



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00796**

(22) Data de depozit: **07.11.2012**

(41) Data publicării cererii:
28.11.2014 BOPI nr. **11/2014**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU" AL ACADEMIEI ROMÂNE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **VASILESCU ECATERINA, STR.LOTRIOARA NR.5, BL.V31, AP.114, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DROB PAULA, STR.RĂUL DOAMNEI NR.5, BL.C4, AP.140, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **POPA MONICA MIHAELA, STR. CRÂNGULUI NR. 9-11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CALDERON MORENO JOSE MARIA, STR. CRÂNGULUI NR. 9-11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VASILESCU CORA, STR. LOTRIOARA NR. 5, BL. V31, SC. C, AP. 113, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DROB SILVIU IULIAN, STR. RĂUL DOAMNEI NR.5, BL.C4, SC.D, AP.140, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU CHIMIC VERDE DE OBȚINERE ACOPERIRE BIOACTIVĂ DE HIDROXIAPATITĂ PE SUPRAFAȚA UNUI NOU BIOALIAJ PENTRU IMPLANT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei acoperiri bioactive de hidroxiapatită $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ -HA pe suprafața unui nou bioaliaj Ti - 20Nb - 10Zr - 5Ta, prin reacție de depunere în soluție verde, în scopul îmbunătățirii rezistenței la coroziune, a bioactivității și a scurtării duratei de osteoinducție și osteointegrare. Procedeu conform invenției are următoarele etape: șlefuirea aliajului cu hârtie abrazivă până la suprafața oglină, spălare timp de 1 min cu apă ultrapură, uscare prin tamponare timp de 1 min cu hârtie de filtru, degresare ultrasonică în acetonă timp de 15 min, uscare timp de 1 min, spălare ultrasonică timp de 15 min în apă ultrapură, uscare 1 min, decapare 10 min în soluție, spălare 1 min în apă și apă ultrapură, uscare timp de

1 min, montarea bioaliajului în vasul de reacție prin suspendarea acestuia cu un suport confecționat din material inert de politetrafluoretină, imersarea aliajului timp de 4 h într-o soluție chimică verde pură, formată din cantități egale de soluție de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ cu 0,7348 g/l și soluție de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ cu 1,8997 g/l în amestec cu NaHCO_3 cu 3,02396 g/l, soluția având pH-ul ajustat cu soluție HEPES între valorile 7,2-7,4, uscare în mediul ambiant timp de 24 h și condiționat timp de 24 h într-o atmosferă controlată cu umiditatea de 65%, toate etapele procedurii desfășurându-se la o temperatură de 23°C.

Revendicări: 7



DESCRIEREA INVENȚIEI

PROCEDEU CHIMIC VERDE DE OBTINERE ACOPERIRE BIOACTIVĂ DE HIDROXIAPATITĂ PE SUPRAFAȚA UNUI NOU BIOALIAJ PENTRU IMPLANT

Această invenție se referă la obținerea prin reacție de depunere în soluție chimică verde a unei acoperiri bioactive de hidroxiapatită $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ - HA pe suprafața unui nou bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta, în scopul îmbunătățirii rezistenței la coroziune, bioactivității și scurtării timpului de osteoinducție și osteointegrare, deci de funcționalizare a suprafeței acestuia. Procedul de obținere este special adaptat pentru compoziția și suprafața noului bioaliaj astfel încât să se obțină cea mai favorabilă, cea mai rapidă și cea mai ieftină acoperire de HA.

Până în prezent acoperirile de hidroxiapatită erau realizate prin pulverizare din plasmă [M. Ferraris, P. Rabajoli, L. Paracchini, and F. Brossa, J. Am. Ceram. Soc., 79 (1996) 1515-1520], depunere electroforetică [M. Wei, A. J. Ruys, B. K. Milthorpe, and C. C. Sorrell, J. Biomed. Mater. Res., 45 (1999) 11-19], oxidare în microarc [M. Wei, S. H. Wang, G. F. Wu, B. L. Liu, J. H. Wei, C. Xie, and O. H. Li, Surf. Coat. Technol., 205 (2010) 1736-1742], sol-gel [R. Roest, B. A. Latella, G. Heness, and B. Ben-Nissan, Surf. Coat. Technol., 205 (2010) 3520-3529], etc. Aceste acoperiri se delaminează generând particule care pot avea efecte abrazive atât asupra osului cât și a aliajului însuși și în plus necesită echipamente speciale de depunere la un preț de cost ridicat.

