic polishing before anodizing process (1/2/3/5/XV) was the appearance in Ringer's solution Cr ions which are characterized by high toxicity.

## Acknowledgements

*The work is financially supported by the research project Nr N N507 513338.*

## Piśmiennictwo

- [1] J. Marciniak: Inżynieria biomateriałów. Zagadnienia wybrane, Wydawnictwo Pracowni Komputerowej Jacka Skalmierskiego, Gliwice 2009.
- [2] M.A. Khan, R.L. Williams, D.F. Williams, The corrosion behaviour of Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solution, *Biomaterials* 20 (1999) 631-637.
- [3] T. Wierchoń, E. Czarnowska, D. Krupa: Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.

## References

- [4] LiuX., ChuP.K., DingC.: Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science and Engineering R* 47 (2004) 49-121.
- [5] Z. Paszenda, W. Walke, S. Jadacka: Elektrochemiczne badania odporności korozyjnej stopu Ti-6Al-7Nb w warunkach symulujących środowisko układu kostnego, *Ochrona przed korozją*, 53, 12, (2010) 670-674.
- [6] J. Pouilleau, D. Devilliers, F. Garrido, S. Durand-Vidal, E. Mahé, Structure and composition of passive titanium oxide films, *Materials Science and Engineering B*, 47, 3 (1997) 235-243.

# ZASTOSOWANIE ELEKTROCHEMICZNEJ SPEKTROSKOPII IMPEDANCYJNEJ DO OCENY WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH STOPU Ti-6Al-4V ELI O MODYFIKOWANEJ POWIERZCHNI

M. KIEL\*, J. MARCINIAK, W. WALKE, J. SZEWCZENKO

ZAKŁAD INŻYNIERII MATERIAŁÓW BIOMEDYCZNYCH,  
INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH,  
WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY, POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

\* E-MAIL: MARTA.KIEL@POLSL.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 159-163*]

## Wprowadzenie

Stopy na osnowie tytanu z uwagi na bardzo dobre własności mechaniczne, mały ciężar właściwy oraz dobrą odporność na korozję wykorzystywane są w różnych dziedzinach medycyny [1,2]. Podstawowym kryterium przydatności biomateriału metalowego na implanty jest jego biokompatybilność, która jest ściśle związana z własnościami fizykochemicznymi powierzchni implantu [1-7]. Stop Ti-6Al-4V ELI jest najczęściej stosowany na implanty w ortopedii, traumatologii, stomatologii czy kardiologii.

Wieloletnie badania i obserwacje kliniczne dotyczące toksykologicznego i alergicznego oddziaływania jonów metali na organizm ludzki dowiodły, że infiltrujące otaczające tkanki jony aluminium i wanału mają własności cytotoksyczne. Produkty degradacji implantów w postaci jonów metali lub produktów korozji mogą oddziaływać z przestrzeni międzykomórkowej na komórki lub też wnikać do ich wnętrza, co w konsekwencji może prowadzić do rozwoju metalozy. Dlatego też, techniki modyfikacji powierzchni odgrywają bardzo dużą rolę w kształtowaniu własności fizykochemicznych i biokompatybilności stopów tytanu. Wpływ na akceptację implantu przez organizm, jak również przebieg procesu osteointegracji ma właściwe przygotowanie jego powierzchni. W celu ograniczenia przenikania jonów pierwiastków stopowych do organizmu można zastosować proces anodyzacji, w wyniku którego na powierzchni implantu wytwarza się warstwa tlenkowa, której własności fizykochemiczne uzależnione są od rodzaju elektrolitu, metody wytwarzania, czasu utleniania oraz parametrów elektrycznych procesu [3-7].

Celem pracy było wytypowanie najkorzystniejszego wariantu modyfikacji powierzchni stopu Ti-6Al-4V ELI stanowiącego skuteczną barierę dla jonów metalicznych przenikających do roztworu w oparciu o badanie elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej.

## Materiał i metodyka badań

Do badań wykorzystano próbki ze stopu Ti-6Al-4V ELI pobrane z pręta o średnicy  $d = 14$  mm. Zarówno skład chemiczny, jak i struktura stopu była zgodna z zaleceniami normy [8].

Modyfikacja powierzchni stopu obejmowała następujące zabiegi: obróbkę mechaniczną (obróbka wibracyjna □ 2, polerowanie mechaniczne □ 3, piaskowanie □ 4) oraz obróbkę elektrochemiczną (polerowanie elektrochemiczne □ 5, proces anodyzacji □ XV).

# EIS STUDY USE OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF MODIFIED Ti-6Al-4V ELI

M. KIEL\*, J. MARCINIAK, W. WALKE, J. SZEWCZENKO

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL MATERIALS,  
INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
18A KONARSKIEGO STREET, 44-100 GLIWICE, POLAND

\* E-MAIL: MARTA.KIEL@POLSL.PL

[*Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 159-163*]

## Introduction

Titanium alloys due to their good mechanical properties, low specific weight and good corrosion resistance are used in different fields of medicine [1,2]. Usefulness of metallic material for surgical implants is determined by its biocompatibility which is closely related with physicochemical properties of implant surface layer [1-7]. Ti-6Al-4V ELI alloy is the most commonly used biomaterial for implants in orthopedics and traumatology, stomatology or cardiology.

Long-term research and clinical observations of toxicological and allergic influence of ions on human body proved that infiltration aluminum and vanadium ions have cytotoxic properties. Products of implants degradation in the form of metallic ions or corrosion products could influence intercellular space or penetrate cells, what leads to metalosis. According to that surface treatment methods are very important in forming physicochemical properties and biocompatibility of titanium alloys. There is dependence between the acceptance of implant by a human body and appropriate preparation of the surface layer. The anodization process is used to restrict the infiltration process. Thin oxide layer is growing on implant's surface during this process. Properties of the layer depend of electrolyte, production method, oxidation time and electric parameters of the process [3-7].

The aim of the work was selection of the Ti-6Al-4V ELI alloy surface modification method, which allows to obtain the barrier for metallic ions infiltrating into the solution with the use electrochemical impedance spectroscopy.

## Material and method

The samples of Ti-6Al-4V ELI alloy in the form of bar  $d = 14$  mm were used in the research. Both chemical composition and structure of alloy were compatible with standard recommendation [8].

Modification of surface layer included: mechanical treatment (shot peening – 2, mechanical polishing – 3, sandblasting – 4) and electrochemical treatment (electropolishing – 5, anodization – XV). Steam sterilization was also considered in the research. The shot peening process was carried out with use of the ceramic plates and wetting medium. The mechanical polishing was performed with the use of sisal brushes and the polishing paste. Next the surface was brightened on the cloth shield with the use of polishing paste until mirror surface has been obtained.

W badaniach uwzględniono również proces sterylizacji parowej. Proces obróbki wibracyjnej realizowany był z użyciem kształtek ceramicznych oraz środka zwilżającego. Polerowanie mechaniczne przeprowadzone było na szlifierni ręcznej z wykorzystaniem szczotek szalowych i pasty polerskiej. Następnie powierzchnię wybliszczano do uzyskania powierzchni lustrzanej na tarczach płóciennych z wykorzystaniem pasty polerskiej. Powierzchnie po obróbce wibracyjnej poddano śrutowaniu ciśnieniowemu z wykorzystaniem kulek szklanych. Powierzchnie po procesie polerowania mechanicznego i obróbki wibracyjnej poddano polerowaniu elektrochemicznemu w kąpeli na bazie kwasu chromowego (E-395 POLIGRAT GmbH), przy gęstości prądu korozyjnego  $i = 10-30 \text{ A/dm}^2$ . Proces anodyzacji prowadzony był z użyciem elektrolitu na bazie kwasów fosforowego i siarkowego (Titan Color POLIGRAT GmbH). Proces anodyzacji przeprowadzono przy napięciach o wartościach: 57 V, 77 V, 87 V, 97 V. Proces sterylizacji parowej przeprowadzono w autoklawie parowym MOCOM Basic Plus w temperaturze  $134^\circ\text{C}$ , pod ciśnieniem 2,1 bar i w czasie 12 min. Zastosowanie sterylizacji jest celowe z uwagi na fakt, że każdy implant przed wszczepieniem do organizmu ludzkiego musi być poddany temu zabiegowi.

Badania chropowatości powierzchni zostały przeprowadzone z wykorzystaniem profilometru SURTRONIC 3+ firmy Taylor  $\square$  Hobson metodą liniowego mechanicznego pomiaru stykowego.

W celu uzyskania informacji o własnościach fizykochemicznych powierzchni próbek ze stopu Ti-6Al-4V ELI przeprowadzono badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Pomiar przeprowadzono z wykorzystaniem układu pomiarowego AutoLab PGSTAT 302N wyposażonego w moduł FRA2 (Frequency Response Analyser). Zastosowany układ umożliwił prowadzenie badań w zakresie częstotliwości  $10^4-10^{-3} \text{ Hz}$ . Amplituda napięcia sinusoidalnego sygnału pobudzającego wynosiła 10 mV. W badaniach wyznaczono impedancyjne widma układu i dopasowano uzyskane dane pomiarowe do układu zastępczego. Widma impedancyjne badanego układu przedstawiono w postaci wykresów Nyquista dla różnych wartości częstotliwości oraz w postaci wykresów Bode'go. Badania prowadzono w roztworze Ringera firmy B. Braun Melsungen AG w temperaturze  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6,9 \pm 0,2$ .

## Wyniki badań

W pierwszym etapie badań przeprowadzono pomiar chropowatości powierzchni stopu Ti-6Al-4V ELI poddanego różnym zabiegom modyfikacji powierzchniowej. Stwierdzono, że zastosowana w pracy obróbka mechaniczna (obróbka wibracyjna, polerowanie mechaniczne i piaskowanie) pozwoliła na uzyskanie chropowatości powierzchni na poziomie  $R_a = 0,50 \mu\text{m}$ . Przeprowadzony proces polerowania elektrochemicznego wpłynął korzystnie na gładkość powierzchni powodując obniżenie wartości parametru chropowatości ( $R_a = 0,40 \mu\text{m}$ ). Z kolei proces anodyzacji przeprowadzony przy różnych potencjałach niezależnie od poprzedzających go obróbek powierzchniowych nie miał wpływu na topografię powierzchni.

Widma impedancyjne dla stopu Ti-6Al-4V ELI po różnych zabiegach modyfikacji powierzchni przedstawiono na RYS. 1-4 oraz w TABELI 1.

Następnie na podstawie uzyskanych wykresów dopasowano modele zastępcze, które są modelami fizycznymi opisującymi zjawiska występujące w danym obiekcie. Stwierdzono, że najlepsze dopasowanie eksperymentalnych widm impedancyjnych uzyskuje się, stosując odpowiednio elektryczne obwody zastępcze przedstawione na RYS. 5.

Surface after shot peening was sandblasted in a blast cabinet with lass balls. The electropolishing process was carried out in the bath in chromic acid (E-395 POLIGRAT GmbH) with current density  $i = 10-30 \text{ A/dm}^2$ . The anodization was made in the electrolyte of phosphoric and sulphuric acid (Titan Color POLIGRAT GmbH). The anodization process was realized at different potentials: 57 V, 77 V, 87 V, 97 V. The steam autoclave MOCOM Basic Plus was used for the sterilization process in the temperature of  $134^\circ\text{C}$ , under 2.10 bar pressure, in time of 12 min. The steam sterilization process is important because each implant must be sterilized before implantation into human body.

The surface roughness measurements were performed with the SURTRONIC 3+ (Taylor  $\square$  Hobson) profiler, which uses linear mechanical contact measurement method.

In order to obtain information about physicochemical properties of the implants' surface made of Ti-6Al-4V ELI alloy, a test was carried out using the EIS method. Measurements were made using the AutoLab PGSTAT 302N measurement system equipped in the FRA2 (Frequency Response Analyser). The measurement system allowed tests within frequencies in the range of  $10^4-10^{-3} \text{ Hz}$ . The voltage level of sinusoidal excitation signal was equal to 10 mV. Impedance spectrums of the system were adjusted to equivalent systems. Impedance spectrums of the examined systems were presented in the Nyquist diagrams for different frequency values and in the Bode diagrams. Tests were realized in the Ringer' solution (B. Braun Melsungen AG), for the parameters as follows: temperature  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 6.9 \pm 0.2$ .

## Results

In the first step of investigation, roughness of surface Ti-6Al-4V ELI alloy after application of different layer modification techniques was checked. It has been found, that application of mechanical treatment proposed in the work (shot peening, mechanical polishing and sandblasting) allowed the obtainment of surface roughness equal to  $R_a = 0.50 \mu\text{m}$ . The electropolishing affected the surface smoothness and led to the reduction of roughness parameter ( $R_a = 0.40 \mu\text{m}$ ). The anodization process had no influence on surface topography.

Impedance spectra for modified surface layer of Ti-6Al-4V ELI alloy are presented in FIGs. 1-4 and in TABLE 1.

Next, based on the obtained diagrams, equivalent circuits were matched, which are physical models describing properties of given object. It was determined that the best matching of experimental impedance spectra can be obtained through application of electrical equivalent circuit presented in FIG. 5.

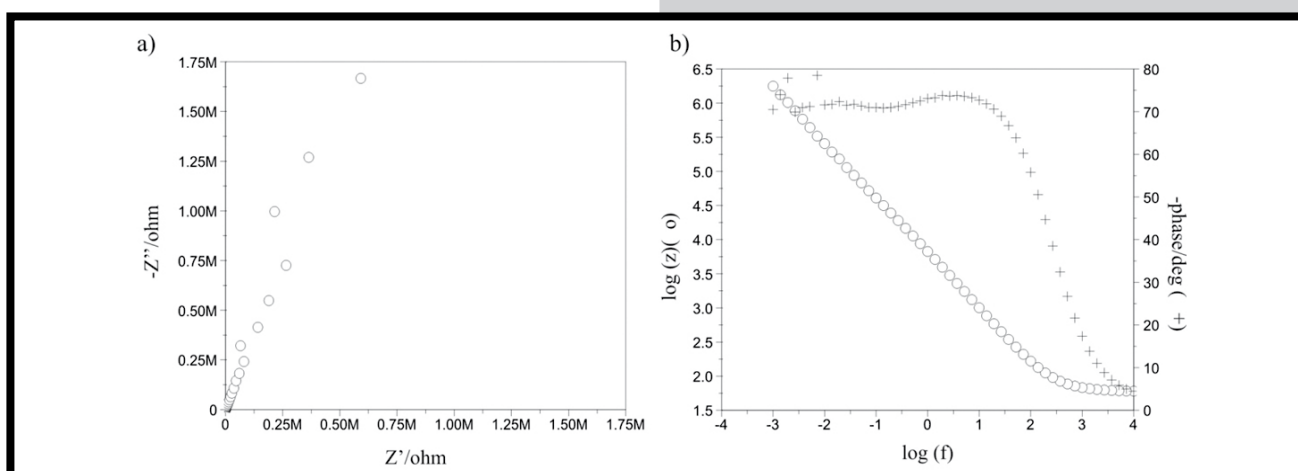
In FIG. 5:  $R_s$  – electrolyte resistance,  $CPE_{dl}$  – double layer capacity,  $R_{ct}$  – charge transfer resistance on the phase boundary (characterizes the corrosion rate),  $CPE_p$  – passive layer (oxide) capacity,  $R_p$  – passive layer resistance,  $C_p$  – passive layer capacity,  $W$  – Warburg element.

