

Sposób osadzania bioaktywnej powłoki fosforanu wapnia na elemencie wykonanym z tytanu

Przedmiotem wynalazku jest sposób osadzania bioaktywnej powłoki fosforanu wapnia na elemencie wykonanym z tytanu. Tak modyfikowane powierzchniowo elementy mogą znaleźć zastosowanie medyczne, zwłaszcza jako implanty medyczne.

Modyfikacja powierzchni nowych biomateriałów jest jedną z najbardziej rozwijanych dziedzin inżynierii materiałowej w ostatnich latach. W przypadku biomateriałów metalicznych występuje wiele problemów związanych z ich projektowaniem. Najważniejszym z nich jest odpowiedni dobór składu chemicznego, warunkujący biozgodność materiału, z jakiego wykonany jest implant w środowisku płynów ustrojowych. Postępujący rozwój cywilizacji wymaga projektowania biomateriałów metalicznych o wysokiej trwałości oraz wspomagających proces regeneracji. Założenia takie osiągnąć się poprzez nanoszenie na powierzchnie biomateriałów metalicznych powłok o składzie chemicznym zbliżonym do składu otaczających tkanek. Bioaktywne powłoki naniesione na powierzchnię implantów umożliwiają proces osteointegracji, odbudowy tkanek otaczających wszczep, mogą być źródłem pierwiastków tkankotwórczych oraz stanowić nośnik substancji leczniczych.

Tytan i jego stopy są najczęściej stosowanymi biomateriałami metalicznymi. Tytan cechuje się doskonałymi właściwościami mechanicznymi, a dzięki zdolności do samopasywacji wykazuje wysoką odporność korozyjną, w szczególności w środowisku płynów ustrojowych. Stopy tytanu są powszechnie stosowane w medycynie, zwłaszcza na implanty dentystyczne oraz implanty kręgosłupowe.

Tytan należy do pierwiastków witalnych, a tworząca się na powierzchni stopu warstwa TiO_2 tworzy powłokę ochronną [Lautenschlager E.P., Monaghan P. *Titanium and titanium alloys as dental materials*. Int.Dent.J. **43**, 245-253. 1993]. Powstałe na powierzchni stopu tlenki podwyższają stabilność powierzchni, zabezpieczają materiał podłoża przed korozją poprzez utworzenie fizycznej i chemicznej bariery na powierzchni biomateriału.

Duży wpływ na odporność korozyjną i biokompatybilność stopów ma jakość przygotowanej powierzchni, wtrącenia innych pierwiastków na powierzchni stopu oraz jednorodność mikrostruktury [Niinomi M. *Mechanical properties of biomedical titanium alloys*. Mater.Sci.Eng. **243**, 231-236. 1998]. W celu poprawy odporności korozyjnej, a w szczególności zwiększenia

bioaktywności i biozgodności, powierzchnia biomateriałów tytanowych jest modyfikowana. Modyfikacja powierzchni tytanu i jego stopów od wielu lat budzi szerokie zainteresowanie. Dużą popularnością cieszą się warstwy tlenkowe otrzymane poprzez pasywację oraz warstwy azotków tytanu i diamentopodobne. W celu poprawy odporności korozyjnej, a zarazem poprawy bioaktywności powierzchni stopów tytanu wytwarzane są powłoki apatytowe [Adamek G., Jakubowicz J. *Mechanoelectrochemical synthesis and properties of porous nano-Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite layer for biomedical applications*. *Electrochem. Commun.* **12**, 653-656. 2010]. Samopasywna warstwa TiO_2 wytworzona na powierzchni biomateriałów tytanowych wspomaga adhezję powłoki apatytowej do podłoża.

Fosforan wapnia (CaP) jest minerałem naturalnie występującym w tkance kostnej oraz w szkliwie i zębiny [Vallet R.M., Gonzalez C.J.M. *Calcium phosphates as substitution of bone tissue*. *Solid State Phenom.* **32**, 1-31. 2004]. Fosforan wapnia jest wysoce biokompatybilny, wpływa na proces osteointegracji oraz wspomaga proliferację z tkankami. Fosforan wapnia jest szeroko stosowanym materiałem ceramicznym w chirurgii, w szczególności rekonstrukcyjnej, a także w stomatologii do leczenia patologicznych kieszeni kostnych. Hydroksyapatyt stosowany jest jako podkład leczniczy wspomagający odkładanie zębiny wtórnej, a także do wypełniania ubytków niepróchniczego pochodzenia. Fosforan wapnia wspomaga leczenie nadwrażliwości zębiny i odsłoniętych szyjek zębowych [Ilewicz L. *Materiały do wypełnień we współczesnej dentyście odtwórczej*. Ośrodek wydawniczy "Augustana". Bielsko-Biała 2003]. Hydroksyapatyt jest też składnikiem past do zębów, chroniąc przed chorobami przyzębia oraz kamieniem nazębnym [Tschoppe P., Zendim P.L., Mertus P., Kielbassa A.M. *Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes*. *J.Dent.* **39**, 430-437. 2011].