Prezenta invenție propune obținerea unei acoperiri de hidroxiapatită prin reacția chimică de depunere pe suprafața noului bioaliaj de implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta dintr-o soluție suprasaturată cu ioni de calciu și fosfat. Prin reacția chimică se asigură o foarte bună aderență între acoperire și bioaliaj; compoziția acoperirii este determinată de conținutul soluției în care are loc reacția chimică și se obține strict compusul hidroxiapatită, principalul component anorganic al osului uman; grosimea și cristalinitatea acoperirii sunt controlate de timpul de depunere. Rezultă o acoperire omogenă, cristalină, cu dimensiuni de cristale convenabile pentru a asigura aderența, creșterea și proliferarea celulelor osoase (osteoblaste). Procedul se poate aplica pe implanturi cu forme și profile complicate, lucru ce nu se putea realiza prin metodele amintite anterior.

Acoperirea de hidroxiapatită acționează ca un strat protector ce are caracter de barieră în calea pătrunderii ionilor agresivi (în special ionii de clor) din fluidul fiziologic, îmbunătățind rezistența la coroziune a aliajului; de asemenea, în timp, stabilitatea și grosimea acoperirii cresc datorită unor noi depuneri din soluțiile fiziologice, indicând bioactivitatea acesteia adică

stimularea depunerii de HA, principalul component anorganic al osului, deci stimularea formării de os (osteinducție și osteointegrare).

Soluția originală propusă constă în obținerea acoperirii de hidroxiapatită pe suprafața aliajului foarte bine pregătită în prealabil pentru a se asigura o aderență foarte bună și o viteză de reacție mare, deci o depunere ușoară, rapidă, la temperatura de 23°C, cu consum foarte mic de energie, fără poluare deoarece utilizează substanțe componente ale fluidului uman.

Etapele de desfășurare ale procedurii cea de pregătire a suprafeței, cea de procesare chimică și cea de condiționare sunt prezentate în schema de mai jos.