TABELA 1. Wyniki analizy EIS. / TABLE 1. Results of EIS analysis.

Ti-6Al-4V	$R_s$ , $\Omega\text{cm}^2$	$R_{ct}$ , $\text{k}\Omega\text{cm}^2$	$\text{CPE}_{dl}$		$R_p$ , $\text{k}\Omega\text{cm}^2$	$\text{CPE}_p$		$C_p$ , $\mu\text{F}$	$W$ , $\mu\Omega$
			$Y_{dl}$ , $\Omega^{-1}\text{cm}^{-2}\text{s}^{-n}$	$n_{dl}$		$Y_p$ , $\Omega^{-1}\text{cm}^{-2}\text{s}^{-n}$	$n_p$		
1/2/3/4	57	-	-	-	93300	0.3587e-4	0.81	-	-
1/2/3/4/57V	58	164	0.2823e-6	0.98	11540	0.3796e-6	0.93	-	0.43
1/2/3/4/77V	58	-	-	-	2577	0.4125e-6	0.88	-	0.45
1/2/3/4/87V	57	-	-	-	2210	0.3498e-6	0.85	-	0.65
1/2/3/4/97V	57	676	0.1865e-6	0.89	315500	-	-	0.3	-
1/2/3/4/5	57	-	-	-	10070	0.2916e-4	0.82	-	-
1/2/3/4/5/57V	59	-	-	-	1026	0.2936e-6	0.88	-	0.11
1/2/3/4/5/77V	57	-	-	-	3005	0.1522e-6	0.89	-	0.34
1/2/3/4/5/87V	58	-	-	-	2408	0.2903e-6	0.89	-	-
1/2/3/4/5/97V	59	-	-	-	102100	0.1824e-6	0.92	-	-

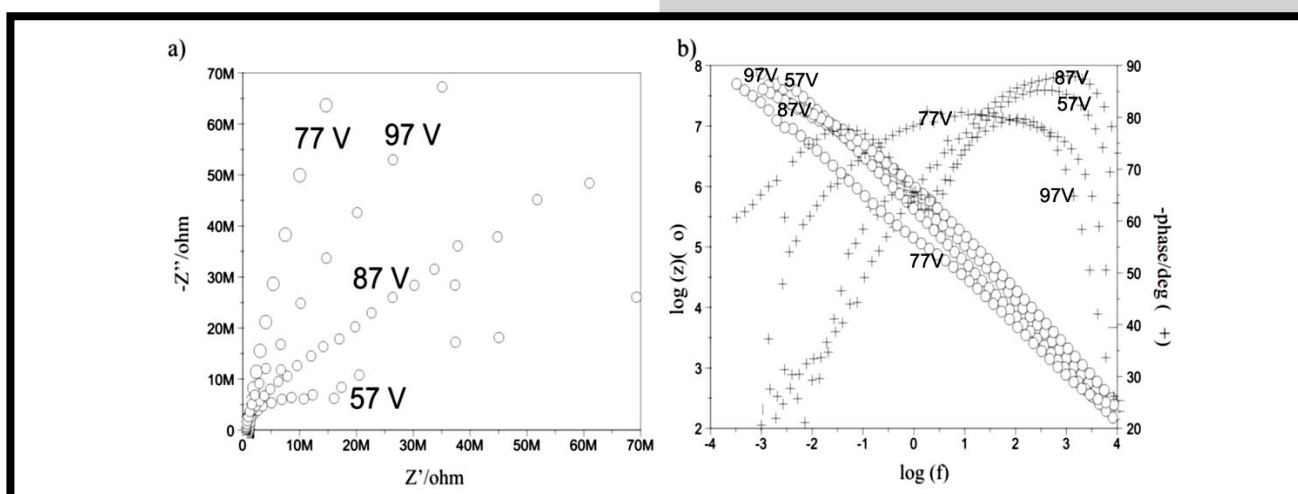
1 □ szlifowanie; 2 □ obróbka wibracyjna; 3 □ polerowanie mechaniczne; 4 □ piaskowanie; 5 □ polerowanie elektrochemiczne; XV □ anodyzacja (X reprezentuje wartość potencjału).

1 – grinding; 2 – shot peening; 3 – mechanical polishing; 4 – sandblasting; 5 – electropolishing; XV – anodization (X represents the applied potential).



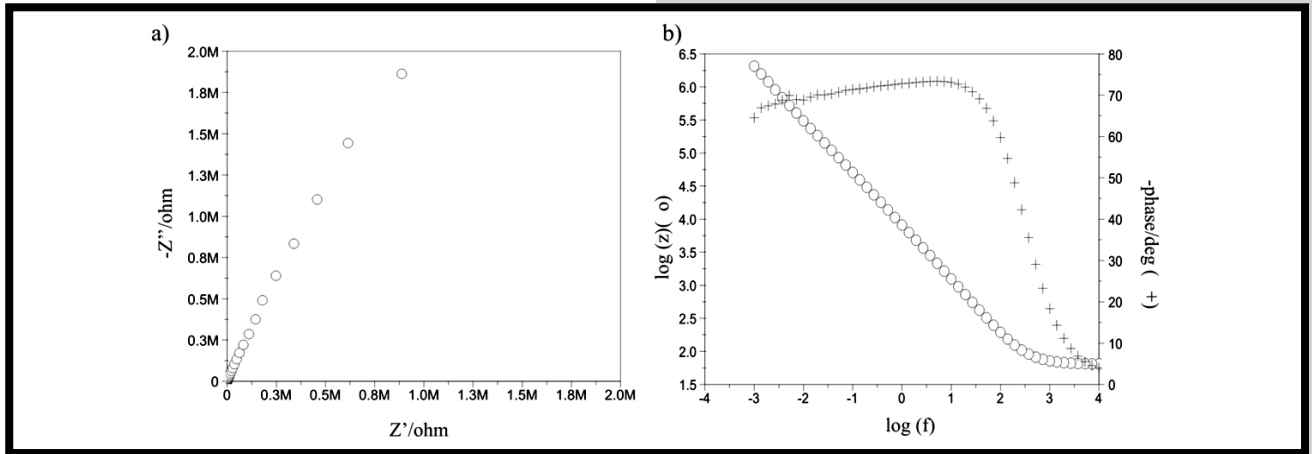
RYS. 1. Widma impedancyjne wyznaczone dla powierzchni poddanych szlifowaniu, obróbce wibracyjnej, polerowaniu mechanicznemu oraz piaskowaniu: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode'go.

FIG. 1. Impedance spectrums for surface after grinding, shot peening, mechanical polishing and sandblasting: a) Nyquist diagram, b) Bode diagram.



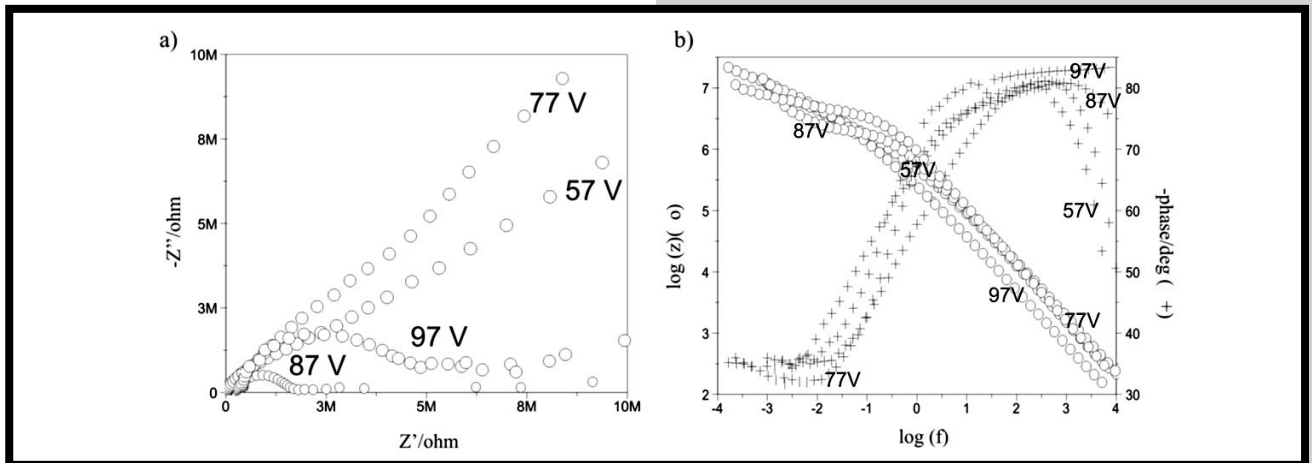
RYS. 2. Widma impedancyjne wyznaczone dla powierzchni poddanych szlifowaniu, obróbce wibracyjnej, polerowaniu mechanicznemu, piaskowaniu oraz anodyzacji przy różnych potencjałach: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode'go.

FIG. 2. Impedance spectrums for surface after grinding, shot peening, mechanical polishing, sandblasting and anodization with different potentials: a) Nyquist diagram, b) Bode diagram.



RYS. 3. Widma impedancyjne wyznaczone dla powierzchni poddanych szlifowaniu, obróbce wibracyjnej, polerowaniu mechanicznemu, piaskowaniu oraz polerowaniu elektrochemicznemu: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode'go.

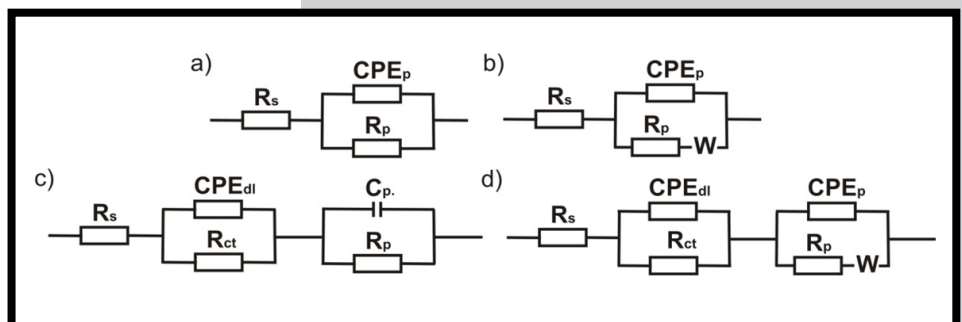
FIG. 3. Impedance spectrums for surface after grinding, shot peening, mechanical polishing, sandblasting and electropolishing: a) Nyquist diagram, b) Bode diagram.



RYS. 4. Widma impedancyjne wyznaczone dla powierzchni poddanych szlifowaniu, obróbce wibracyjnej, polerowaniu mechanicznemu, piaskowaniu, polerowaniu elektrochemicznemu oraz anodyzacji przy różnych potencjałach: a) diagram Nyquista, b) diagram Bode'go.

FIG. 4. Impedance spectrums for surface after grinding, shot peening, mechanical polishing, sandblasting, electropolishing and anodization with different potentials: a) Nyquist diagram, b) Bode diagram.

Przedstawione na RYS. 5 symbole oznaczają odpowiednio:  $R_s$  – rezystancja elektrolitu,  $CPE_{dl}$  – pojemność warstwy podwójnej,  $R_{ct}$  – opór przeniesienia ładunku na granicy faz (charakteryzuje szybkość procesu korozyjnego),  $CPE_p$  – pojemność warstwy pasywnej (tlenkowej),  $R_p$  – opór warstwy pasywnej (tlenkowej),  $C_p$  – pojemność warstwy pasywnej (tlenkowej),  $W$  – element Warburga.



RYS. 5. Elektryczne schematy zastępcze układu stop Ti-6Al-4V ELI – roztwór Ringera [9,10]: a) dla próbek 1/2/3/4, 1/2/3/4/5, 1/2/3/4/5/87V, 1/2/3/4/5/97V, b) dla próbek 1/2/3/4/5/57V, 1/2/3/4/5/77V, 1/2/3/4/77V, 1/2/3/4/87V, c) dla próbki 1/2/3/4/97V, d) dla próbki 1/2/3/4/57V.

FIG. 5. Physical models of electric equivalent circuit for the system Ti-6Al-4V ELI alloy – Ringer solution [9,10]: a) for samples 1/2/3/4, 1/2/3/4/5, 1/2/3/4/5/87V, 1/2/3/4/5/97V, b) for samples 1/2/3/4/5/57V, 1/2/3/4/5/77V, 1/2/3/4/77V, 1/2/3/4/87V, c) for sample 1/2/3/4/97V, d) for sample 1/2/3/4/57V.

## Podsumowanie

Wprowadzenie implantu do środowiska tkankowego inicjuje szereg reakcji zachodzących na granicy faz: implant – tkanka – płyn ustrojowy. Dlatego też, sposób przygotowania powierzchni odgrywa bardzo ważną rolę w kształtowaniu własności fizykochemicznych i elektrochemicznych implantów, a co za tym idzie ma wpływ na prawidłowy przebieg procesu leczenia. Dla weryfikacji przydatności stosowania poszczególnych wariantów obróbki powierzchniowej stopu Ti-6Al-4V ELI, celem poprawy jego własności fizykochemicznych przeprowadzono badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Spektroskopia impedancyjna należy do nowych, a zarazem poznawczych metod w badaniach procesów korozyjnych biomateriałów metalowych. Pozwala ona ustalić elektryczne własności biomateriałów oraz określić procesy i zjawiska występujące na granicy faz elektrolit i elektronowo przewodzący materiał. Zastosowanie metody elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej umożliwiło zatem analizę zjawisk na granicy faz stop Ti-6Al-4V ELI – warstwa powierzchniowa – roztwór Ringera, na drodze aproksymacji danych impedancyjnych, za pomocą modelu elektrycznego obwodu zastępczego.