Powłoki fosforanów wapnia mogą być nanoszone na powierzchnię biomateriałów na drodze natryskiwania plazmowego, poprzez namaczanie w symulowanych roztworach płynów ustrojowych oraz roztworach zawierających jony fosforu i wapnia, poprzez osadzanie elektroforetyczne oraz osadzanie na drodze elektrodukcji, a także metodą zol-żel [Sunarso R.T., Tsuru K., Ishikawa K. *Immobilization of calcium and phosphate ions improves the osteoconductivity of titanium implants*. *Mat.Sci.Eng.* **68**, 291-298. 2016; Bral A., Maurice Y., Mommaerts M.Y. *In vivo biofunctionalization of titanium patient-specific implants with nano hydroxyapatite and other nano calcium phosphate coatings: A systematic review*. *J. Cranio. Maxill. Surg.* **44**, 400-412. 2016; Bakin B., Koc Delice T., Tiric U., Birlik I., Azem F. *Bioactivity and corrosion properties of magnesium-substituted CaP coatings produced via electrochemical deposition*. *Surf.Coat.Tech.* **301**, 29-35. 2016; Ribeiro A.A., Balestra R.M., Rocha M.N., Peripolli S.B., Andrade M.C., Pereira L.C., Oliveira M.V. *Dense and porous titanium substrates with a biomimetic calcium phosphate coating*, *Appl.Surf.Sci.* **265**, 250-256. 2013; Montero-Ocampo C.,

Villegas D., Veleva L. *Electrochemical assisted deposition of calcium phosphate coatings for orthopaedic applications*. Surf.Eng. **24**, 18-22. 2008]. Powłoki apatytowe nanoszone poprzez natryskiwanie plazmowe niosą ze sobą ryzyko rozpadu hydroksyapatytu, a obecnie w powszechnej sprzedaży znajdują się protezy pokrywane bioaktywnymi powłokami fosforanów wapnia otrzymywanymi w ten sposób.

Znany jest z polskiego zgłoszenia patentowego nr 316809 sposób nanoszenia powłoki na powierzchnię implantów biomedycznych, polegający na tym, że na odtłuszczonej powierzchni implantu nanosi się drogą elektroforezy zawiesiny cząstek węgla i hydroksyapatytu o średnicy poniżej 0,5 μm w alkoholu, przy czym stosunek ilościowy cząstek węgla do cząstek hydroksyapatytu wynosi od 1:1 do 1:5, a zawartość fazy stałej w alkoholu wynosi 3-5% wagowych. Osadzanie na drodze elektroforezy prowadzi się korzystnie przy napięciu 5-10 V w czasie 20-30 sekund, a otrzymaną powłokę poddaje się suszeniu. Metoda ta, podobnie jak metoda nanoszenia plazmowego, wymaga zasilaczy wysokoprądowych oraz wysokich temperatur wynikających z konieczności spiekania powłoki z podłożem.

Powłoki fosforanów wapnia na implantach medycznych można nanosić również metodą zol-żel. Znany jest przykładowo sposób otrzymywania stabilnych roztworów do osadzania cienkich warstw fosforanów wapnia, metodą zol-żel, zgodnie z patentem nr PL190484B1, który polega na tym, że syntezuje się estry kwasu ortofosforowego, rozpuszczając P_2O_5 w alkoholu lub mieszaninie alkoholi przy intensywnym mieszaniu przez około 24 godziny, po czym w powstałym roztworze zawierającym estry kwasu ortofosforowego rozpuszcza się metaliczny wapń, który reaguje po około 150 godzinach mieszania, tworząc alkoholany wapnia, przy czym P_2O_5 i Ca wzięte są w takich ilościach, aby stosunek molowy Ca : P wynosił do 2. Jako rozpuszczalnik alkoholowy stosuje się 2-metoksyetanol lub jego mieszaninę z etanolem i/lub metanolem i/lub izopropanolem i/lub butanolem. Wadą powłok nanoszonych na drodze zol-żel jest konieczność spiekania powłok w wysokiej temperaturze, co może powodować powstawanie defektów w tytanie oraz zwiększyć kruchość powłoki.

Znany jest także sposób otrzymywania warstw fosforanów wapnia, w szczególności hydroksyapatytu, zgodnie z patentem nr PL180602B1, polegający na tym, że do wodnego roztworu zolu otrzymanego przez rozpuszczenie 7,5 g kwasu askorbinowego w 150 ml 1,46 M octanu wapniowego, do którego dodaje się 8,9 ml 85% kwasu fosforowego, doprowadza się pH zolu do wartości pH 7-10, następnie zol miesza się przez 2 minuty ultradźwiękami, rozcieńcza dwukrotnie alkoholem etylowym i ponownie miesza się w czasie 5 min ultradźwiękami, po czym zanurza się w zolu kształtki przeznaczone do pokrycia, wykonane ze srebra, tytanu, niklu lub stali nierdzewnej, następnie kształtki te po wyciągnięciu z zolu poddaje się starzeniu w temperaturze 20 °C, a potem obróbce termicznej w piecu w temperaturze: 50 °C-100 °C, następnie w temperaturze 110 °C-180