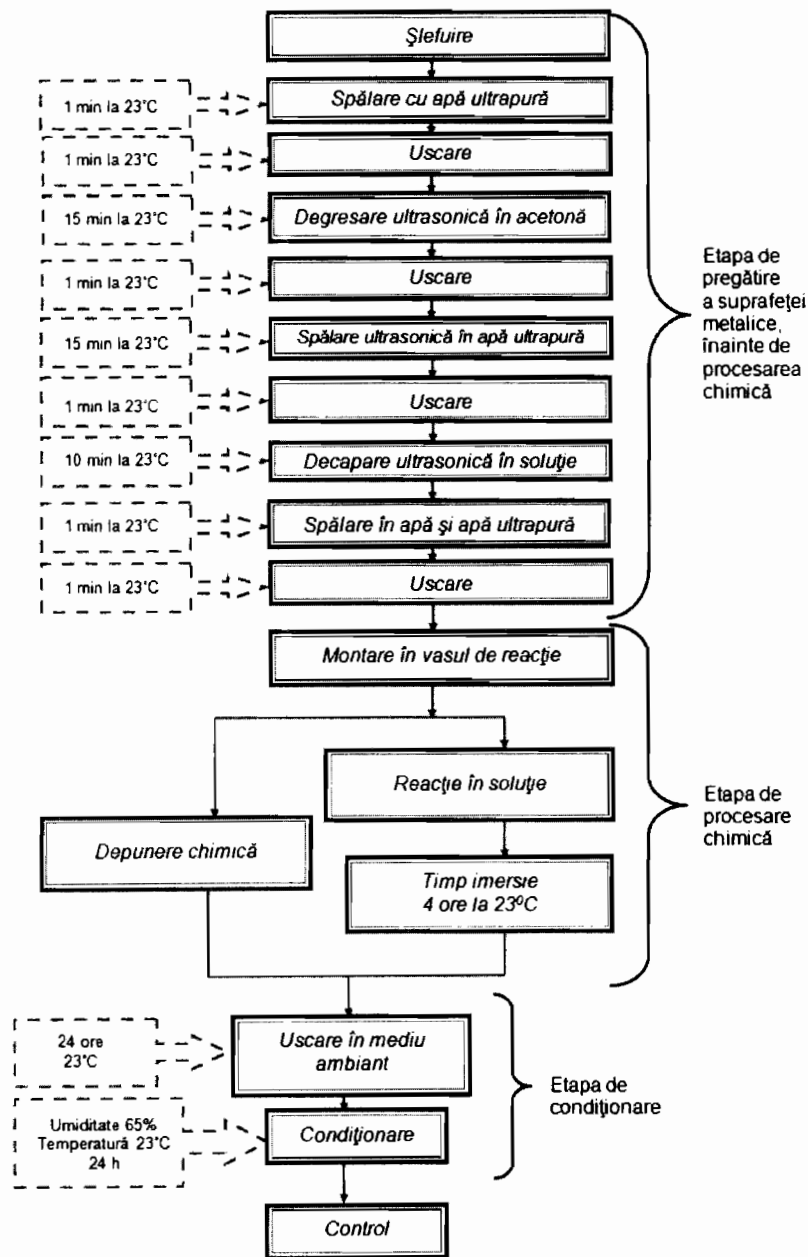


Fig. 1. Reprezentarea schematică a etapelor de desfășurare ale procedurii

Operațiile procedurii se desfășoară după cum urmează:

Șlefuirea se efectuează până la suprafață oglindă;

Spălarea se face cu apă ultrapură;

Uscarea cu hârtie de filtru, prin tamponare timp de 1 minut la temperatura de 23⁰C;

Degresarea ultrasonică în acetonă de puritate specială pentru celule umane timp de 15 minute la temperatura de 23⁰C în baie cu ultrasunete;

Uscarea cu hârtie de filtru, prin tamponare timp de 1 minut la temperatura de 23⁰C;

Spălarea ultrasonică în apă ultrapură timp de 15 minute la temperatura de 23⁰C;

Uscarea cu hârtie de filtru, prin tamponare timp de 1 minut la temperatura de 23⁰C;

Decaparea ultrasonică în soluția de decapare (2 ml HF 40%, 4 ml HNO₃ 60% la 100 ml H₂O) timp de 10 minute la temperatura de 23⁰C în baie cu ultrasunete;

Spălarea cu jet de apă de la robinet timp de 2-3 minute la temperatura de 23⁰C și *clătirea* cu apă ultrapură timp de 1 minut la temperatura de 23⁰C;

Uscarea cu hârtie de filtru, prin tamponare timp de 1 minut la temperatura de 23⁰C;

Montarea în vasul de reacție;

Imersarea probei în soluție pentru reacția de depunere a HA timp de 4 h la temperatura de 23⁰C. Soluția chimică verde se obține din substanțe pentru culturi de celule în felul următor:

- se prepară o soluție ce conține 0,7348 g/l CaCl₂.H₂O; se ajustează pH-ul acestei soluții până la valoarea de 7,2 – 7,4 adăugându-se soluție HEPES;

- se prepară o soluție ce conține 1,8997 g/l Na₃PO₄.12H₂O și 3,02396 g/l NaHCO₃; se ajustează pH-ul acestei soluții până la valoarea de 7,2 – 7,4 adăugându-se soluție HEPES;

- se amestecă cantități egale din cele două soluții și se verifică pH-ul care trebuie să aibă o valoare între 7,2 și 7,4; se ajustează pH-ul acestei soluții până la valoarea de 7,2 – 7,4 adăugându-se soluție HEPES

După 4 ore de imersie în soluția de depunere, urmează *uscarea* în mediu ambiant 24 de ore la temperatura de 23⁰C;

Condiționarea timp de 24 h la umiditatea de 65% și temperatura de 23⁰C.

Controlul formării hidroxiapatitei se face cu microscop optic dar și cu spectrometrul Raman pentru a identifica benzile caracteristice hidroxiapatitei cristaline.