Przeprowadzone badania elektrochemiczne próbek nie poddanych polerowaniu elektrochemicznemu jednoznacznie wykazały, że proces utleniania anodowego powinien zostać przeprowadzony przy wartości potencjału 97 V. Zaobserwowano wówczas występowanie warstwy pasywnej (tlenkowej) o charakterze pojemnościowym  $c_p = 0,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  i dużej rezystancji  $R_p = 315500 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ . Uzyskane wartości świadczą o bardzo dobrych jej własnościach ochronnych. Wykazano również, że na powierzchni warstwy pasywnej występuje warstwa podwójna, której wartość rezystancji przeniesienia ładunku wynosi  $R_{ct} = 676 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ . Warstwa ta jest wynikiem reakcji chemicznej jaka powstała wskutek oddziaływania roztworu Ringera na powierzchnię stopu Ti-6Al-4V ELI. W przypadku zastosowania polerowania elektrochemicznego jako obróbki poprzedzającej proces utleniania anodowego, przeprowadzenie anodyzacji przy potencjale 97 V wydaje się również zabiegiem najkorzystniejszym. Zastosowanie takiej wartości potencjału pozwoli wytworzyć warstwę tlenkową o stosunkowo najlepszych własnościach elektrochemicznych. Badania wykazały, że na powierzchni występuje wówczas pojedyncza warstwa pasywna o bardzo dobrych własnościach zabezpieczających i rezystancji na poziomie  $R_p = 102100 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ .

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010-2012 jako projekt badawczy o numerze N N518 405738.*

## Conclusions

Introduction of implant to tissue environment initiates different reactions on: implant – tissue – body fluid phase boundary. Thus, surface modification manner is very important in forming physicochemical and electrochemical properties of implants, hence its influence on correct treatment process. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used to verify the suitability of various surface treatment methods applied before anodization of Ti-6Al-4V ELI alloy on its physicochemical properties improvement. Impedance spectroscopy belong to new and cognitive method in research of metallic biomaterials corrosion process. It allows to determine biomaterial properties, as well as processes and phenomenon present on the phase boundary of electrolyte and electron conductive material. Application of EIS allows the analysis phenomenon which occurs on the phase boundary of Ti-6Al-4V ELI alloy – surface layer – Ringer solution, through the impedance data approximation with the use of an electric equivalent circuit.

Electrochemical research for samples without electrochemical polishing revealed that anodization process should be carried out with potential of 97 V. In such case passive layer with capacitive character  $c_p = 0.3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  and big resistance  $R_p = 315500 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  was observed. Obtained values confirmed good protective properties of this layer. It was also indicated the existence of double layer on the surface of passive layer. The resistance of charge transfer for double layer was as high as  $R_{ct} = 676 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ . The double layer is effect of chemical reaction being the result of Ringer solution influence on the Ti-6Al-4V ELI alloy surface. In the case where electrochemical polishing was used before anodic oxidation, the anodization with 97 V potential was also most beneficial. Application of 97 V potential allowed forming of passive layer with relatively best electrochemical properties. On that surface a single passive layer with very good protective properties and resistance on the level  $R_p = 102100 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  is present.

## Acknowledgements

*The work was supported by scientific funds in 2010-2012 in the form of research grant N N518 405738.*

## Piśmiennictwo

- [1] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2002.
- [2] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2004.
- [3] Trzaska M., Trzaska Z.: Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna w inżynierii materiałowej. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2010.
- [4] Tamilselvi S., Raman V., Rajendran N.: Evaluation of corrosion behavior of surface modified Ti-6Al-4V ELI alloy in hanks solution. Journal of Applied Electrochemistry, Vol. 40, No 2, pp. 285-293.
- [5] Garbacz H., Ossowski M., Wieciński P., Wierzchoń T., Kurzydowski K. J.: Mikrostruktura i właściwości warstw międzymetalicznych na stopie Ti-6Al-4V. Problemy Eksploatacji 1/2007, s. 45-55.

## References

- [6] Paszenda Z., Walke W., Jadacka S.: Electrochemical investigations of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys used on implants in bone surgery. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering, Vol. 38, I 1, 2010, pp. 24-32.
- [7] Baron A., Simka W., Chrzanoski W.: EIS tests of electrochemical behavior of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloy. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering, Vol. 21, I 1, 2007, pp. 23-26.
- [8] ISO 5832/3:2007: Implants for surgery – metallic materials – Part 3: Wrought Titanium 6Aluminum 4Vanadium alloy.
- [9] Łosiewicz B., Budniok A.: Use of electrochemical impedance spectroscopy technique to investigate the passivation of intermetallic Fe24Al alloy in sulphuric acid. Corrosion of Protection 11s, 2003, pp. 49-54.
- [10] A. K. Shukla, R. Balasubramaniam: Effect of surface treatment on electrochemical behavior of CP Ti, Ti-6Al-4V and Ti-13Nb-13Zr alloys in simulated human body fluid, Corrosion Science 48, 2006, pp. 1696-1720.

# WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE I PRZEBIEG DEGRADACJI KOMPOZYTÓW PLA/WŁÓKNA ALGINIANOWE

MAGDALENA BARTKOWIAK-JOWSA<sup>1,2\*</sup>, ANNA KWIATKOWSKA<sup>1</sup>, BARBARA SZARANIEC<sup>3</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>3</sup>, ROMUALD BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>, WOJCIECH WITKIEWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY, ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MECHANIKI EKSPERYMENTALNEJ, INSTYTUT KONSTRUKCJI I EKSPLOATACJI MASZYN, UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

<sup>2</sup> WOJEWÓDZKI SZPITAL SPECJALISTYCZNY WE WROCŁAWIU, OŚRODEK BADAWCZO-ROZWOJOWY, UL. H.M KAMIENSKIEGO 73A, 51-124 WROCŁAW

<sup>3</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

\* E-MAIL: MAGDALENA.BARTKOWIAK@PWR.WROC.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 164-166]

## Wstęp

Udowodnione bezpieczeństwo stosowania alginianów [1] sprawia, że wykonane z nich włókna mogą być rozważane jako faza wzmacniająca w kompozytach mogących znaleźć zastosowanie w implantach medycznych [2]. Dodatek włókien wpływa nie tylko na wyjściowe właściwości mechaniczne kompozytu, ale przede wszystkim na czas jego degradacji. Wynika z tego, że włókna alginianowe mogą zostać wykorzystane jako element pozwalający na opracowanie materiału o założonych właściwościach mechanicznych oraz kontrolowanym czasie resorpcji. Celem pracy była ocena wpływu różnej zawartości włókien na czas i dynamikę degradacji kompozytów na bazie polilaktidu z dodatkiem włókien alginianu wapnia oraz sodu, z punktu widzenia zastosowania na implanty naczyniowe [3].

## Materiały i metody

Badaniom poddano poli(L-laktid) (PLLA, Ingeo™ 3051D, NatureWorks® LLC), zmodyfikowany włóknami alginianu wapnia (CaAlg) oraz alginianu sodu (NaAlg) wytworzonymi metodą moką z roztworu w Katedrze Włókien Sztucznych na Wydziale Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej. Przygotowano kompozyty w formie prepegów o różnej zawartości jednokierunkowo (1D) ułożonych włókien: PLA/95%NaAlg, PLA/75%NaAlg, PLA/95%CaAlg, PLA/75%CaAlg, PLA/65%CaAlg. Próbkę poddano inkubacji w wodzie destylowanej oraz płynie Ringera o temperaturze  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Degradację monitorowano poprzez oznaczanie zmian pH płynu oraz zmian masy próbek nie poddanych suszeniu oraz właściwości mechanicznych próbek w teście jednoosiowego rozciągania.

## Wyniki

Już w ciągu 1 godziny od rozpoczęcia inkubacji, właściwości kompozytu PLA/95% CaAlg takie jak moduł sprężystości E (RYS. 1a), odkształcalność  $\epsilon$  (RYS. 1b) czy wytrzymałość  $\sigma$  obniżają się o niemal 90%. W przypadku PLA/65%CaAlg spadek wartości tych parametrów wynosi jedynie ok. 30%.

# MECHANICAL PROPERTIES AND DEGRADATION BEHAVIOUR OF PLA/ALGINATE FIBER COMPOSITES

MAGDALENA BARTKOWIAK-JOWSA<sup>1,2\*</sup>, ANNA KWIATKOWSKA<sup>1</sup>, BARBARA SZARANIEC<sup>3</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>3</sup>, ROMUALD BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>, WOJCIECH WITKIEWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, MECHANICAL DEPARTMENT, DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND EXPERIMENTAL MECHANICS, INSTITUTE OF MACHINE DESIGN AND OPERATION, UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLAND

<sup>2</sup> REGIONAL SPECIALIST HOSPITAL IN WROCŁAW, RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTRE, UL. H.M KAMIENSKIEGO 73A, 51-124 WROCŁAW, POLAND

<sup>3</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

\* E-MAIL: MAGDALENA.BARTKOWIAK@PWR.WROC.PL

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 164-166]

## Introduction

Alginates are widely used as materials for dressings, tissue anastomosis, scaffolds [1] and drug delivery vehicles [1]. Due to its safety, alginate fibers can also be used to create composites, suitable for medical implants [2]. The addition of fibers influences not only composite mechanical properties, but also its degradation time. Therefore, alginate fibers are interesting candidates for creating materials with assumed mechanical properties and controlled resorption time. The aim of the study was to investigate time course of degradation of composites with different sodium and calcium alginate fibers content, from the standpoint of creating vascular implant [3].

## Materials and methods

Tests were conducted on poly(L-lactide) (PLLA, Ingeo™ 3051D, NatureWorks® LLC), modified with calcium alginate (CaAlg) and sodium alginate (NaAlg) fibers produced with wet-spinning in Department of Man-Made Fibres at Faculty of Textile Engineering and Marketing Composites of Lodz Technical University. Pre-pregs with various uniaxially oriented fibers additions were prepared: PLA/95%NaAlg, PLA/75%NaAlg, PLA/95%CaAlg, PLA/75%CaAlg, PLA/65%CaAlg. Samples were immersed in distilled water and Ringer solution at the temperature of  $37^\circ\text{C}$ . Degradation was investigated by measuring changes of pH, sample mass (not dried) and mechanical properties in uniaxial tensile test.

## Results

After 1 hour of incubation, mechanical properties of PLA/95%CaAlg composite such as Young modulus E (FIG. 1a), deformability  $\epsilon$  (FIG. 1b) and tensile strength  $\sigma$  decreased by 90%. In the case of PLA/65%CaAlg composite, these properties decreased by about 30%.



W kolejnych dniach degradacji badane parametry kompozytów o 75% i 95% zawartości włókien ulegają obniżeniu o ok. 95%, następuje fragmentacja próbek. Dla kompozytu z dodatkiem 65% CaAlg po 3 miesiącach inkubacji wartość wytrzymałości jest o 74% niższa niż początkowa, modułu Younga o 27% (RYS. 1a) a odkształcalności o ponad 95% (RYS. 1b).

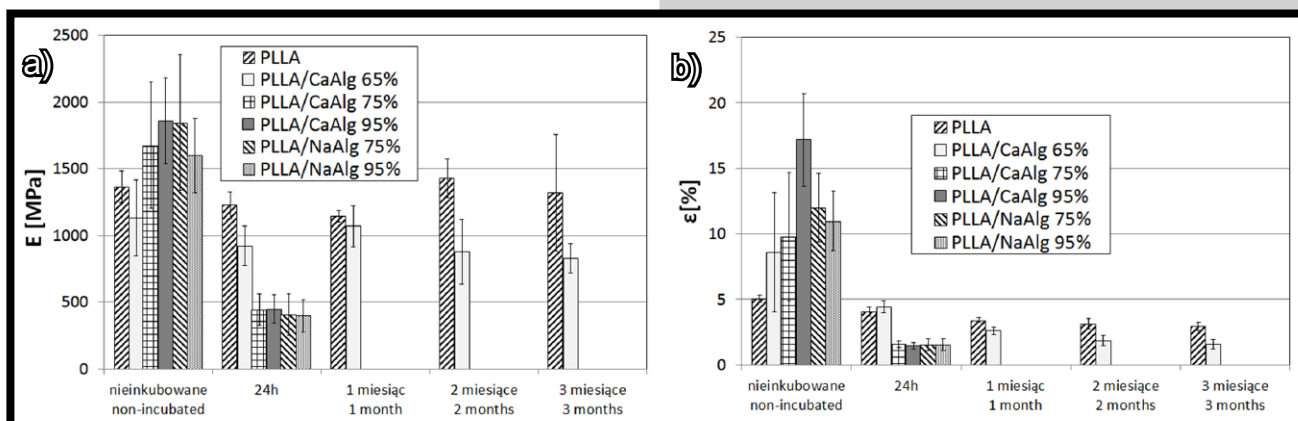
W pierwszych czterech tygodniach inkubacji w wodzie, pH dla kompozytów z 95% i 75% dodatkiem NaAlg oraz 95% dodatkiem CaAlg zmienia się w zakresie 6,5÷8 (RYS. 2a). W przypadku inkubacji w płynie Ringera wartości te wahają się w granicach 6,2÷7,5 (RYS. 2b). Zmiany pH w pierwszym etapie można powiązać z degradacją soli alginianowych, zwłaszcza w przypadku kompozytów z włóknami z algianu sodu, a w kolejnym etapie ze stopniową degradacją osnowy polilaktydowej. Podobne tendencje obserwuje się niezależnie od zastosowanego medium immersyjnego. Po szesnastu tygodniach inkubacji dla wszystkich kompozytów, pH zarówno wody jak i płynu Ringera jest obojętne (utrzymuje się w granicach 6,5-7,5), co jest korzystne z punktu widzenia odpowiadzi tkankowej.

W obu mediach immersyjnych największy wzrost masy odnotowano dla kompozytu PLA/75%CaAlg, który po 21 dniach inkubacji wyniósł 90% (RYS. 3a,b). Wzrost masy zaobserwowano także dla próbek PLLA/65%CaAlg oraz PLLA/75%NaAlg, który w wodzie destylowanej w pierwszych tygodniach wyniósł 15-17% (RYS. 3a), zaś w płynie Ringera dla PLLA/65%CaAlg aż 44% (RYS. 3b). W miarę postępu degradacji masa próbek stopniowo maleje zarówno w przypadku jednego jak i drugiego medium immersyjnego.

In the next days, mechanical properties of composites with 75% and 95% addition of alginate fibers decreased by over 95%, samples gradually disintegrated. After 3 months of degradation, tensile strength of PLA/65%CaAlg was for 74%, Young modulus for 27% and deformability for over 95% lower than before incubation (FIG. 1b).