°C, oraz w temperaturze 200 °C, wygrzewanie prowadzi się początkowo z prędkością 1 °C/min, do temperatury 400 °C, w której przetrzymuje się kształtki przez okres 1 godz., następnie z szybkością 5 °C/min doprowadza się temperaturę do 800-950 °C i przetrzymuje się kształtki przez okres 1 godz., po czym kształtki schładza się do temperatury pokojowej z szybkością 1-5 °C/min. Jednak konieczność wyprażenia wytworzonej powłoki fosforanu wapnia na powierzchni elementu wykonanego ze stopu Ni-Ti z pamięcią kształtu, prowadzić może do rozpadu fazy macierzystej. W wyniku rozkładu termicznego otrzymanej powłoki może dochodzić do powstawania różnych form, na przykład bezpostaciowego hydroksyapatytu, α i β trójfosforanów wapnia TCP, CaO, P₂O₅ itp., czego następstwem będzie niejednorodny skład chemiczny i struktura warstw, prowadzące do obniżenia trwałości pokryć. Różnica we współczynnikach rozszerzalności cieplnej stopu i hydroksyapatytu w trakcie studzenia może dodatkowo powodować mikropęknięcie wytworzonych warstw.

Metoda nanoszenia powłok fosforanu wapnia na drodze elektrodukcji z roztworu daje możliwość osadzania cienkich powłok bez konieczności spiekania wytworzonych warstw. Jest również ekonomiczna, gdyż nie wymaga stosowania wysokich napięć, a pominięcie procesu spiekania warstwy fosforanu wapnia z podłożem ogranicza wprowadzanie niepożądanych zmian w strukturze materiału i otrzymanej powłoki [Adamek G., Jakubowicz J. *Mechanoelectrochemical synthesis and properties of porous nano-Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite layer for biomedical applications*. *Electrochem. Commun.* **12**, 653-656. 2010].

W zależności od stosunku molowego wapnia do fosforu występują różne odmiany fosforanów wapnia. Różnice pomiędzy fosforanami wapnia wynikają z miejsca, w którym dany fosforan występuje w organizmie. W zębinie stosunek molowy Ca : P wynosi poniżej 1,67, natomiast dla tkanki kostnej - powyżej 1,67. Fosforany wapnia o różnej strukturze krystalograficznej można otrzymać poprzez zmianę pH kąpieli oraz potencjału, przy którym otrzymywane są powłoki.

Powłoki fosforanów wapnia osadzane były dotychczas z kąpieli azotanowej o składzie: 0,042M Ca(NO₃)₂ + 0,025M (NH₄)₂HPO₄ + 0,1M HCl; dodatek 0,1M HCl powoduje rozpuszczanie poszczególnych składników kąpieli [Adamek G., Jakubowicz J. *Mechanoelectrochemical synthesis and properties of porous nano-Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite layer for biomedical applications*. *Electrochem. Commun.* **12**, 653-656. 2010]. Jednak takie powłoki charakteryzują się niejednorodną strukturą. Powłoki fosforanowe osadzano również z kąpieli chlorkowej o składzie: 0,167M CaCl₂ + 0,1M NH₄H₂PO₄ + 0,1M NaCl [Isa N.N.C., Mohd Y., Youry N. *Electrochemical deposition and characterization of hydroxyapatite (HAp) on titanium substrate*. *APCBEE Procedia* **3**, 46-52. 2012]. Chlorek sodu obecny w kąpieli chlorkowej osadzany jest wraz z fosforanem

wapnia na powierzchni biomateriału. Nadmiar chlorku sodu wpływa jednak niekorzystnie na gospodarkę wodną organizmu oraz podwyższa ciśnienie tętnicze.

Celem twórców niniejszego wynalazku było opracowanie takiego sposobu osadzania powłok fosforanu wapnia na elemencie wykonanym z tytanu, który pozbawiony będzie słabych stron znanych dotychczas sposobów i pozwoli zwiększyć biokompatybilność tytanu oraz poprawić odporność korozyjną implantów tytanowych w środowisku płynów ustrojowych.

Istotę niniejszego wynalazku stanowi sposób osadzania bioaktywnej powłoki fosforanu wapnia na elemencie wykonanym z tytanu, polegający na tym, że do wodnej kąpeli octanowej o pH obojętnym, na którą składa się od 0,0167M do 0,030M $C_4H_6CaO_4$, od 0,01M do 0,018M $(NH_4)HPO_4$, od 0,01M do 0,05M $C_6H_8O_7$ oraz od 0,037M do 0,074M NH_4Cl wprowadza się element wykonany z tytanu stanowiący elektrodę Ti i przetrzymuje się w kąpeli, korzystnie w temperaturze pokojowej, do czasu ustabilizowania potencjału elektrody Ti, korzystnie za pomocą metody potencjału obwodu otwartego (ang. *Open Circuit Potential*, E_{OC}). Po ustabilizowaniu potencjału elektrody Ti poddaje się ją procesowi elektroredukcji z roztworu, prowadzonemu w tej samej wodnej kąpeli octanowej, korzystnie w temperaturze pokojowej, przy wartości potencjału wybranej z zakresu od $-1,5$ do -10 V względem potencjału obwodu otwartego, korzystnie w czasie od 10 do 60 minut, czego wynikiem jest osadzenie powłoki fosforanu wapnia na elektrodzie Ti.