Exemplul 1. Caracterizarea suprafeței aliajului după reacție de depunere timp de 2 h în soluția chimică verde

Parametrii utilizați au fost:

- Substrat: bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta
- Timp de reacție în soluția chimică verde: 2 h
- Temperatura de lucru: 23⁰C

Din spectrul Raman (Fig. 2) nu s-a observat formarea hidroxiapatitei în urma reacției de depunere timp de 2 h; nu apar nici un fel de benzi caracteristice hidroxiapatitei.

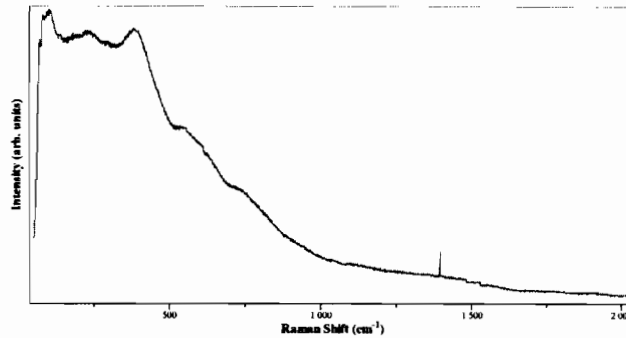


Fig. 2. Spectrul Raman al suprafeței bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție de depunere timp de 2h în soluția chimică verde

Exemplul 2. Obținerea acoperirii de hidroxiapatită după reacție de depunere timp de 4 h în soluția chimică verde

Parametrii utilizați au fost:

- Substrat: bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta
- Timp de reacție în soluția chimică verde: 4 h
- Temperatura de lucru: 23⁰C

Spectrul Raman (Fig. 3) evidențiază banzile caracteristice hidroxiapatitei cristaline prin maximul de la $\approx 960 \text{ cm}^{-1}$ și 2 benzi largi secundare în intervalul $400 - 600 \text{ cm}^{-1}$.

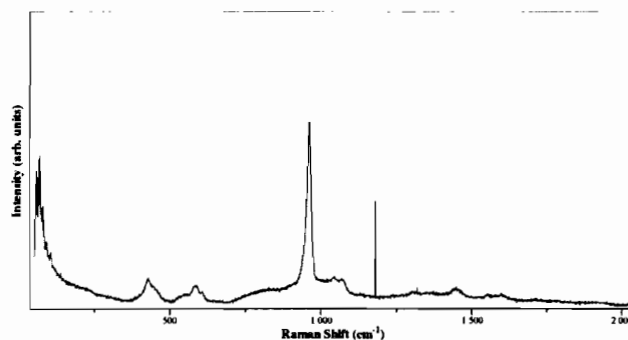


Fig. 3. Spectrul Raman al suprafeței bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție de depunere timp de 4h în soluția chimică verde

Exemplul 3. Obținerea acoperirii de hidroxiapatită după reacție de depunere timp de 6 h în soluția chimică verde

Parametrii utilizați au fost:

- Substrat: bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta
- Timp de reacție în soluția chimică verde: 6 h
- Temperatura de lucru: 23⁰C

Spectrul Raman (Fig. 4) arată aceleași benzi caracteristice hidroxiapatitei cristaline de la $\approx 960 \text{ cm}^{-1}$ și din intervalul 400 – 600 cm^{-1} .

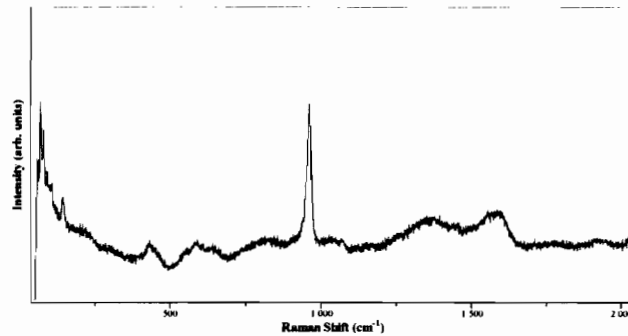


Fig. 4. Spectrul Raman al suprafeței bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție de depunere timp de 6h în soluția chimică verde

Exemplul 4. Obținerea acoperirii de hidroxiapatită după reacție de depunere timp de 24 h în soluția chimică verde

Parametrii utilizați au fost:

- Substrat: bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta
- Timp de reacție în soluția chimică verde: 24 h
- Temperatura de lucru: 23⁰C

Spectrul Raman (Fig. 5) nu înregistrează nici un fel de modificări ale benzilor caracteristice hidroxiapatitei cristaline.