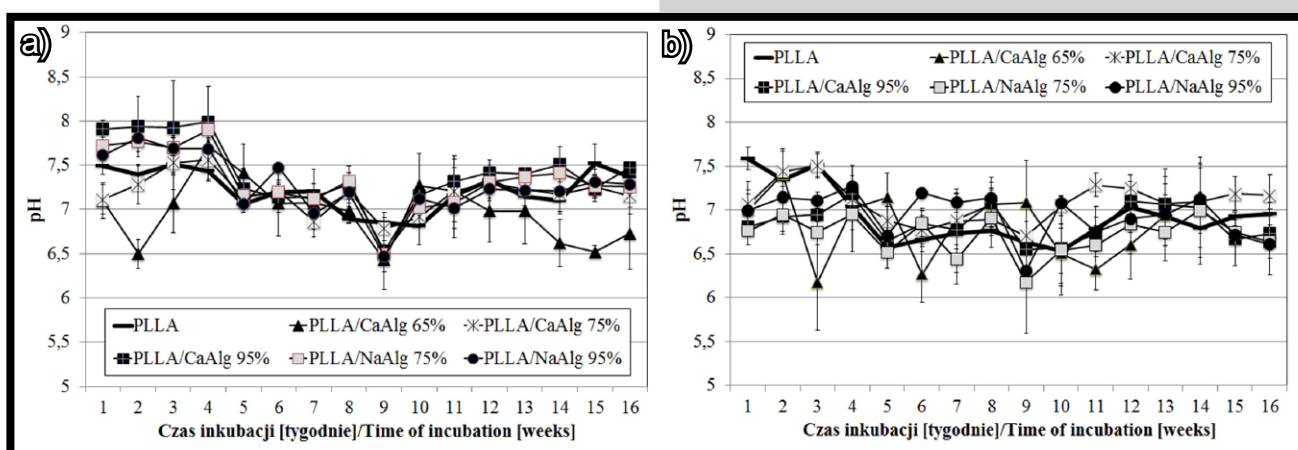
In the first 4 weeks, pH of composites with 95% and 75% content of NaAlg and with 95% content of CaAlg changed in range between 6.5 and 8 (FIG. 2a). In the case of incubation in Ringer solution, changes in pH ranged between 6.2 and 7.5 (FIG. 2b). Initial pH fluctuations were caused by degradation of alginate salts (especially in the case of composites with NaAlg fibers) whilst in the next stage with PLLA degradation. Similar pH changes were observed for both immersion media. After 16 weeks of incubation, pH of water and Ringer solution for all types of composites was neutral (in range 6.5-7.5), what is favorable in the case of tissue response.

During degradation in distilled water as well as in Ringer solution, the highest change in sample mass was noted for PLA/75%CaAlg (by 90% after 21 days of incubation) (FIG. 3a,b). Increase of sample mass was also observed for PLLA/65%CaAlg and PLLA/75%NaAlg composites, in distilled water sample mass increased by 15-17% in the first weeks. For PLLA/65%CaAlg samples incubated in Ringer solution mass increased by 44% after 7 days. Afterwards, for both environments mass of samples decreased gradually.



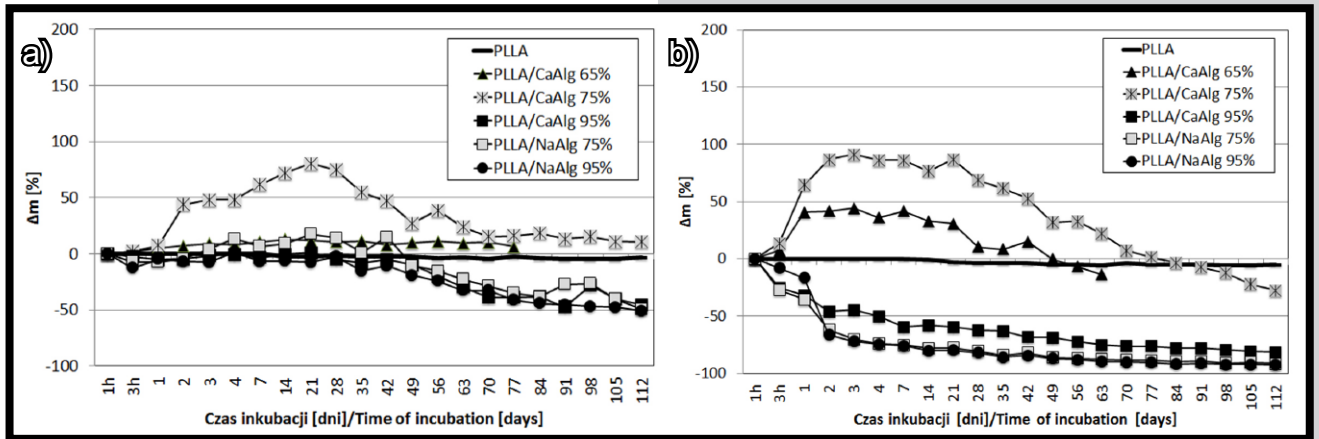
RYS. 1. Zmiany właściwości mechanicznych kompozytów inkubowanych w wodzie destylowanej podczas degradacji a) moduł Younga, b) odkształcalność.

FIG. 1. Changes in mechanical properties of composites incubated in distilled water a) Young modulus, b) deformability.



RYS. 2. Zmiany pH płynu inkubacyjnego a) woda destylowana, b) płyn Ringera.

FIG. 2. Changes of pH after incubation in a) distilled water, b) Ringer solution.



**RYS. 3.** Zmiany masy próbek inkubowanych w a) wodzie destylowanej, b) płynie Ringera.  
**FIG. 3.** Changes of mass after incubation in a) distilled water, b) Ringer solution.

Dla próbek z 95% NaAlg i CaAlg obserwuje się stopniowy ubytek masy który po 105 dniu inkubacji w wodzie destylowanej wynosi do 50%, zaś w płynie Ringera nawet 95% (RYS. 3a,b). Wzrost masy kompozytów z 65% i 75% zawartością włókien związany jest z większym udziałem PLLA w kompozycie, który absorbuje płyn. W przypadku kompozytów o większej zawartości włókien masa stopniowo maleje, co jest związane z mniejszym udziałem PLLA oraz żelowaniem włókien alginianowych i ich rozpuszczaniem.

## Podsumowanie i wnioski

Zastosowanie dodatków modyfikujących w postaci włókien CaAlg oraz NaAlg skutkuje poprawą właściwości kompozytu takich jak odkształcalność czy moduł Younga. Przeprowadzone badania wykazują wpływ zawartości włókien na tempo i przebieg degradacji. Tempo degradacji zależy również od składu chemicznego środowiska inkubacyjnego, przy czym można zauważyć analogie w przebiegu zmian pH oraz masy próbek inkubowanych w wodzie destylowanej oraz płynie Ringera. Dodatek włókien pozwala na kilkukrotne skrócenie czasu degradacji, który jest tym krótszy, im większy udział włókien w kompozycie. Ponadto wyższa zawartość włókien w kompozycie skutkuje szybszą utratą masy próbek oraz intensywnymi procesami żelowania, których skutki w układzie krwionośnym nie zostały dotąd zbadane. Dla kompozytów o 65% i 75% zawartości włókien CaAlg obserwuje się mniej intensywne żelowanie oraz najmniejsze zmiany pH płynu immersyjnego w początkowym okresie inkubacji. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że kompozyt PLLA/65%CaAlg, którego czas degradacji jest najbardziej zbliżony do czasu regeneracji tkanki naczyniowej (ok. 6 miesięcy), oraz dla którego nie obserwuje się gwałtownych spadków pH, które mogą sprzyjać powstaniu procesu zapalnego, charakteryzuje się najkorzystniejszymi właściwościami z punktu widzenia zastosowania na stent naczyniowy. Włókna CaAlg oraz NaAlg dają zatem praktyczną możliwość projektowania składu i budowy kompozytu pod kątem otrzymania materiału o właściwościach mechanicznych oraz czasie resorpcji adekwatnych do zastosowania w układzie naczyniowym.

## Podziękowania

Publikacja jest częścią projektu „Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013.

For composites with 75% and 95% NaAlg slight mass loss was observed (by 50% after 105 day of incubation in distilled water and by 95% after 105 days of incubation in Ringer solution) (FIG. 3a,b). Mass increase observed for composites with 65% and 75% fiber content is connected with higher amount of PLLA which absorbs incubation fluid. In the case of higher fiber content composites, mass decrease is related to gelation and dissolving of fibers.

## Conclusion

Addition of sodium and calcium alginate fibers allows to improve properties of composites, such as deformability or Young modulus. Presented investigation revealed, that addition of alginate fibers influences time-course of material degradation. Degradation time depends also on the environment, nevertheless there is analogy between changes of pH and mass loss of samples incubated in distilled water and Ringer solution. Addition of fibers cause decrease in degradation time, which is shorter for composites with higher amount of fibers. Moreover, higher amount of fibers results in rapid mass loss and intensive gelation processes, which impact on vascular system is still unknown. For composites with 65% and 75% addition of CaAlg fibers reduced gelation and slight pH changes are observed. PLLA/65%CaAlg composite is characterized by degradation time closest to the time of tissue regeneration (6 months), and do not cause rapid pH decrease that can induce inflammation process. Therefore, this composite has favorable properties in terms of designing biodegradable vascular implant. It can be concluded, that alginate fibers gives possibility to design material with mechanical properties and time of degradation adequate to be used in vascular system.

## Acknowledgements

This publication is part of project „Wrovasc – Integrated Cardiovascular Centre”, co-financed by the European Regional Development Fund, within Innovative Economy Operational Program, 2007-2013.

## Piśmiennictwo

- [1] Tønnesen HH, Karlsen J., Alginate in drug delivery systems, *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28(6):621-30.
- [2] Chłopek J., Szaraniec B., Michalska M., Bioaktywne kompozyty gradientowe, *Inżynieria Biomateriałów*, 2006, 58-60, 94-97.
- [3] Bartkowiak-Jowska M., Będziński R., Chłopek J., Filipiak J., Szaraniec B.: Comparative analysis of the deformation characteristics of biodegradable polymers considered as a material for vascular stents, *Polimery*, 53,6 (2011), 50-57.

## References





.....

**STUDIA PODYPLOMOWE**  
**Biomateriały – Materiały dla Medycyny**  
**2011/2012**

<b>Organizator:</b> Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	<b>Adres:</b> 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 108 lub 107 tel. 12 617 44 48, 12 617 34 41; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; stodolak@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl <a href="http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny.html">http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny.html</a>
<b>Charakterystyka:</b> Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów, a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
<b>Sylwetka absolwenta:</b> Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia), a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.	
<b>Zasady naboru:</b> Termin zgłoszeń: od 20.09.2011 do 20.10.2011 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 108, 107 lub 501 Osoby przyjmujące zgłoszenia: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Dr inż. Ewa Stodolak (tel. 12 617 34 41, e-mail: stodolak@agh.edu.pl) Mgr inż. Małgorzata Krok (tel. 12 617 44 48, e-mail: krok@agh.edu.pl)	
<b>Czas trwania:</b> 2 semestry (od XI 2011 r. do VI 2012 r.)	<b>Opłaty:</b> 2 600 zł
<b>Informacje dodatkowe:</b> Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160. Przewidywana data rozpoczęcia: 26.11. 2011.	

.....

# EWALUACJA PROCEDURY ALGINANOWO-CHITOSANOWO- ALGINANOWEJ ENKAPSULACJI CHONDROCYTÓW

IGA WASIAK\*, TOMASZ CIACH

LABORATORIUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,  
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROCESOWEJ

\* E-MAIL: I.WASIAK@ICHIP.PW.EDU.PL

## Streszczenie

*Celem niniejszej pracy była ewaluacja mikroenkapsulek otrzymanych z warstw alginianowo-chitozanowo-alginianowej (ACA) jako matrycy do unieruchamiania chondrocytów. Przygotowanie ACA mikroenkapsulek obejmuje przygotowanie kapsulek z alginianu wapnia, adsorpcji dodatnio naładowanego chitozanu na ich powierzchni, tworząc w ten sposób alginianowo-chitozanową membranę, i ostatecznie wytworzenie wierzchniej alginianowej warstwy. Zbadano własności otrzymanych mikroenkapsulek, między innymi ich właściwości mechaniczne, porowatość i szybkość dyfuzji substancji małącząsteczkowej. Kapsułki alginianowe otrzymano za pomocą elektrostatycznej metody generowania kropli. Technika ta wykorzystuje wytłaczanie roztworu alginianu w połączeniu z siłami elektrostatycznymi, które zakłócają powierzchnię cieczy na końcu kapilary / igły, tworząc strumień małych kropelek. Prowadzi to do produkcji jednolitych kulek o małej średnicy.*

**Słowa kluczowe:** mikroenkapsulacja, alginian, chitozan, chondrocyty

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 167-171]

## Wprowadzenie

Mikroenkapsulacja komórek jest ważnym obszarem w inżynierii tkankowej i nowoczesnych naukach medycznych. Mikroenkapsułki otrzymywane są w celu utrzymania pojedynczych komórek wewnątrz wytworzonego mikrośrodowiska, jednocześnie pozwalając na swobodną dyfuzję składników odżywczych do ich wnętrza i metabolitów komórkowych na zewnątrz. Biokompatybilność mikroenkapsulek i ich komponentów jest czynnikiem decydującym o skuteczności tej technologii. Komórki allogeniczne i ksenogeniczne unieruchomione wewnątrz półprzepuszczalnej membrany są chronione i immunoizolowane od otoczenia. Zapobiega to bezpośredniemu kontaktowi komórek z komórkami układu odpornościowego, cytokinami i immunoglobulinami podczas i zaraz po przeszczepie. Mikroenkapsułkowanie chroni również unieruchomione komórki przed uszkodzeniami podczas transportu.

Alginian jest naturalnie występującym biopolimerem, który znalazł liczne zastosowania jako surowiec do unieruchomienia różnego typu komórek. Polimery alginianowe to rodzina liniowych rozgałęzionych polisacharydów, które zawierają różne ilości reszt kwasu 1,4'-β-D-mannuronowego i α-L-guluronowego. Poszczególne polimery mogą się znacznie różnić w składem reszt kwasów i ich sekwencją, oraz blokowym ułożeniem wzdłuż łańcucha polimeru. Po usieciowaniu kationami dwuwartościowymi, takimi jak Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> lub Br<sup>2+</sup>, alginian tworzy biodegradowalny żel.