Korzystnie, przed wprowadzeniem elementu tytanowego do kąpeli octanowej, element ten poddaje się wstępnej chemicznej aktywacji powierzchni, najkorzystniej poprzez zanurzenie w słabo stężonym, korzystnie 4-5% wodnym roztworze NaOH lub KOH, w czasie kilku, korzystnie 5 minut.

Tak otrzymany element z osadzoną powłoką fosforanu wapnia suszy się, korzystnie na powietrzu, korzystnie w temperaturze pokojowej, do czasu uzyskania białej barwy powłoki, co zwykle następuje po około 1 h suszenia.

Do ustawienia pożądanej wartości potencjału wykorzystuje się potencjostat.

Dodatek $C_6H_8O_7$ wpływa na poprawę rozpuszczalności głównych składników kąpeli, to jest: $C_4H_6CaO_4$, i $(NH_4)HPO_4$. Taka zawartość składników kąpeli gwarantuje odpowiedni stosunek wapnia do fosforu wynoszący korzystnie 1,67. Dodatek NH_4Cl wpływa na poprawę konduktywności kąpeli.

Konieczność przeprowadzenia procesu stabilizacji potencjału elektrody wynika z faktu, że w elektrochemicznych pomiarach zaraz po zanurzeniu elektrody metalicznej w roztworze, potencjał elektrody nie jest stabilny. Jego wartość zmienia się w czasie, w wyniku ustalania się równowagi jonowo-elektronowej. W zależności od rodzaju elektrody i rodzaju roztworu stabilizacja trwa od kilkunastu minut do kilkunastu godzin. W czasie stabilizowania się potencjału

można mierzyć jego zmieniające się wartości bez przykładania zewnętrznego źródła prądu. Pomiar odbywa się w tzw. otwartej pętli potencjostatu (warunki bezprądowe) – jest to metoda potencjału obwodu otwartego. Ustabilizowanie potencjału elektrody jest warunkiem wymaganym do przeprowadzania jakichkolwiek pomiarów elektrochemicznych. Jeśli potencjał elektrody zmienia się w czasie, w trakcie pomiaru panują warunki metastabilne.

W sposobie według niniejszego wynalazku proces stabilizacji potencjału elektrody Ti prowadzi się w celu wytworzenia na powierzchni elektrody Ti stabilnej i samopasywnej warstwy tlenku tytanu – TiO_2 . Tlenek tytanu stanowi dodatkową funkcję ochronną tytanu. Powstałe na powierzchni tytanu tlenki podwyższają stabilność implantu poprzez zabezpieczenie powierzchni przed korozją oraz utworzenie fizycznej i chemicznej bariery na powierzchni materiału. Powstały tlenek TiO_2 w postaci rutyłu na powierzchni elektrody Ti ma inny skład chemiczny od materiału podłoża, posiada również inne właściwości, ułatwiając tym samym proliferację komórek, czyli poprawę funkcji życiowej komórek. Pomiary potencjału przeprowadza się w układzie trójelektrodowym, gdzie elektroda Ti stanowi elektrodę pracującą (katodę), przeciwelektrodę (anodę) stanowi elektroda z materiału odpornego na utlenianie, korzystnie z platyny lub ze stopu platyny, zwłaszcza stopu platyna-iryd lub platyna-rod, a elektrodę referencyjną, to jest elektrodę o znanym i stabilnym potencjale, stanowi elektroda odpowiednia do badań w roztworach obojętnych, korzystnie nasycona elektroda kalomelowa ($Hg|Hg_2Cl_2|Cl$) lub chlorosrebrowa ($Ag|AgCl|Cl$).

Warunki potencjostatycznego osadzania fosforanu wapnia dobiera się na podstawie krzywych polaryzacji katodowej wyznaczonych dla elementu tytanowego zanurzonego w kąpeli octanowej. Korzystnie powłoki fosforanowe otrzymuje się przy potencjale nieprzekraczającym -4 V względem E_{OC} , najkorzystniej przy potencjale -3 V względem E_{OC} , korzystnie w czasie nieprzekraczającym 30 minut.

Sposób otrzymywania powłoki fosforanu wapnia według wynalazku zostanie bliżej objaśniony na poniższych przykładach oraz na rysunkach, na których fig. 1 przedstawia krzywą polaryzacji katodowej w procesie osadzania fosforanów wapnia z kąpeli octanowej (I) na podłożu Ti; fig. 2 przedstawia potencjał obwodu otwartego dla elektrody Ti w kąpeli octanowej (I); fig. 3 przedstawia gęstość prądową w funkcji czasu w procesie osadzania powłok fosforanu wapnia na powierzchni tytanu z kąpeli octanowej (I) przy potencjale -3 V względem E_{OC} ; fig. 4 przedstawia obraz SEM (a-d) dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na powierzchni tytanu z kąpeli octanowej (I) przy potencjale -3 V w czasie 30 minut; fig. 5 przedstawia widmo EDS dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na powierzchni tytanu z kąpeli octanowej (I) przy potencjale -3 V w czasie 30 minut; tabela 1 przedstawia wyniki uśrednionego składu chemicznego dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na powierzchni tytanu z kąpeli octanowej (I) przy potencjale -3 V