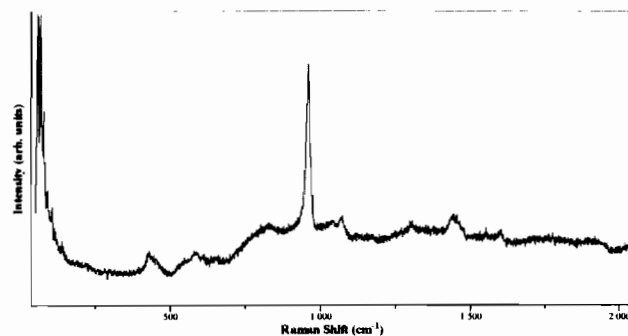


Fig. 5. Spectrul Raman al suprafeței bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție de depunere timp de 24h în soluția chimică verde

Exemplul 5. Obținerea acoperirii de hidroxiapatită după reacție de depunere timp de 48 h în soluția chimică verde

Parametrii utilizați au fost:

- Substrat: bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta

- Timp de reacție în soluția chimică verde: 48 h
- Temperatura de lucru: 23⁰C

Spectrul Raman (Fig. 6) relevă banda caracteristică hidroxiapatitei cristaline de la $\approx 960 \text{ cm}^{-1}$ cu o înălțime mai mică și cele două benzi din intervalul 400 – 600 cm^{-1} sunt mai joase și mai largi demonstrând o depunere cu un grad de cristalinitate mai mic.

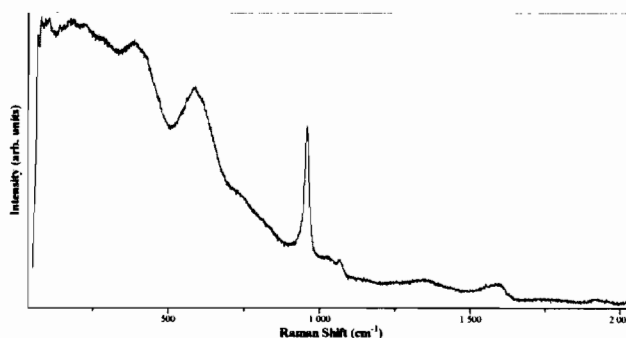


Fig. 6. Spectrul Raman al suprafeței bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție de depunere timp de 48h în soluția chimică verde

Exemplul 6. Obținerea acoperirii de hidroxiapatită după reacție de depunere timp de 72 h în soluția chimică verde

Parametrii utilizați au fost:

- Substrat: bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta
- Timp de reacție în soluția chimică verde: 72 h
- Temperatura de lucru: 23⁰C

Spectrul Raman (Fig. 7) prezintă o alură similară cu cea de la 48 h, adică acoperirea de hidroxiapatită depusă are calități mai scăzute.

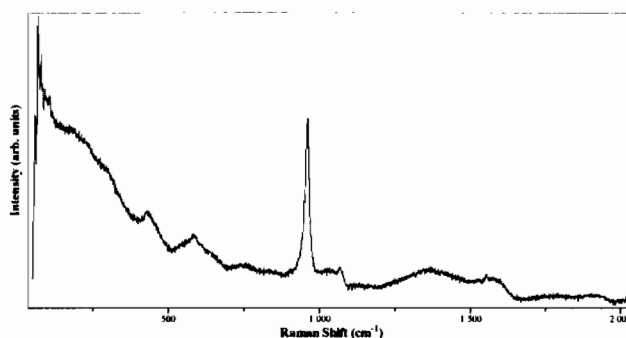


Fig. 7. Spectrul Raman al suprafeței bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție de depunere timp de 72h în soluția chimică verde

Din exemplele de mai sus a rezultat că acoperirea de hidroxiapatită obținută după 4 h de reacție în soluția de depunere este cea mai favorabilă, deoarece are cea mai bună cristalinitate și s-a obținut într-un timp foarte scurt, în urma unei reacții de depunere relativ rapide. Această

acoperire a fost analizată prin studii de difracție de raze X (XRD), de microscopie electronică de baleiaj (SEM) și de microscopie de energie dispersivă de raze X (EDX).