# EVALUATION OF ALGINATE- CHITOSAN-ALGINATE CHONDROCYTES ENCAPSULATION PROCEDURE

IGA WASIAK\*, TOMASZ CIACH

BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY,  
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING

\* E-MAIL: I.WASIAK@ICHIP.PW.EDU.PL

## Abstract

*The objective of this paper was to verify microcapsules obtained from alginate-chitosan-alginate (ACA) system as a matrix for chondrocytes immobilization. Preparation of ACA microencapsules includes formation of the calcium alginate beads, adsorption of a positively charged chitosane on their surface, to form alginate – chitosane membrane, and finally coating with alginate. Properties of obtained microcapsules, their mechanical properties, porosity and diffusion rate were investigated. Electrostatic droplet generation method was employed for microbeads production. This technique employs extrusion combined with electrostatic forces to disrupt a liquid surface at the capillary/needle tip, forming a charged stream of small droplets. This leads to the production of uniform small-diameter beads.*

**Keywords:** microencapsulation, alginate, chitosan, chondrocytes

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 167-171]

## Introduction

Cell microencapsulation is an important area in tissue engineering and modern medical sciences. Microencapsules are made to keep single cells in their microenvironment allowing nutrients to diffuse into it and metabolites to diffuse out. The biocompatibility of microencapsules and their biomaterials components is a most important factor for efficacy of this technology. Allogenic or xenogenic cells entrapped within a semi-permeable membrane are protected and immuno-isolated from its surroundings. This prevents the direct contact of the cells with immune cells, cytokines, immunoglobulin when directly used in transplantation. Microencapsulation also protects immobilized cells from damage during handling.

Alginate is a naturally occurring biopolymer which found numerous applications as a raw material for immobilization of various cells type. Alginate polymers are a family of linear unbranched polysaccharides which contain varying amounts of 1,4'-linked β-D-mannuronic acid and α-L-guluronic acid residues. The residues may vary widely in composition and sequence and are arranged in a pattern of blocks along the chain. It forms a biodegradable gel when it is crosslinked with divalent cations such as Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> or Br<sup>2+</sup>. Unique properties lead to the application of alginate as a matrix for cells entrapment, which are: room temperature encapsulation process, high and controlled gel porosity, aqueous environment within the matrix, dissolution and biodegradation under body conditions. Important application alginate found in cartilage repair systems, due to its similarity to hyaluronic acid and ability to decrease chondrocytes redifferentiation [1-3].

Pokojowa temperatura procesu enkapsulacji, wysoka i kontrolowana porowatość żelu, wodne środowisko matrycy, rozpuszczanie i biodegradacja w warunkach organizmu ludzkiego to unikalne właściwości pozwalające na zastosowanie alginianu jako matrycy do unieruchamiania komórek. Istotnymi zaletami alginianu, pozwalającymi na jego aplikację w systemach regeneracji chrząstki, jest jego podobieństwo do kwasu hialuronowego i zdolności do zmniejszenia redyferencjacji chondrocytów [1-3].

Chitozan jest polisacharydem powstałym z powtarzających się jednostek b-(1-4) 2-amino-2-deoksy-D-glukozy (D-glukozaminy). Otrzymuje się go w wyniku całkowitej lub częściowej deacetylacji chityny. Jest biokompatybilnym, biodegradowalnym i nietoksycznym polimerem, który rozpuszcza się w wodzie o pH poniżej 6.5, takie środowisko pozwala na częściowe protonowanie grup aminowych. Chitozan rozkłada się w organizmie człowieka pod wpływem lizozymu. Stosunek reszt N-acetylo-D-glukozaminy i d-glukozaminy zwartych w polimerze ma ogromny wpływ na szybkość jego biodegradacji. Te właściwości sprawiają, że polimer ten znalazł wiele aplikacji od biomedycyny do rolnictwa [4].

Mikroenkapsułki powstałe z systemu ACA były już wcześniej badane jako alternatywne membrany do enkapsulacji, jednak szczegóły dotyczące jej wykonania enkapsulacji komórki nie zostały dokładnie opisane. W prezentowane badania analizowano możliwość zastosowania i właściwości mikroenkapsulek systemu ACA jako alternatywnej membrany do enkapsulacji chondrocytów i nowego kierunku enkapsulacji komórek.

## Metody

W prezentowanych badaniach otrzymano trzy rodzaje alginianowych mikroenkapsulek: mikroenkapsułki, mikrowłókna i cienkie folie. Odważoną ilość alginianu sodu i 0,9 g NaCl rozpuszczono w 80 ml wody destylowanej, a następnie roztwór wysterylizowano w autoklawie. Do tak otrzymanego alginianu dodano 20 ml zawiesiny komórek, otrzymano w ten sposób rozważane stężenie alginianu. Roztwór alginianu wraz z komórkami umieszczono w strzykawce i wykorzystano do formowania mikroenkapsulek według następujących procedur. Mikroenkapsułki otrzymano przy użyciu pompy strzykawkowej i elektrostatycznego generatora kropelek. Alginian wytłaczano przez igły ze stali nierdzewnej o grubości 25, 27 i 30. Kiedy roztwór polimeru zostaje wytłoczony z końca igły przez pompę strzykawkową (25 ml/h), w wyniku działania sił grawitacyjnych i elektrostatycznych są formowane krople regularnym kształcie. Koniec igły umieszczono cztery centymetry nad 0,1 M roztworem żelującym  $\text{CaCl}_2$ . Zbadano roztwór polimeru o stężeniu 1,2, 1,5 i 1,8% alginianu sodu. Różnicę wytworzonego w elektrostatycznym generatorze kropelek potencjału kontrolowano za pomocą generatora wysokiego napięcia w zakresie od 0 do 30 kV. Mikrowłókna otrzymywano poprzez wytłaczanie roztworu alginianu przez igłę bezpośrednio do kąpieli żelującej. Średnica powstałego włókna w dużym stopniu zależy od prędkości wytłaczania i średnicy zastosowanej igły. Casting Blade (Elcometer) wykorzystano do wytworzenia alginianowych filmów. Metoda ta pozwala na rozprządzenie roztworu alginianu cienką warstwą na gładkiej powierzchni. Otrzymane filmy, mikroenkapsułki i mikrowłókna zanurzone w roztworze zawierającym jony wapnia w celu żelowania.

Po 30 min żelowania w roztworze wapnia otrzymano mikroenkapsułki, mikrowłókna i filmy. W następnym etapie badania rodzaje alginianowych mikroenkapsulek zanurzano w roztworze chitozanu w celu wytworzenia drugiej warstwy, po 30 min płukano je w 0,9% (w/v) roztworu NaCl, aby usunąć nadmiar chitozanu. Następnie dodano roztwór 0,12%,

Chitosan is a polysaccharide formed primarily of repeating units of b-(1-4)2-amino-2-deoxy-D-glucose (D-glucosamine). Chitosan is obtained by complete or partial deacetylation of chitin. Chitosan is biocompatible, biodegradable, non-toxic polymer, which dissolves in water only if pH is lowered then 6.5, when a substantial fraction of the amino groups are protonated. It degrades under the influence of lysozyme in human body and the ratio of N-acetyl-D-glucosamine residues to d-glucosamine has a great impact on the biodegradation rate of this polymer. This property makes it an important polymer with range application from biomedical to agricultural domains [4].

ACA microencapsules have been previously studied as an alternate microcapsule membrane; however details regarding its use in cell encapsulation have not been reported. The current research investigates the potential and properties of ACA microcapsules as an alternative membrane for encapsulating chondrocytes and a new direction for cell encapsulation technology.

## Methods

Three forms of alginate microencapsules were obtained: microbeads, microfibers and thin film. Weighed amount of sodium alginate and 0.9 g NaCl were dissolved in 80 ml of distilled water and sterilized in an autoclave. 20 ml of chondrocytes suspension was added to obtained desired alginate concentration. Alginate with cells was placed in a syringe and used to form microcapsules by the following procedure. Spherical droplets were formed using a syringe pump and electrostatic droplet generator which extruded the alginate through a 25, 27 and 30 gauge stainless steel needles. As the polymer solution was forced out of the end of the needle by the syringe pump (25 ml/h) the droplets were pulled off by the action of gravitational and electrostatic forces. The needle tip was placed four centimeters above the 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  gelling solution. Polymer solution contained 1.2, 1.5 and 1.8% of sodium alginate. The potential difference was controlled with a regulated high voltage power supply from 0 to 30 kV. Microfibers have been obtained by the extrusion of the alginate solution through the needle directly to the gelling bath. Fibers diameter strongly depend on the speed of extruded and the needle diameter. Casting Blade (Elcometer Film Applicator) was used to produce films by knife casting technique. This method allows distributing the thin layer of the alginate solution on a smooth surface. The applicator can be set to the required gap. The film is produced by pushing the applicator across the surface. After casting, film and produced microcapsules and microfibers were immersed in the hardening solution containing calcium ions.

After being hardened for 30 min in calcium solution, beads, fibers and films were obtained. In the next step mentioned forms of encapsulation systems were treated with the chitosan solution to form a next membrane layer, which was followed after 5 min by rinsing with 0.9% (w/v) NaCl solution to remove the excess chitosan. Then, 0.12%, 0.15% and 0.18% (accordingly to initial concentration) alginate solution was added to counteract charges on the membranes.

A sample of 20 microbeads was taken from each experiment and diameters of individual microbeads were measured using a microscope. Scanning electronic microscopy was used to study the structure of ACA microbeads. Microscopic observation was made after freeze-drying and gold sputtering (Phenom Fei). Diffusion properties were tested by investigating the permeability of methylene blue. Due to its properties methylene blue can simulate the behavior of small-molecules. Quantity of released substances was determined by spectrophotometer method (Helios Thermo Science), with every

0,15% i 0,18% (odpowiednio do stężenia początkowego alginianu) w celu neutralizacji ładunków na powierzchni membrany.

Średnice powstałych mikroenkapsulek zmierzono za pomocą mikroskopu dla próbki 20 mikroenkapsulek pobranych z każdego doświadczenia. Do badania struktury mikroenkapsulek systemu ACA wykorzystano elektronowy mikroskop skaningowy (Phenom Fei). Obserwacje przeprowadzono po liofilizacji i napyleniu złotem. Własności dyfuzyjne testowano poprzez badanie migracji błękitu metylenowego. Ze względu na swoje właściwości błękit metylenowy może symulować zachowanie związków małowcząsteczkowych. Ilość uwolnionej substancji ustalono metodą spektrofotometryczną (Helios Thermo Science), z wymianą medium co godzinę. Aby ocenić stężenie i żywotność komórek, mikroenkapsułki systemu ACA rozpuszczono w roztworze 55 mmol/l cytrynian sodu. Do oceny żywotności chondrocytów wykorzystano błękit trypanu, do obliczenia stężenia komórek użyto hemocytometru, podczas obserwacji mikroskopowych (Nikon Eclipse 80i).

## Wyniki i dyskusja

Uzyskane zdjęcia mikroskopowe mikroenkapsulek przedstawiono na RYS. 1. Proces formowania mikroenkapsulek jest zależny od wielu czynników, takich jak: średnica igły, odległość od roztworu żelującego, przyłożonego napięcia (siła pola elektrostatycznego), geometrii elektrod oraz stężenie i lepkość polimeru. Obniżenie stężenia roztworu alginianu z 1,8% do 1,2% spowodowało spadek średnicy mikroenkapsulek o 10%. Stosując igłę 27 i przyłożony potencjał 6 kV otrzymano mikroenkapsułki o średnicy 300-400 mikrometrów, natomiast dla igły 25 i tego samego potencjału powstałe mikroenkapsułki miały średnicę 500-600 mikrometrów. Średnica mikrowłókien w znaczący sposób zależy od igły, pomimo to szybkość pompowania również wpływa na otrzymywane wyniki. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano mikrowłókna o 500-600 mikrometrów i 800-900 mikrometrów.

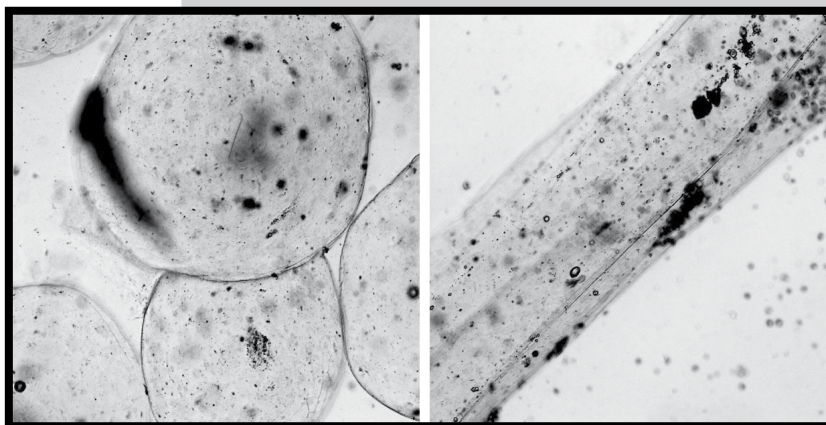
W celu dokonania oceny zmian w porowatości mikroenkapsulek po powlekanii chitozaniem i alginianem wykonano analizę SEM (RYS. 2). Po wytworzeniu zewnętrznych warstw porowatość mikroenkapsulek maleje. Zaobserwowane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe [6,5]. Wyniki wykazały wpływ stężenia alginianu i geometrii uzyskiwanych rodzajów mikroenkapsulek na ilość uwolnionej substancji modelowej. Oba wymienione parametry wpływają na formowanie żelu alginianowego i wynikającą z niego strukturę powstałych porów. Szybkość dyfuzji jest niższa niż dla mikrowłókien niż dla mikroenkapsulek, wynik ten jest spowodowany przez wpływ ich geometrii (RYS. 3). Uzyskane wyniki są zgodne z rozwiązaniami równań dyfuzji dla walca i kuli. Szybkość uwalniania białek do otaczającej pożywki może być ograniczona poprzez wzrost masy cząsteczkowej chitozanu i niejednorodność powstałego alginianowego rdzenia.

Zastosowanie polikationu ma na celu wytworzenie membrany na skutek silnego kompleksowania, która powinna ustabilizować i wzmocnić alginianową matrycę jednocześnie ograniczając i kontrolując stopień przepuszczalności. Zewnętrzną alginianową warstwę wykonano w celu wytworzenia ujemnie naładowanej powierzchni i neutralizacji grup kationowych chitozanu.

hour replacing medium. To evaluated cell concentration and viability ACA microbeads were dissolved in 55 mmol/l sodium citrate. Trypan blue was used for chondrocyte viability and hemacytometr was used for cell concentration calculation while microscopic observation (Nikon Eclipse 80i).

## Results and Discussion

Microscopic pictures of obtained microcapsules are shown in FIG. 1. Obtained results clearly demonstrate that microencapsulation forming process depends on many factors, such as: the needle diameter, distance from the collecting solution, applied voltage (strength of electrostatic field), electrode geometry and polymer concentration and viscosity. When alginate concentration was decreased from 1.8% to 1.2% the average bead diameter decreased of up to 10%. Microbeads with diameters 300-400  $\mu\text{m}$  were obtained by used 27 -gauge needle at applied potential 6 kV, and with diameter 500-600  $\mu\text{m}$  when 25 -gauge needle was used at this same potential. Microfibers diameter strongly depends on the needle diameter, however speed of pumping is also important. Microfibers with diameter 500-600  $\mu\text{m}$  and 800-900  $\mu\text{m}$  were used in experiments.