przez 30 min; fig. 6 przedstawia długoterminowe pomiary potencjału obwodu otwartego dla elektrody Ti w roztworze Ringer'a w temp. 37 °C; fig. 7 przedstawia diagramy Bode w postaci logarytmu modułu impedancji w funkcji czasu (a) i kąta przesunięcia fazowego w funkcji czasu (b) w długoterminowych badaniach *in vitro* odporności korozyjnej elektrody Ti w roztworze Ringer'a w temp. 37 °C; fig. 8 przedstawia zależność logarytmu modułu impedancji przy częstotliwości 1 mHz w funkcji czasu w długoterminowych badaniach *in vitro* odporności korozyjnej elektrody Ti w roztworze Ringer'a w temp. 37 °C; fig. 9. przedstawia dyfraktogram dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 min; tabela 2 przedstawia parametry pracy komory solnej w badaniach odporności korozyjnej próbek tytanowych z naniesioną powłoką fosforanu wapnia osadzoną z kąpieli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 minut na działanie obojętnej mgły solnej według normy PN-EN ISO 9227:2012 - metoda NSS; fig. 10 przedstawia obraz SEM dla powłoki fosforanu wapnia na powierzchni tytanu otrzymanej z kąpieli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 minut przed badaniami w komorze solnej (a-b) i po badaniach w komorze solnej (c-d); fig. 11 przedstawia widmo EDS dla powłoki fosforanu wapnia na powierzchni tytanu otrzymanej z kąpieli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 minut po badaniach w komorze solnej; tabela 3 przedstawia wyniki uśrednionego składu chemicznego dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 min po badaniu w komorze solnej; fig. 12 przedstawia obraz SEM dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na sterylizowanej powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (II) przy potencjale -1,5 V w czasie 10 minut (a-b), 20 minut (c-d), 30 minut (e-f), 40 minut (g-h); fig. 13 przedstawia widmo EDS dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na sterylizowanej powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (II) przy potencjale -1,5 V w czasie 30 minut; tabela 4 przedstawia wyniki uśrednionego składu chemicznego dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na sterylizowanej powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (II) przy potencjale -1,5 V w czasie 30 minut; fig. 14 przedstawia obraz SEM dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na piaskowanej powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (II) przy potencjale -10 V w czasie 20 minut (a-b), 30 minut (c-d), 40 minut (e-f); fig. 15 przedstawia widmo EDS dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na piaskowanej powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (II) przy potencjale -10 V w czasie 30 minut; tabela 5 przedstawia wyniki uśrednionego składu chemicznego dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej na piaskowanej powierzchni tytanu z kąpieli octanowej (II) przy potencjale -10 V w czasie 30 minut; fig. 16 przedstawia długoterminowe pomiary potencjału obwodu otwartego dla elektrody Ti po procesie piaskowania w roztworze Ringer'a w temp. 37 °C; fig. 17 przedstawia zależność logarytmu modułu impedancji przy częstotliwości 1 mHz w funkcji czasu w długoterminowych badaniach *in vitro* odporności korozyjnej elektrody Ti po procesie piaskowania w roztworze Ringer'a w temp. 37 °C; tabela 6

przedstawia parametry pracy komory solnej w badaniach odporności korozyjnej próbek tytanowych po procesie piaskowania z powłoką fosforanu wapnia osadzoną z kąpeli octanowej (II) przy potencjale -10 V przez 30 minut na działanie obojętnej mgły solnej według normy PN-EN ISO 9227:2012 - metoda NSS; fig. 18 przedstawia obraz SEM dla powłoki fosforanu wapnia na powierzchni tytanu po procesie piaskowania otrzymanej z kąpeli octanowej (II) przy potencjale -10 V przez 30 minut przed badaniami w komorze solnej (a-b), po badaniach w komorze solnej (c-d); fig. 19 przedstawia widmo EDS dla powłoki fosforanu wapnia na powierzchni tytanu po procesie piaskowania otrzymanej z kąpeli octanowej (II) przy potencjale -10 V przez 30 minut po badaniach w komorze solnej; tabela 7 przedstawia wyniki uśrednionego składu chemicznego dla powłoki fosforanu wapnia na powierzchni tytanu po procesie piaskowania otrzymanej z kąpeli octanowej (II) przy potencjale -10 V przez 30 minut po badaniu w komorze solnej.