Cristalinitatea acoperirii de hidroxiapatită este dovedită de spectrul XRD (Fig. 8) care arată două maxime caracteristice hidroxiapatitei la $2\theta \approx 26^\circ$ și 32° , catalog JPCDS card nr. 72-1243.

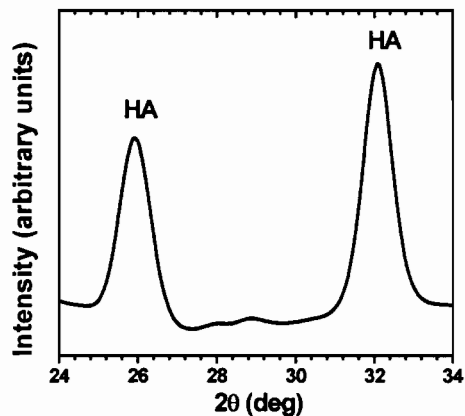


Fig. 8. Spectrul XRD asociat acoperirii de HA depusă chimic pe suprafața bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție timp de 4h în soluția chimică verde

Analiza elementală prin spectroscopie EDX (Fig. 9) a detectat prezența calciului, fosforului și oxigenului, componentele majore ale hidroxiapatitei; s-au identificat și cantități mici de sodiu din soluția de depunere, carbonul din ionul carbonat, încorporați în acoperire; de asemenea apar și elementele constitutive ale substratului metalic (Ti, Nb, Zr, Ta).

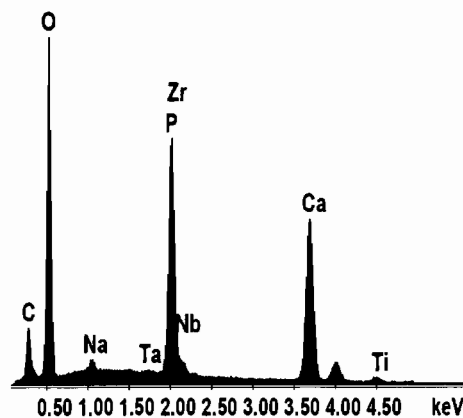


Fig. 9. Spectrul EDX asociat acoperirii de HA depusă chimic pe suprafața bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție timp de 4h în soluția chimică verde

Micrografiile SEM (Fig. 10) caracterizează morfologia și omogenitatea acoperirii; a rezultat un strat continuu cu depuneri globulare, omogene în diametru $\approx 3 \mu\text{m}$; cristalele de

hidroxiapatită formează un strat compact cu textură interconectată ce acoperă suprafața aliajului; cristalele aciculare au grosimi foarte similare de ≈ 10 nm și lungimi de ≈ 200 nm.

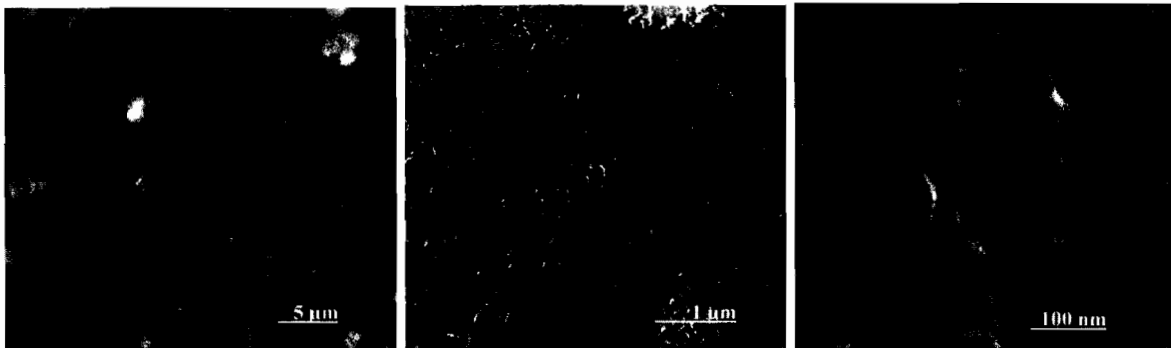


Fig. 10. Micrografii SEM pentru acoperirea de HA depusă chimic pe suprafața bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după reacție timp de 4h în soluția chimică verde

Capacitatea protectoare a acoperirii de HA s-a determinat din variația timp de 2000 ore a curentului – i_{cor} și vitezei - V_{cor} de coroziune, cantității totale de ioni eliberați – Ion release, precum și a rezistenței de polarizare - R_p ale aliajului acoperit, expus în soluție Ringer de diferite valori de pH (7,58; 8,91), care simulează condiții normale și severe de funcționare ale unui implant (Tabelul 1).