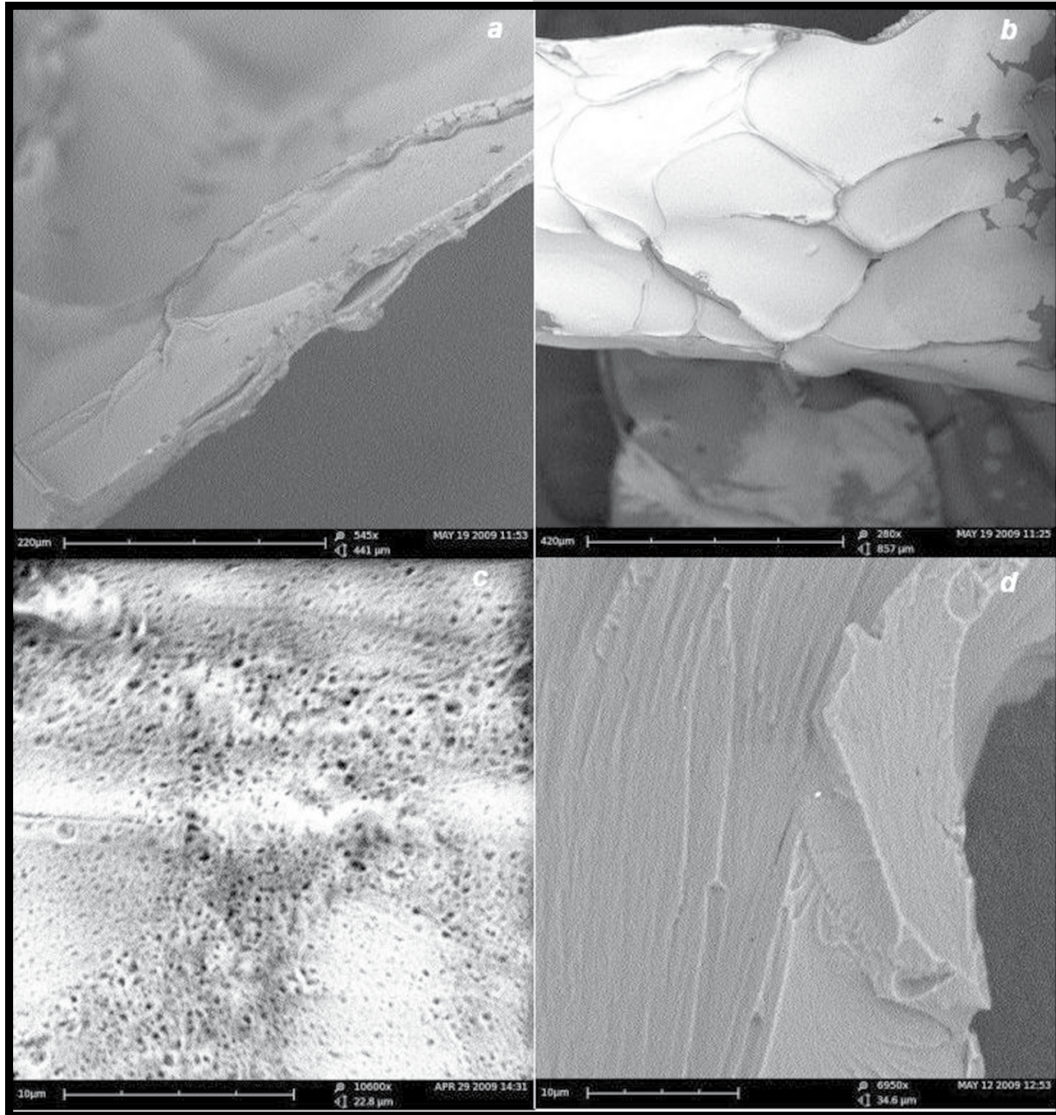


**RYS. 1. Uzyskane mikroenkapsułki: mikroenkapsułki (z lewej) mikrowłókna (po prawej).**  
**FIG. 1. Obtained microencapsules: microbeads (left) microfiber (right).**

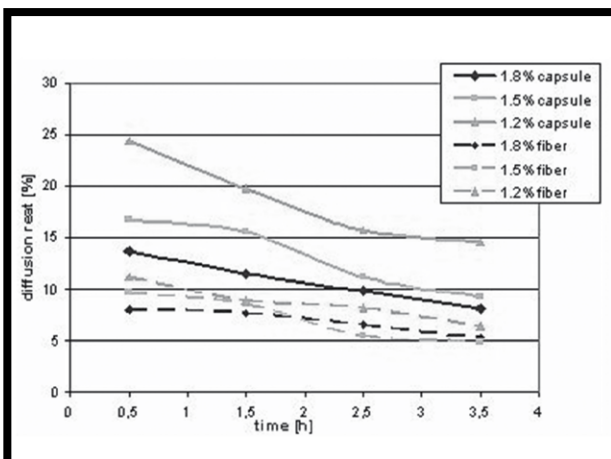
SEM studies were made to evaluate change in the porosity of microencapsules after chitosan and alginate coating (FIG. 2). A decrease in microcapsules porosity was observed after chitosan coating of alginate microencapsules. These results are in accordance with literature reports [5-6].

The results demonstrated the impact of alginate concentration and geometry of obtained forms on the amount of model substances released. Both these parameters affect the resulting alginate gel and the resulting pore structure. The release rate is lower for microfibers than for microbeads which is caused by the influence of their geometry (FIG. 3). The results obtained are in accordance with the solutions of equations of diffusion for the cylinder and sphere. The release rate of proteins into the surrounding medium could be limited by the increasing molecular weight of the chitosan and by making the gel core inhomogeneous.

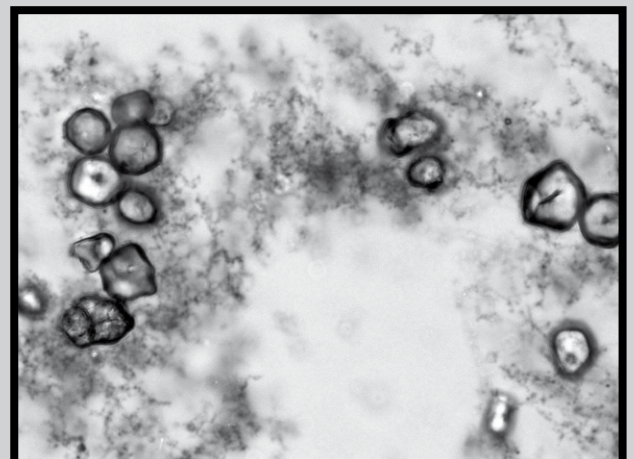
Function of polycation is to form a strong complex membrane which should stabilize and strengthen the alginate matrix at the same time to reduce and to control permeability. Outer coating is made to neutralize non reacted chitosan cationic groups and to generate negatively charged surface.



**RYS. 2.** Zdjęcia SEM algininowych mikrokapsulek (a) po pokryciu chitozanem oraz alginianem (b). Powierzchnia mikrowłókna: alginianowe (c) i ACA (d).  
**FIG. 2.** SEM image of alginate microbeads (a) after coating with chitosan and alginate (b). Surface of alginate microfibrils (c) and ACA (d).



**RYS. 3.** Szybkość dyfuzji z mikrokapsulek i mikrowłókien.  
**FIG. 3.** Diffusion rate from microbeads and microfibrils.



**RYS. 4.** Chondrocyty po 30 dniach hodowli w mikrokapsułkach sytemu ACA.  
**FIG. 4.** Chondrocytes after 30 day cultured in ACA microbeads.



Geometryczna forma mikroenkapsulek ma wpływ na stężenie komórek. Po 21 dniach hodowli stwierdzono zmniejszenie stężenia chondrocytów w mikrowłóknach z 4,56 do 4,48  $10^6$  komórek/ml. Tak nagła zmiana w stężeniu komórek prawdopodobnie spowodowana jest degradacją włókien i uwalnianiem komórek do pożywki hodowlanej. Dla mikroenkapsulek o średnicy 300-400  $\mu\text{m}$  końcowe stężenie komórek wzrosło z 4,6 do 4,64  $10^6$  komórek/ml i było wyższe niż dla mikroenkapsulek o średnicy 500-600  $\mu\text{m}$ . Efekt ten spowodowany jest przez właściwości dyfuzyjne mikroenkapsulek. Zmniejszenie średnicy mikroenkapsułki poprawia transport dyfuzyjny substancji odżywczych i metabolitów. Badania żywotności komórek wykazały 90% żywotność komórek po procesie mikroenkapsulacji. Zaobserwowano niewielki spadek żywotności komórek w czasie, ale po 30 dniach hodowli 62% komórek pozostaje żywe (RYS. 4).

## Wnioski

Przeprowadzone badania wykazują, że system ACA może być stosowany do mikroenkapsulacji chondrocytów. Metoda mikroenkapsulacji nie zawiera etapów szkodliwych dla żywotności i wzrostu komórek. Wszystkie etapy opisanej procedury wykonywane są w temperaturze pokojowej, pod normalnym ciśnieniem i bez użycia rozpuszczalników organicznych. Wymienione zalety procesu mikroenkapsulacji pozwalają na szerokie zastosowanie badanej metody w inżynierii tkankowej.

Cell concentration depends on the geometrical form of the encapsulating system. After 21 days of cells cultured in microfibers decreases in cell concentration from 4.56 to 4.48  $10^6$  cells/ml was observed. This sudden change in cell concentration is probably caused by the degradation of fibers and cell release into the culture medium. For microbead with a diameter of 300-400  $\mu\text{m}$  final concentration of cells increases from 4.6 to 4.64  $10^6$  cells/ml and it was higher than for the microcapsules with a diameter of 500-600  $\mu\text{m}$ . The effect is caused by diffusion properties of microcapsules. Decrease of microbeads diameter will improve diffusional transport of nutrients and metabolites. Cells viability tests shows that 90% of the cells were alive after the microencapsulation procedure. We have observed a slight decrease in cell viability with time but after 30 days of culturing 62% of cells were still alive (FIG. 4).

## Conclusions

Presented results show that the ACA system can be applied for the microencapsulation of chondrotic cells. The microencapsulation method does not contain stages harmful for the cells survival and growth. All steps are carried out in room temperature, under normal pressure and without organic solvents. More over microencapsulation conditions allow for the wide use method in tissue engineering.

## Piśmiennictwo

- [1] Anderer, U., Libera, J. "In vitro engineering of human autogenous cartilage" *Journal of Bone and Mineral Research*, 17 .8 (2002): 1420-1429.
- [2] Loty, S., Sautier, J.-M., Loty, C., Boulekbache, H., Kokubo, T., Forest, N. "Cartilage formation by fetal rat chondrocytes cultured in alginate beads: A proposed model for investigating tissue-biomaterial interactions" *Journal of Biomedical Materials Research*, 42. 2 (1998) : 213-222.
- [3] Binette, F., McQuaid, D.P., Haudenschild, D.R., Yaeger, P.C., McPherson, J.M., Tubo, R. "Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro" *Journal of Orthopaedic Research*, 16.2 (1998): 207-216.

## References

- [4] Chandra, R., Rustgi, R., "Biodegradable polymers" *Progress in Polymer Science*, 23.7 (1998) : 1273-1335.
- [5] Gombotz, W.R., Wee, S.F. "Protein release from alginate matrices" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31.3 (1998):. 267-285.
- [6] Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P., Skjåk-Bræk, G. "Alginate polycation microcapsules: I. Interaction between alginate and polycation" *Biomaterials*, 17. 10 (1996): 1031-1040.

# OTRZYMYWANIE NANOCZĄSTEK SREBRA POKRYWANYCH POLIALDEHYDO-DEKSTRANEM

IGA WASIAK\*, TOMASZ CIACH

LABORATORIUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,  
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROCESOWEJ  
\* E-MAIL: I.WASIAK@ICHIP.PW.EDU.PL

## Streszczenie

Prezentowane badania opisują prace doświadczalne nad nanocząstkami srebra otrzymywanymi poprzez redukcję jonów srebra za pomocą pochodnej dekstranu w roztworze wodnym. W przedstawionej metodzie wykorzystano polialdehydo-dekstran jako czynnik redukujący i ochronny, a także jako ligand umożliwiający funkcjonalizację otrzymanych nanocząstek. Zbadano między innymi wpływ czasu reakcji i masy cząsteczkowej polialdehydo-dekstranu na charakterystyczne parametry nanocząstek. Otrzymane nanocząstki poddano badaniom z zastosowaniem Nanosight i SEM, oraz wykonano analizę widma UV-Vis. Opisaną metodą uzyskano nanocząstki o średnicy mniejszej niż 100 nm o stosunkowo wąskim rozkładzie średnic. Otrzymałą średnicę nanocząstek można kontrolować przez czas reakcji i zastosowane stężenie polialdehydo-dekstranu.

**Słowa kluczowe:** nanocząstki srebra, polialdehydo-dekstran

[Inżynieria Biomateriałów, 106-108, (2011), 172-176]

## Wstęp

W ostatnich latach nanocząstki (NPs) wzbudziły duże zainteresowanie, ponieważ posiadają różnorodne zastosowania w wielu dziedzinach, od biomedycyny poprzez optykę do elektroniki. NPs są to nano również sub-mikro cząstki o średnicy poniżej jednego mikrometra i różnych cechach morfologicznych: nanosfery, nanokapsułki nanomicelle, nanowłókna i nanoliposomy. Zastosowanie NPs jako systemu dostarczania leków oferują kilka unikalnych właściwości, takich jak zwiększenie rozpuszczalności w wodzie i biodostępność leku, wydłużenie czasu półtrwania leku w organizmie, preferowaną akumulację w miejscach występowania nowotworu i zmniejszenie ogólnoustrojowych działań niepożądanych. Pomimo wielu zalet NPs cechują się niską stabilnością in vivo ze względu na duży stopień rozcieńczenia we krwi, oraz interakcję z komórkami i białkami w niej obecnymi. Przytoczone zalety oraz wady mogą być kontrolowane przez staranny dobór polimerów wykorzystanych do syntezy otoczek. Takie polimerowe powłoki powinny zapewnić stabilizację, celowanie i biochemiczne rozpoznawanie gatunków. Zastosowanie polisacharydów na zewnętrzne warstwy poprawia biouzgodność i zmniejsza toksyczność, ponieważ podlegają one całkowitej degradacji in vivo.

Srebro jest metalem szlachetnym wykorzystywanym przez ludzi od tysięcy lat w różnych dziedzinach życia jako biżuteria, narzędzia, monety, materiał fotograficzny a także do otrzymywania materiałów wybuchowy. Jednak jednym z ważniejszych zastosowań srebra jest jego wykorzystanie jako środka dezynfekującego do celów medycznych.