Przykład 1

Elektrodę wykonaną z tytanu o czystości technicznej poddano aktywacji chemicznej przez 5 minut w 4% wodnym roztworze NaOH. Warunki potencjostatycznego osadzania fosforanu wapnia dobrano na podstawie krzywej polaryzacji katodowej dla elektrody tytanowej (fig. 1) zanurzonej w kąpeli octanowej (I) o składzie chemicznym: $0,0167\text{M}$ $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$, $0,01\text{M}$ $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, $0,01\text{M}$ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ i $0,037\text{M}$ NH_4Cl . Dodatek $0,01$ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ wpływał na poprawę rozpuszczalności składników kąpeli. Dodatek $0,037\text{M}$ NH_4Cl poprawiał konduktywność roztworu. Stosując 30%-owy roztwór NH_3 wyregulowano pH kąpeli do wartości $\text{pH}=7,0 \pm 0,1$. Następnie elektrodę Ti stabilizowano przez 1000 s za pomocą metody potencjału obwodu otwartego w kąpeli octanowej (I) (fig. 2). Powłoki fosforanu wapnia osadzano w tej samej kąpeli octanowej (I) metodą elektroredukcji z roztworu w temperaturze pokojowej ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Osadzanie prowadzono w układzie trójelektrodowym przy potencjale wynoszącym -3 V względem ustabilizowanej wartości E_{OC} . Stosowano czas osadzania 10, 20, 30 i 40 minut (fig. 3). W trakcie procesu osadzania próbka tytanowa stanowiła elektrodę pracującą o powierzchni badanej 1 cm^2 , przeciwelektrodą była siatka platynowa o powierzchni 10 cm^2 , elektrodę referencyjną zastosowano w postaci nasyconej elektrody kalomelowej ($\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{Cl}$). Po zakończeniu procesu osadzania fosforanu wapnia próbki suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę do czasu uzyskania białej barwy powłoki.

Najkorzystniejsze parametry procesu osadzania powłoki fosforanu wapnia na podłożu Ti stwierdzono przy potencjale -3 V względem ustabilizowanej wartości E_{OC} i czasie 30 minut, przy których otrzymano powłokę o dużej ciągłości. Grubość otrzymanej powłoki wyznaczono za pomocą amplitudowo czulej metody prądów wirowych. Przed pomiarem urządzenie zostało skalibrowane przy użyciu wzorców w postaci folii o grubościach $24,7\text{ }\mu\text{m} \pm 0,4\text{ }\mu\text{m}$ i $48,8\text{ }\mu\text{m} \pm 0,4$

μm oraz podłoża Ti, na które nakładano powłoki. Grubość osadzonej powłoki fosforanu wapnia wynosiła $11,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$.

Badanie morfologii powierzchni i mikrostruktury otrzymanej powłoki wykonano za pomocą metody skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM). Analiza otrzymanych wyników wykazała równomierne rozłożenie cząstek fosforanu wapnia na powierzchni tytanu (fig. 4 a-d). Analizę składu chemicznego w mikroobszarach badanej powłoki fosforanu wapnia osadzonej z kąpeli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 min na podłożu tytanowym określono metodą spektroskopii dyspersji energii (ang. *Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS). Mikroanalizę wykonano w pięciu mikroobszarach (fig. 5). Analiza widm EDS potwierdziła obecność składników osadzonej powłoki w postaci wapnia, fosforu i tlenu. Uzyskane wyniki wykazały również obecność pików pochodzących od tytanu. Uśredniony skład chemiczny próbki przedstawiono w tabeli 1.

Elektrodę wykonaną z tytanu poddano długoterminowym badaniom *in vitro* odporności korozyjnej w odpowiedzonym roztworze Ringer'a o pH obojętnym w temperaturze $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Badania elektrochemiczne prowadzono w układzie trójelektrodowym z katodą w postaci badanej elektrody Ti, anodą w formie siatki platynowej o powierzchni 4 cm^2 i elektrodą referencyjną w postaci nasyconej elektrody kalomelowej ($\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{Cl}^-$). Elektroda referencyjna wprowadzona została do kąpeli za pomocą kapilary Ługgina. Stosowano metodę potencjału obwodu otwartego oraz metodę elektrochemicznej spektroskopii impedancji (ang. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS). Czas ekspozycji elektrody w roztworze Ringer'a wynosił 21 dni. Potencjał obwodu otwartego zmieniał się dynamicznie przez pierwsze 7 dni. Przez kolejne 14 dni potencjał zmieniał się około $0,001 \text{ V}$ aż do wartości $-0,071 \text{ V}$ w 21 dniu ekspozycji (fig. 6). Uzyskane dane EIS przedstawiono na diagramach Bode (fig. 7 a i b). Wartość $\log |Z|$ przy częstotliwości $f=1 \text{ mHz}$ zmieniała się dynamicznie przez pierwsze 14 dni od $3,54 \Omega \text{ cm}^2$ w pierwszym dniu do $3,62 \Omega \text{ cm}^2$ w 14 dniu, co świadczy o wzroście odporności korozyjnej badanej elektrody. Przez kolejne 7 dni testu wartość $\log |Z|$ ulegała nieznacznym zmianom i w 21 dniu zanurzenia elektrody wynosiła $3,65 \Omega \text{ cm}^2$ (fig. 8).

Rentgenowska jakościowa analiza fazowa wykonana metodą stałego kąta padania (SKP) potwierdziła obecność powłoki fosforanu wapnia osadzonej z kąpeli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 minut na powierzchni tytanu (fig. 9). Zidentyfikowano odmianę $\text{Ca}_9\text{O}_7\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - amorficzny fosforan wapnia (ang. *Amorphous Calcium Phosphate*, ACP). O amorficzności osadzonej powłoki świadczy poszerzenie linii dyfrakcyjnej w położeniu około 30 stopni.