Tabelul 1. Vitezele de coroziune și Ion release pentru bioaliajul Ti-20Nb-10Zr-5Ta acoperit cu HA în comparație cu cel neacoperit în soluții Ringer, la 37°C

Material	Timp (h)	i_{cor} ($\mu A/cm^2$)	V_{cor} ($\mu m/y$)	Clasa de rezistență	Ion release (ng/cm^2)	R_p ($k\Omega.cm^2$)
Ringer pH = 7,58						
Bioaliaj neacoperit	24	0,081	0,948	PS	96,32	241
	500	0,082	0,956	PS	97,13	225
	1000	0,085	0,997	PS	101,29	219
	2000	0,118	1,392	FS	141,43	165
Bioaliaj acoperit cu HA	24	0,037	0,326	PS	33,12	475
	500	0,031	0,278	PS	28,24	504
	1000	0,027	0,231	PS	23,46	593
	2000	0,016	0,144	PS	14,63	706
Ringer pH = 8,91						
Bioaliaj neacoperit	24	0,118	1,389	FS	141,12	192
	500	0,120	1,412	FS	143,56	183
	1000	0,121	1,421	FS	144,37	173
	2000	0,133	1,573	FS	159,82	125
Bioaliaj acoperit cu HA	24	0,105	1,152	FS	95,86	196
	500	0,092	0,819	PS	83,21	242
	1000	0,073	0,643	PS	65,33	300
	2000	0,038	0,339	PS	34,44	396

Curenții și vitezele de coroziune (Tabelul 1) au valori mult mai scăzute pentru bioaliajul acoperit decât pentru cel neacoperit, demonstrând proprietățile protectoare, de barieră ale acoperirii de HA. Valorile i_{cor} și V_{cor} au scăzut, iar cele ale R_p au crescut în timp pentru bioaliajul acoperit și au avut o variație inversă pentru cel neacoperit; aceste fapte arată că acoperirea de HA s-a îngroșat în timp prin noi depuneri din soluție, îmbunătățind și funcționalizând suprafața noului bioaliaj.

Imaginile SEM (Fig. 11) ale acoperirii de HA după 2000 h de expunere în soluție Ringer arată modificări importante ale morfologiei acoperirii: nanocristalele aciculare inițiale s-au transformat în cristale sferice, rotunjite cu morfologie spongioasă, cu diametru de ≈ 60 nm indicând depuneri din soluție care au compactat acoperirea, conducând la o mai bună stabilitate pe termen lung a acesteia.

Toate rezultatele arată depunere continuă de ioni din soluție, adică acoperirea obținută se îngroașă, crește, prezintă abilități de bioactivitate, osteoinducție și osteointegrare; de asemenea a crescut capacitatea protectoare a acestei acoperiri (Tabelul 1), deci suprafața aliajului a devenit mai funcțională.

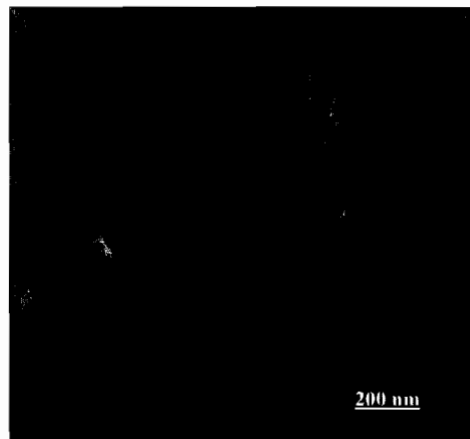


Fig. 11. Micrografie SEM pentru acoperirea de HA depusă chimic pe suprafața bioaliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta după expunere timp de 2000 h în soluție Ringer, pH = 7,58

În concluzie, procedeul original propus constă în depunerea pe suprafața (special pregătită) noului bioaliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta a unei acoperiri de hidroxiapatită prin reacție de depunere într-o soluție chimică verde suprasaturată în ioni de calciu și fosfat, timp de 4 ore la temperatura de 23°C.