# PREPARATION OF POLIALDEHYDE-DEXTRANE COATED SILVER NANOPARTICLES

IGA WASIAK\*, TOMASZ CIACH

BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY,  
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING  
\* E-MAIL: I.WASIAK@ICHIP.PW.EDU.PL

## Abstract

Presented study describes the experimental work on silver nanoparticles production by the reduction of silver ions by dextran derivative in water solution. In the presented method we used polyaldehyde-dextran as a reductive and protective agent and also a functionalisation ligand. The influence of process parameters i.e. the reaction time and molecular weight of polyaldehyde-dextran on the characteristic parameters of nanoparticles was evaluated. Particles were characterized by Nanosight and SEM, their UV-Vis spectroscopic absorption properties were also determined. Nanoparticles with diameter less than 100nm with relatively narrow size distribution were obtained. We found that the diameters of nanoparticles can be control by the reaction time and applied polyaldehyde-dextran concentration.

**Keywords:** silver nanoparticles, polyaldehyde-dextran

[Engineering of Biomaterials, 106-108, (2011), 172-176]

## Introduction

In recent years nanoparticles (NPs) have attracted considerable interest as they have lots of potential application in many different fields, from biomedicine to optical and electronic fields. Generally they are nanometric also sub-micro particles with size below one micrometer, and with various morphologies, including nanospheres, nanocapsules, nanomicelles, nanofibres and nanoliposomes. Application NPs as drug delivery system offer several unique features such as enhancing the aqueous solubility and bioavailability of the drug, prolongation of the circulation time, preferential accumulation at the tumor sites and reduction of systemic side effects. However they have low stability in vivo because of the large dilution volume and interaction with cells and proteins present in blood. These advantages and disadvantages can be controlled by carefully chosen polymer shells materials. Polymeric shells should provide stabilization, specific targeting and recognition of biochemical species. Application of polysaccharide coating improves biocompatibility and reduces toxicity, as they completely degrade in vivo.

Silver has been used for thousands of years as a precious metal by humans in different applications as jewellery, tools, coins, photographic material or explosives. One of the most significant applications of silver is as a disinfectant for medical purposes. Silver is an effective antimicrobial agent with low toxicity, which is important especially in the treatment of burn wounds where transient bacteremia is prevalent and its fast control is essential. Drugs releasing silver in ionic forms are known to get neutralized in biological fluids and upon long-term use may cause abnormality in humane body.

Srebro jest skutecznym środkiem przeciwbakteryjnym o niskiej toksyczności, co jest szczególnie istotne w leczeniu ran oparzeniowych gdzie zakażenia bakteriami zdarzają się bardzo często i niezbędna jest szybka kontrola tego procesu. Leki, które uwalniają srebro w postaci jonowej, ulegają neutralizacji w płynach biologicznych i poprzez długotrwałe działanie mogą powodować istotne zmiany w organizmie ludzkim.

Dekstran jest hydrofilową, rozpuszczalną w wodzie naturalną substancją, obojętną w układach biologicznych i nie wpływającą na żywotność komórek. Ze względu na te właściwości, roztwory dekstranu były używane przez wiele lat jako ekspandery krwi do utrzymania, lub wymiany jej objętości. Przeprowadzono również badania dekstranu pod kątem wykorzystania w systemach dostarczania różnych środków terapeutycznych. Ostatnie badania wykazały, że stosowanie dekstranu jako składnika proleków zmniejsza toksyczność, zapewnia stały stopień uwalniania i wpływa na właściwości biodystrybucji leków [1-4]. Takie zastosowanie dekstranu wymaga włączenie do jego łańcucha grup reaktywnych na przykład grupy aldehydowe. Wprowadzenie tych grup może być wykonane przez selektywne utlenianie kwasem nadjodowym lub jego solami grup triolowych obecnych w dekstranie. W wyniku procesu utleniania zostaje zerwane wiązanie pomiędzy sąsiednimi atomami węgla z wytworzeniem związków hydroksykarbonylowych. Tak częściowo utlenione polisacharydy, posiadają wolne grupy hydroksylowe obok grupy aldehydowych. Grupy te mogą podlegać dalszemu utlenianiu, tworząc dialdehydo-dekstran. Polisacharydy, do których wprowadzono grupy aldehydowe w wyniku utleniania łatwo tworzą wiązania kowalencyjne z biologicznie aktywnymi aminami, na przykład białkami. Jednakże, w celu zachowania aktywności biologicznej tych związków, liczba wprowadzanych do łańcucha polimeru grup aldehydowych, musi być ściśle kontrolowana.

W artykule opisano sposób przygotowania NPs srebrnym z dekstranową otoczką zewnętrzną. NPs zostały przygotowane przy użyciu jednoetapowej syntezy [5] w 37°C. Jest to temperatura ciała ludzkiego, bezpieczna dla wrażliwych na temperaturę leków (białek). Opisana metoda pozwala na otrzymanie wodnej zawiesiny nanocząstek, która to postać może być zastosowana w układach biologicznych. Zewnętrzne otoczki NPs srebra zostały wykonane z polialdehydo-dekstranu (PAD), o masie cząsteczkowej 40 i 70 kDa. W badaniach zanalizowano wpływ różnicy pomiędzy dwoma typami polialdehydo-dekstranu i czasu reakcji na średnice otrzymywanych NPs.

## Metodyka

Polialdehydo-dekstran otrzymywano metodą utleniania nadjodanem [6]. W skrócie: potrzebną ilość  $\text{NaIO}_4$  do utlenienia dekstranu rozpuszczono w 5 ml wody destylowanej. Roztwór ten dodano do 10 g dekstranu w 200 ml wody destylowanej. Reakcję prowadzono w ciemności przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór dializowano (celulozowe worki dializyjne o molekularnej masie odcięcia 14 kDa) przez 4 dni w wodzie destylowanej. Po liofilizacji otrzymano próbki w postaci proszku, które przechowywano w ciemności. Zawartość grup aldehydowych w utlenionym dekstranie oznaczono metodą miareczkowania przy użyciu chlorowodoru hydroksyloaminy [7]. Próbką nieutlenionego dekstranu użyto jako próby kontrolnej. Otrzymano PAD o 5% stopniu utlenienia.

Synteza NPs z PAD 40 i 70 kDa została przeprowadzona zgodnie z następującą procedurą. Odważoną ilość liofilizowanego polialdehydo-dekstranu rozpuszczono w 10 ml wody destylowanej w celu osiągnięcia pożądanego końcowego stężenia, następnie dodano 100  $\mu\text{l}$  0,1 M  $\text{AgNO}_3$ .

Dextran is hydrophilic and water-soluble natural substance, inert in biological systems and do not affect cell viability. Because of these properties, dextran solutions have been used for many years as blood expanders to maintain or replace blood volume, and studied for uses a carrier system for a variety of therapeutic agents. Recent studies revealed that the use of dextran as prodrugs component reduces toxicity, offers sustained release and influences the biodistribution properties of various drugs [1-4]. To use this polymer as modifiers, reactive groups like aldehyde groups must be introduced into the polymer chain. The introduction of these groups can be made by selective oxidation with periodic acid or its salts of the triol groups present in the dextran. As a result there is a break of the -C-C- bond with the formation of hydroxycarbonyl compounds, including partially oxidized sugars, possessing a free hydroxy group next to the aldehyde group formed. These groups can undergo further oxidation, forming dialdehyde-dextran. Polysaccharides that have acquired aldehyde groups as a result of oxidation easily form covalent bonds in the interaction with biologically active amines, for example, proteins. However, to preserve the biological activity of the compounds, number of aldehyde groups that is introduced must be strictly regulated.

This paper described a preparation method of silver core NPs with dextran shells. The NPs were prepared using one step synthesis method [5] at 37°C degrees. It is the human body temperature, which is safe for temperature-sensitive drugs (proteins). This method provides water-dispersible nanoparticles which is necessary for the application in biological systems. Shells have been made from polyaldehyde-dextran (PAD), of molecular weight 40 and 70 kDa. The difference between two types of polyaldehyde-dextran and time of reaction on prepared NPs diameter was reported.

## Methods

Polyaldehyde-dextran was obtained by periodate oxidation method [6]. Shortly: amount of  $\text{NaIO}_4$  desired for the certain dextran oxidation ratio was dissolved in 5 mL of distilled water. This solution was added to 10 g of dextran in 200 mL distilled water. The reaction was carried out in the dark for 1 h at room temperature. At the end of the reaction, the solution was extensively dialyzed (cellulose membrane, molecular weight cutoff 14 kDa) against distilled water for 4 days. A powdery sample was obtained via lyophilization and stored in the dark. The aldehyde contents of oxidized dextran samples were quantified via hydroxylamine hydrochloride method [7]. Untreated dextran samples were used as controls. Pure PAD with 5% degree of oxidation was obtained.

The synthesis of NPs from 40 and 70 kDa PAD was carried out according to follow procedure. Weighed amount of lyophilized polyaldehyde-dextran was dissolved in 10 ml of distilled water to reach the desired concentration and 100  $\mu\text{l}$  of 0.1M  $\text{AgNO}_3$  was added. The final concentration of polyaldehyde-dextran were changing from 10 to 2.5 mg/ml. This mixture was stirred at 37°C for 1 h, 3 h and 24 h. Control sample on NPs was obtained by boiling for 30 min, to compare the results.

The mean diameter and the size distribution of NPs were determined by NanoSight device with 405 nm laser beam [8]. This device employs Einstein-Stokes equation to calculate particles size, so obtained values are closely related to the diffusion rate of NP and to the hydrodynamic diameter of particles in water. Also UV-Vis absorption spectra of nano – suspensions were collected. Morphological examination of the dried NPs was carried out using Scanning Electron Microscopy (SEM) (Phenom Fei) after gold sputtering. Time of a rehydration after freeze-drying also was evaluated.

Końcowe stężenia poliadehydo-dekstranu dla obu badanych mas cząsteczkowych oscylowały w granicach od 10 do 2,5 mg/ml. Mieszaninę PAD i  $\text{AgNO}_3$  mieszano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 1 h, 3 h i 24 h. Próbkę kontrolną służącą do porównania wyników zostały otrzymane przez syntezę w  $100^\circ\text{C}$  przez 30 min.

Przeciętna średnica i rozkład wielkości NPs zostały zmierzone za pomocą NanoSight o długości wiązki lasera 405 nm [8]. Urządzenie to wykorzystuje równanie Einsteina-Stokesa do obliczenia wielkości cząstek, tak uzyskane wartości są ściśle związane z szybkością dyfuzji NPs i ich średnicą hydrodynamiczną. Wykonano również widma absorpcji UV-Vis nano - zawiesiny. Badania morfologiczne liofilizowanych NPs zostały wykonane przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) (Phenom Fei) po napyleniu złotem. Dokonano również oceniono czas i stopnia rehydrtacji po liofilizacji.

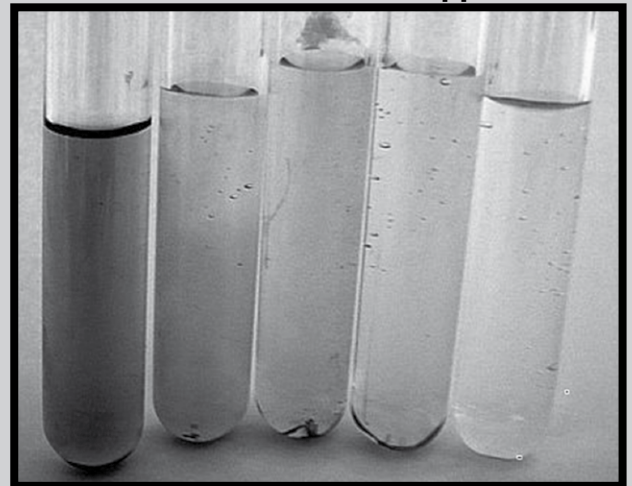
## Wyniki i dyskusja

Podczas redukcji jonów srebra i zarodkowania nanocząstek kolor roztworu / zawiesiny powoli zmienia się od bezbarwnego, poprzez żółty, fioletowy do brązowego (RYS. 1). Podobną zależność zaobserwowano na dla różnych stężeń dekstranu dla tego samego czasu reakcji. Powyższą obserwację można wytłumaczyć plazmową absorpcją powierzchniową NPs srebra. Właściwości optyczne NPs srebrnych oparte są na zbiorowych oscylacjach wolnych elektronów przewodnictwa w wyniku interakcji z promieniowaniem elektromagnetycznym. Światło padające tworzy oscylację elektronów przewodnictwa na powierzchni (i powyżej) NPs. Powstała oscylacja powoduje absorbowanie promieniowania elektromagnetycznego. Pole elektryczne promieniowania przychodzącego powoduje powstawanie dipoli NPs. Tak wzbudzone NPs starają się zniwelować ten efekt emitując falę rezonansową o charakterystycznej długości, która nadaje swoistą barwę koloidalnym roztworom NPs metali szlachetnych [9].

Kolor roztworu i maksimum absorpcji są związane z wielkością otrzymanych NPs. Obserwacje te zostały potwierdzone przez analizę widm UV-Vis. Dla próbek PAD 70 kDa o stężeniu 10 mg/ml uzyskano następujące maksima absorpcji 420,5, 429,0, 430,0 i 431,0 nm. Dla niższych stężeń dekstranu nie zaobserwowano brązowego odcienia zawiesiny. Wraz z wydłużeniem czasu syntezy NPs i wzrostem stężenia PAD następuje przesunięcie maksimum absorpcji w stronę czerwieni. Otrzymany wynik wykazuje zależność wielkość powstałych NPs od czasu prowadzenia reakcji jak i stężenie PAD, który działa jako środek redukcyjny, jak i stabilizator. Przeciętna średnica i rozkład wielkości NPs zostały zmierzone za pomocą NanoSight. Uzyskane wyniki podsumowuje TABELA 1. Jako ślepią próbę wykorzystano świeżo wymieszany roztwór PAD i srebra. Otrzymana średnica próbek kontrolnych jest niezależna od stężenia i masy cząsteczkowej PAD i wynosi 50 nm.

## Results and discussion

During the silver ions reduction and silver nanoparticles nucleation the solution / suspension color slowly change from water-like, via yellow, purple to brown (FIG. 1). A similar relationship was observed in the final product for various dextran concentrations. These results can be explained by the surface plasmon absorbance of silver NPs. The optical properties of silver NPs are based on the collective oscillation of free conduction electrons resulting from the interaction with the electromagnetic radiation. Incident light creates oscillations in conduction electrons present on the surface (and above it) of the NPs and electromagnetic radiation is absorbed. The electric field of the incoming radiation induces the formation of a dipole in the NPs. A restoring force in the NPs tries to compensate for this effect, resulting in a unique resonance wavelength that confers the characteristic color of colloidal solutions of noble metal NPs [9].