Cztery próbki wykonane z tytanu o czystości technicznej z naniesioną powłoką fosforanu wapnia osadzoną z kąpeli octanowej (I) przy potencjale -3 V przez 30 minut poddano akredytowanym badaniom odporności korozyjnej na działanie obojętnej mgły solnej według normy

PN-EN ISO 9227:2012 - metoda NSS (ang. *Neutral Salt Spray Test*). Czas badania próbek wynosił 24 h. Parametry pracy komory solnej przedstawione zostały w tabeli 2. Przed i po teście NSS wykonano badanie morfologii powierzchni i mikrostruktury badanych powłok fosforanu wapnia za pomocą SEM (fig. 10 a-d). Analizę lokalnego składu chemicznego powłoki fosforanu wapnia po badaniu w komorze solnej określono metodą EDS. Mikroanalizę wykonano w pięciu mikroobszarach (fig. 11). Uśredniony skład chemiczny badanej próbki przedstawiono w tabeli 3. Analiza widm EDS potwierdziła obecność składników osadzonej powłoki w postaci wapnia i fosforu, jednak natężenie pików pochodzących od składników powłoki jest mniejsze w porównaniu do widm EDS uzyskanych dla powłoki fosforanu wapnia przed niszczącym testem NSS (fig. 5). Uzyskane widma EDS wykazały również obecność pików pochodzących od tytanu. Otrzymane wyniki potwierdzają, że rozpuszczanie oraz pękanie otrzymanych powłok fosforanu wapnia następuje po 24 h przebywania w sztucznej atmosferze obojętnej mgły solnej.

Przykład 2

Elektrodę wykonaną z tytanu o czystości technicznej poddano procesowi sterylizacji w autoklawie parowym w temperaturze 134 °C pod ciśnieniem 2 barów przez 30 minut, a następnie przeprowadzono aktywację powierzchni sterylizowanej elektrody Ti w 5% wodnym roztworze NaOH przez 6 minut. Elektrodę tytanową stabilizowano przez 1100 s za pomocą metody potencjału obwodu otwartego w kąpeli octanowej (II) o składzie chemicznym: 0,030M $C_4H_6CaO_4$, 0,018M $(NH_4)HPO_4$, 0,05M $C_6H_8O_7$ oraz 0,074M NH_4Cl . Dodatek 0,05 $C_6H_8O_7$ wpływał na poprawę rozpuszczalności składników kąpeli. Dodatek 0,074M NH_4Cl poprawiał przewodność roztworu. Stosując 30%-owy roztwór NH_3 wyregulowano pH kąpeli do wartości $pH=7,0 \pm 0,1$. Następnie przeprowadzono osadzanie powłok fosforanu wapnia na drodze elektroredukcji z roztworu w tej samej kąpeli octanowej (II) w temperaturze pokojowej ($22 \pm 2^\circ C$). Powłoki osadzano przy potencjale $-1,5$ V względem E_{OC} przez 10, 20, 30 i 40 minut. W trakcie procesu osadzania stosowano układ trójelektrodowy, w którym sterylizowana elektroda tytanowa stanowiła elektrodę pracującą o powierzchni badanej $1,8$ cm^2 , przeciwelektrodą była folia platynowa o powierzchni 8 cm^2 , a elektrodę referencyjną zastosowano w postaci elektrody $Hg|Hg_2Cl_2|Cl^-$. Elektrodę referencyjną wprowadzono do kąpeli za pomocą kapilary Luggina. Po zakończeniu procesu osadzania fosforanu wapnia każdą próbkę suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę do czasu uzyskania białej barwy powłoki.

Najkorzystniejszy czas procesu osadzania powłoki fosforanu wapnia na podłożu Ti przy potencjale $-1,5$ V stwierdzono dla 30 minut, przy którym otrzymano powłokę o dużej ciągłości. Grubość powłoki otrzymanej w tych warunkach elektrochemicznych wynoszącą $0,7 \pm 0,1$ μm wyznaczono za pomocą amplitudowo czułej metody prądów wirowych. Przed pomiarem

urządzenie zostało skalibrowane przy użyciu wzorców w postaci folii o grubościach $24,7 \mu\text{m} \pm 0,4 \mu\text{m}$ i $48,8 \mu\text{m} \pm 0,4 \mu\text{m}$ oraz podłoża Ti, na które nakładano powłoki.

Badanie morfologii powierzchni i mikrostruktury powłoki otrzymanej przy potencjale $-1,5 \text{ V}$ w czasie 30 minut wykonano za pomocą SEM. Analiza otrzymanych wyników wykazała równomierne rozłożenie cząstek fosforanu wapnia na powierzchni tytanu (fig. 12 a-h). Analizę składu chemicznego w mikroobszarach badanej powłoki fosforanu wapnia określono metodą EDS. Mikroanalizę wykonano w pięciu mikroobszarach (fig. 13). Analiza widm EDS potwierdziła obecność składników osadzonej powłoki w postaci wapnia i fosforu. Analiza EDS wykazała również obecność pików pochodzących od tytanu. Uśredniony skład chemiczny próbki przedstawiono w tabeli 4.