REVENDICĂRI

1. Acoperire bioactivă de hidroxiapatită pe suprafața unui nou bioaliaj pentru implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta cu scopul de a-i crește rezistența la coroziune și abilitățile de osteoinducție și osteointegrare.
2. Procedeu chimic verde de obținere acoperire bioactivă de hidroxiapatită pe suprafața unui nou bioaliaj pentru implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta **conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că suprafața aliajului se pregătește prin șlefuire cu hârtie abrazivă până la suprafața oglindă, spălare 1 min. la 23°C cu apă ultrapură, uscare cu hârtie de filtru prin tamponare timp de 1 min. la 23°C.**
3. Procedeu chimic verde de obținere acoperire bioactivă de hidroxiapatită pe suprafața unui nou bioaliaj pentru implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta pregătită **conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că aliajul este degresat ultrasonic în acetonă de puritate pentru celule umane timp de 15 min. la 23°C, în baie cu ultrasunete și uscat cu hârtie de filtru prin tamponare timp de 1 min. la 23°C.**
4. Procedeu chimic verde de obținere acoperire bioactivă de hidroxiapatită pe suprafața unui nou bioaliaj pentru implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta pregătită **conform revendicărilor 2 și 3, caracterizat prin aceea că aliajul este decapat ultrasonic în soluția de decapare (2 ml HF 40%, 4 ml HNO₃ 60% la 100 ml apă, pregătită din substanțe de puritate pentru celule umane) timp de 10 min. la 23°C, în baie cu ultrasunete; apoi urmează spălarea cu jet de apă de la robinet timp de 2-3 min. la 23°C, clătirea cu apă ultrapură timp de 1 min. la 23°C, uscarea cu hârtie de filtru prin tamponare timp de 1 min. la 23°C și montarea în vasul de reacție prin suspendare cu un suport confecționat din material inert de politetrafluoretilenă (Teflon).**
5. Procedeu chimic verde de obținere acoperire bioactivă de hidroxiapatită pe suprafața unui nou bioaliaj pentru implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta pregătită **conform revendicărilor 2 - 4, caracterizat prin aceea că aliajul este imersat timp de 4 h la 23°C în soluția chimică verde obținută din substanțe de puritate pentru celule umane astfel:**
 - se prepară o soluție ce conține 0,7348 g/l CaCl₂·H₂O; se ajustează pH-ul acestei soluții până la valoarea 7,2 – 7,4 adăugându-se soluție HEPES;
 - se prepară o soluție ce conține 1,8997 g/l Na₃PO₄·12H₂O și 3,02396 g/l NaHCO₃; se ajustează pH-ul acestei soluții până la valoarea 7,2 – 7,4 adăugându-se soluție HEPES;
 - se amestecă cantități egale din cele două soluții și se verifică pH-ul care trebuie să aibă o valoare între 7,2 – 7,4; se ajustează pH-ul acestei soluții până la valoarea 7,2 – 7,4 adăugându-se soluție HEPES.

6. Procedeu chimic verde de obținere acoperire bioactivă de hidroxiapatită pe suprafața unui nou bioaliaj pentru implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta pregătită **conform revendicărilor 2 - 5, caracterizat prin aceea că** aliajul este uscat în mediul ambiant timp de 24 h la 23°C și condiționat timp de 24 h în atmosferă controlată cu umiditatea 65% și temperatura de 23°C.

7. Procedeu chimic verde de obținere acoperire bioactivă de hidroxiapatită pe suprafața unui nou bioaliaj pentru implant Ti-20Nb-10Zr-5Ta pregătită **conform revendicărilor 2 - 6, caracterizat prin aceea că** se efectuează controlul formării hidroxiapatitei cu microscopul optic și cu spectroscopul Raman pentru a identifica benzile caracteristice hidroxiapatitei cristaline.