RYS. 1. Zmiany koloru zawiesiny NPs w czasie (z lewej 0 h, prawej po 24 h).

FIG. 1. Changing in color solution with time (left time 0 h right after 24 h).

The color of the solution and the maximum absorbance are related with the size of NPs. These observations are confirmed by UV-Vis absorbance spectra. The absorbance maximum was located at 420.5, 429.0, 430.0 and 431.0 nm for samples 70 kDa PAD with concentration 10 mg/ml. For lower dextran concentrations a brown tint of the solution were not received. The absorbance maximums were moved to red -shift spectra. This result indicates that the size of the NPs formed varies with the time of the reaction as well as concentration of PAD, which acts as a reductive agent as well as a stabilizer. In order to investigate the diameter of NPs NanoSight device analyze was made. Obtained results are summarizes in TABLE 1. Fresh mixture of PAD with silver was used as a blind sample. Diameter of control samples do not depending of concentration of PAD.

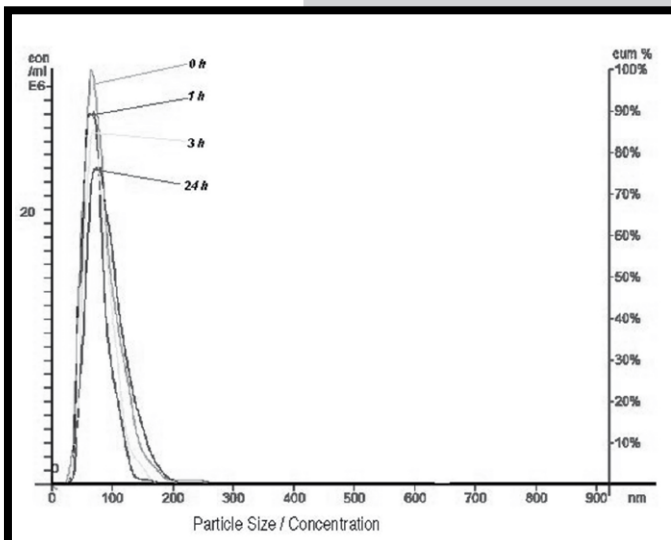
TABELA 1. Średnica NPs dla PAD 40 i 70 kDa po 1 h, 3 h i 24 h reakcji w  $37^\circ\text{C}$  i 30 min w  $100^\circ\text{C}$ .

TABLE 1. Diameter of NPs for PAD 40 and 70 kDa after 1 h, 3 h and 24 h of reaction in  $37^\circ\text{C}$  and boiling for 30 min.

Stężenie / Concentration [mg/ml]	Poliadehydo-dekstran / Polyaldehyde-dextran							
	40 kDa				70 kDa			
	$37^\circ\text{C}$			$100^\circ\text{C}$	$37^\circ\text{C}$			$100^\circ\text{C}$
	1h	3h	24h		1h	3h	24h	
10	70	75	80	80	73	76	88	84
6	60	74	77	77	61	74	80	81
5	58	72	75	75	60	70	74	80
4	56	67	71	71	58	63	71	72
2.5	51	60	65	65	54	60	65	68

Dla stężenia poliadlehydo-dekstranu 2,5 mg/ml wielkości otrzymanych NPs zawiera się między 60-65 nm i jest prawie taka sama jak dla próbki kontrolnej, które sięgają około 50 nm. Wzrost stężenia PAD powoduje wzrost średnicy otrzymywanych NPs (10 mg/ml, PAD 70 kDa, 90 nm). Wraz z wydłużeniem czasu reakcji zaobserwowano wzrost wielkości NPs. Efekt taki może być spowodowany syntezą nanocząstki srebra o większej średnic (dłuższego czasu wzrostu dyfuzyjnego) lub wytworzenia grubszej polimerowej otoczki zewnętrznej (dłuższy czas wzrostu otoczki). Nie zaobserwowano istotnych zmian w średnicy NPs syntetyzowany z PAD o różnej masie cząsteczkowej. Niewielki wzrost średnicy NPs uzyskanych z 70 kDa PAD jest prawdopodobnie spowodowany przez długość łańcuchów dekstranu, które są adsorbowane na powierzchni powstałej nanocząstki srebra. Wzrost średnicy NPs następuje na skutek pojawieniem się grup aldehydowych w utlenionym dekstranie. Obecność tych grupy pozwala na tworzenia wiązań acetalowych pomiędzy łańcuchami dekstranu. Powoduje to wzrost grubości warstwy zewnętrznej w związku z tym całej średnicy NPs. Podczas gdy wzrasta średnica NPs ich stężenie spada. Obserwację tą ilustruje RYS. 2.

Przeprowadzone badania SEM wykazały regularny kształt zsyntezowanych NPs (RYS. 3). Uzyskane średnice wynosiły około 300 nm, są większe niż średnice obserwowane przy użyciu NanoSight. Wzrost obserwowanej średnicy można wytłumaczyć adsorbacją łańcuchów nieprzereagowanego dekstranu podczas liofilizacji, a następnie pokrycie ich warstwą złota w czasie napyłania.

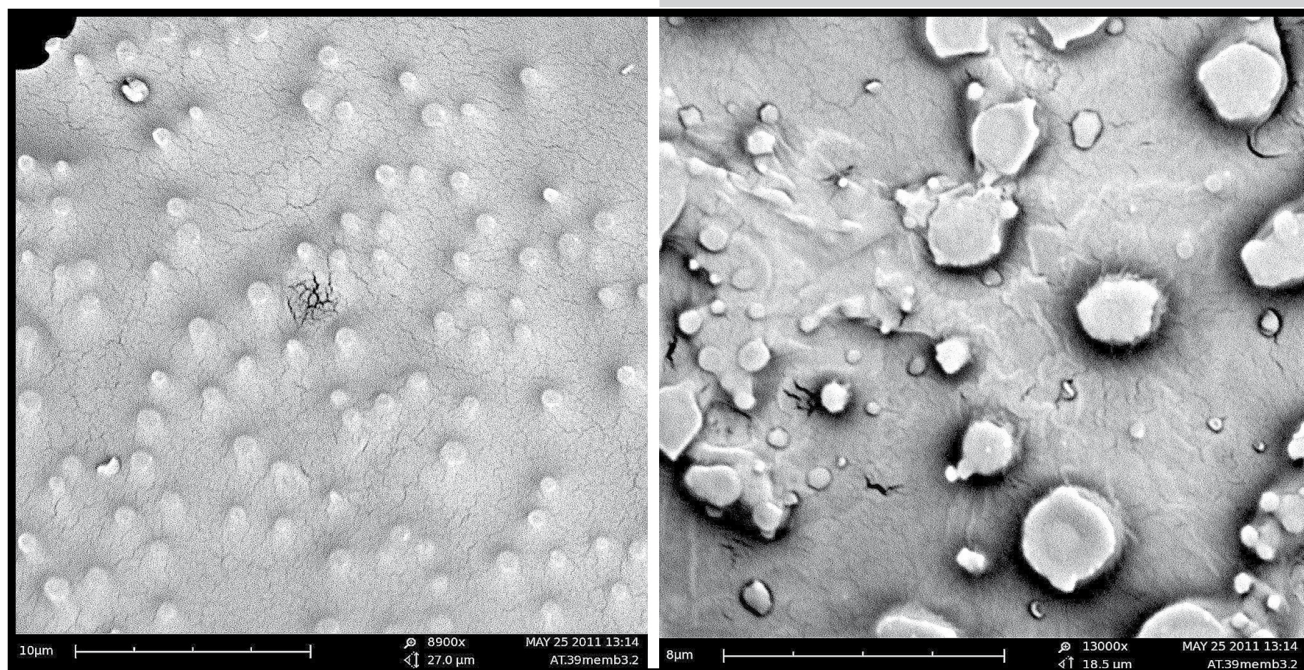


**RYS. 2. Średnica i rozkład NPs PAD 70kDa o stężeniu 6 mg/ml po 0 h, 1 h, 3 h i 24 h reakcji.**

**FIG. 2. Diameter and distribution of NPs from 70kDa PAD with 6mg/ml concentration for 0 h, 1 h, 3 h and 24 h of reaction.**

obtained from the 70 kDa is probably caused by the longer chains of dextran which are adsorbed at the surface of the silver core. Rise in NPs diameter is caused by appearance of aldehyde groups in oxidize dextran. Presence of aldehyde groups improves formation of acetal bonds between the dextran chains which causes expansion of the shell and of the whole NPs diameter. While the size of formed NPs increases, the concentration decreases. This observation is shown in FIG. 2.

SEM studies reveal the regular shape of formed NPs (FIG. 3). The diameter obtain from SEM measurement were about 300 nm, which are larger than diameters observed by NanoSight. This can be explained by the adhesion of the unreacted dextran chains during freeze-drying and then covering by the gold layer during sputtering.



**RYS. 3. Obraz SEM NPs po liofilizacji.**

**FIG. 3. SEM imagine of NPs after freeze-drying.**

**TABELA 2. Średnica NPs po uwodnieniu w wodzie destylowanej po 15 min, 30 min i 60 min.**  
**TABLE 2. Diameter of NPs after hydration in distilled water for 15, 30 and 60 min.**

Stężenie / Concentration [mg/ml]	Polialdehydo-dekstran / Polyaldehyde-dextran					
	40 kDa			70 kDa		
	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
10	60	64	66	68	72	73
6	57	60	62	57	60	64
5	54	60	60	53	59	60
4	51	55	57	50	58	58
2.5	50	54	53	42	54	54

Po liofilizacji przeprowadzono badanie stopnia rehydracji po 15 min, 30 min i 60 min mieszania w wodzie destylowanej. NPs osiągnęły 80% średnicy początkowej po 30 minutowym czasie rehydracji. Dłuższe przebywanie w środowisku wodnym nie skutkowało dalszym wzrostem średnicy NPs. Ostateczne zmierzone średnice NPs zestawiono w TABELI 2. Na podstawie przedstawionych wyników, można stwierdzić, że nie wszystkie łańcuchy, które tworzą polimerową otoczkę wokół srebrnego rdzenia nie zostały uwodnione. Na ten efekt może mieć wpływ trudności w dotarciu dipoli wody do wewnętrznych łańcuchów dekstranu. Łańcuchy na powierzchni NPs są uwodnione w pierwszym etapie. Zjawisko to powoduje utrudniony dostęp wody do tych łańcuchów, które są blisko nanocząstki srebra.

## Wnioski

W prezentowanym artykule została przedstawiona prosta technika syntezy nanocząstek srebra z otoczką z polialdehydo-dekstranu. Nanocząstki zostały otrzymane w syntezie jednoetapowej w łagodnej temperaturze, bez użycia rozpuszczalników organicznych, lub środków powierzchniowo czynnych. Powstałe nanocząstki mają stabilną strukturę. Stwierdzono, że wielkość nanocząstek zależy w znaczącym stopniu od stężenia PAD i czasu reakcji. Prostota i łagodne warunki prowadzenia syntezy pozwalają na zastosowanie tego procesu do produkcji nanocząstek zawierających leki. Obecność dodatkowych grup aldehydowych sprawia, że przyłączenie leku jest łatwe.

Otrzymane prezentowaną metodą NPs mogą mieć zastosowanie jako środek antybakteryjny w różnego rodzaju powłokach, a także w opatrunkach.

After NPs freeze-drying a degree of rehydration was evaluated after 15 min, 30 min and 60 min in distilled water. NPs achieved 80% of initial diameter after 30 min in distilled water. Further hydration does not result in increase of NPs diameter. Final obtained NPs diameters are shown in TABLE 2. From these results, it is reasonable to conclude that not all the chains which are deposited on silver core are again hydrated. This effect can be affected by the water difficulty for approaching an internal dextran chains. Chains outside NPs are first hydrated. This causes trouble in water accessing to those chains which are close to the silver core.

## Conclusions

Simple technology of silver core NPs with polyaldehyde-dextran shell was presented. Particles were formed directly in one step process at mild temperature without using any organic solvents or surfactants. The resultant nanoparticles have a stable structure. It was found out that the size of nanoparticles depends significantly on PAD concentration and reaction time. Simplicity and mild condition of the process allows the application of this process to produce drug containing nanoparticles. Possible presence of additional aldehyde groups makes the attachment of drug molecules or other species easy.

Presented NPs can be applied as antibacterial agent in various types of coatings and also in wound dressings.

## Piśmiennictwo

- [1] Kim, D.S., Jung, Y.J. and Kim, Y.M. "Synthesis and Properties of Dextran-Linked AmpicillinA" *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27.1 (2001): 97-101.
- [2] Yura, H., Yoshimura, N., Hamashima, T., Akamatsu, K., Nishikawa, M., Takakura, Y. and Hashida, M. "Yura, H., Yoshimura, N., Hamashima, T., Akamatsu, K., Nishikawa, M., Takakura, Y., Hashida, M. "Synthesis and pharmacokinetics of a novel macromolecular prodrug of Tacrolimus (FK506), FK506-dextran conjugate." *Journal of Controlled Release* 57.1 (1999): 87-99
- [3] Battersby, J., Clark, R., Hancock, W., Puchulu-Campanella, E., Haggarty, N., Poll, D., Harding, "Sustained release of recombinant human growth hormone from dextran via hydrolysis of an imine bond." *Journal of Controlled Release*, 42.2 (1996): 143-156.
- [4] Nichifor, M., Coessens, V., Schacht, E.H. "Macromolecular prodrugs of 5-fluorouracil - 1: Synthesis and hydrolytic stability." *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 10.3 (1995): 199-222.

## References

- [5] Ma, Ying, Li, Na, Yang, Cheng and Yang, Xiorong "One-step Synthesis of Amino-dextran-protected Gold and Silver Nanoparticles and Its Application in Biosensors." *Analytical and Biochemical Chemistry* 382.4 (2005): 1044-1048.
- [6] Jeanes, Allene and Wilham, C.A. "Periodate Oxidation of Dextran." *Journal of American Chemical Society* 72.6 (1950): 2655-2657.
- [7] Zhao, Huiru, Heindel, Ned D. "Determination of Degree of Substitution of Formyl groups in Polyaldehyde Dextran by the Hydroxylamine Hydrochloride Method." *Pharmaceutical Research* 8.3 (1991): 400-402.
- [8] [www.nanosigt.com](http://www.nanosigt.com)
- [9] Solmon, Sally D., Bahadory, Mozghan, Jeyarajasingam, Aravindan V., Rutkowsky, Susana A. and Bortiz, Chales "Synthesis and Study of Silver Nanoparticles." *Journal of Chemical Education* 84.2 (2007): 322-325.