Przykład 3

Próbkę wykonaną z tytanu o czystości technicznej poddano procesowi piaskowania i przygotowano elektrodę, którą poddano aktywacji powierzchni w 5% wodnym roztworze KOH przez 7 minut. Następnie elektrodę stabilizowano przez 1200 s za pomocą metody potencjału obwodu otwartego w kąpeli octanowej (II) o składzie chemicznym: $0,030 \text{ M C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$, $0,018 \text{ M (NH}_4\text{)HPO}_4$, $0,05 \text{ M C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ oraz $0,074 \text{ M NH}_4\text{Cl}$. Dodatek $0,05 \text{ C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ wpływał na poprawę rozpuszczalności składników kąpeli. Dodatek $0,074 \text{ M NH}_4\text{Cl}$ poprawiał konduktywność roztworu. Stosując 30%-owy roztwór NH_3 wyregulowano pH kąpeli do wartości $\text{pH}=7,0 \pm 0,1$. Osadzanie powłok fosforanu wapnia przeprowadzono na drodze elektroredukcji z roztworu w temperaturze pokojowej ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) w tej samej kąpeli octanowej (II). Powłoki osadzano przy potencjale -10 V względem potencjału obwodu otwartego E_{OC} przez 20, 30 i 40 minut. Powłoki osadzano w układzie trójelektrodowym, w którym próbka z piaskowanego tytanu stanowiła elektrodę pracującą o powierzchni badanej $1,3 \text{ cm}^2$, przeciwelektrodą była siatka platynowa o powierzchni 10 cm^2 , a elektrodę referencyjną zastosowano w postaci elektrody $\text{Hg|Hg}_2\text{Cl}_2|\text{Cl}^-$. Elektrodę referencyjną wprowadzono do kąpeli za pomocą kapilary Luggina. Po zakończeniu procesu osadzania fosforanu wapnia każdą próbkę suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę do czasu uzyskania białej barwy powłoki.

Najkorzystniejszy czas procesu osadzania powłoki fosforanu wapnia na piaskowanym podłożu Ti przy potencjale -10 V stwierdzono dla 30 minut, przy którym otrzymano powłokę o dużej ciągłości. Grubość otrzymanej powłoki wynoszącą $20,1 \pm 0,9 \mu\text{m}$ wyznaczono za pomocą amplitudowo czulej metody prądów wirowych. Przed pomiarem urządzenie zostało skalibrowane przy użyciu wzorców w postaci folii o grubościach $24,7 \mu\text{m} \pm 0,4 \mu\text{m}$ i $48,8 \mu\text{m} \pm 0,4 \mu\text{m}$ oraz podłoża Ti, na które nakładano powłoki.

Badanie morfologii powierzchni i mikrostruktury otrzymanych powłok fosforanu wapnia osadzonych na piaskowanej powierzchni tytanu z kąpeli octanowej (II) przy potencjale -10 V w czasie 20, 30 i 40 minut wykonano za pomocą SEM. Analiza otrzymanych wyników wykazała równomierne rozłożenie cząstek fosforanu wapnia na powierzchni tytanu (fig. 14 a-h). Analizę lokalnego składu chemicznego dla powłoki fosforanu wapnia osadzonej z kąpeli octanowej (II) przy potencjale -10 V przez 30 min na podłożu tytanowym określono metodą EDS. Mikroanalizę wykonano w pięciu mikroobszarach (fig. 15). Analiza wyników EDS potwierdziła obecność składników w osadzonej powłoce cząstek w postaci wapnia i fosforu. Uzyskane wyniki wykazały również obecność pików pochodzących od tytanu. Uśredniony skład chemiczny próbki przedstawiono w tabeli 5.

Elektrodę wykonaną z piaskowanego tytanu poddano długoterminowym badaniom *in vitro* odporności korozyjnej w roztworze Ringer'a o pH obojętnym w temperaturze 37 ± 2 °C. Badania elektrochemiczne prowadzono w układzie trójelektrodowym z katodą w postaci badanej elektrody Ti, anodą w formie siatki platynowej o powierzchni 4 cm^2 i elektrodą referencyjną w postaci nasyconej elektrody kalomelowej ($\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{Cl}^-$). Elektroda referencyjna wprowadzona została do kąpeli za pomocą kapilary Luggina. Stosowano metodę potencjału obwodu otwartego oraz metodę EIS. Czas ekspozycji elektrody Ti w roztworze Ringer'a wynosił 21 dni. Potencjał obwodu otwartego zmieniał się dynamicznie przez pierwsze 14 dni. Przez kolejne 7 dni potencjał zmieniał się około $0,002\text{V}$ aż do wartości $-0,068\text{V}$ w 21 dniu ekspozycji (fig. 16). Wartość logarytmu modułu impedancji przy częstotliwości $f=1$ MHz zmieniała się dynamicznie przez pierwsze 14 dni wynosząc odpowiednio $3,60 \Omega\text{cm}^2$ w pierwszym dniu i $3,53 \Omega\text{cm}^2$ w 7 dniu ekspozycji. Przez kolejne 7 dni wartość $\log |Z|$ ulegała nieznacznym zmianom i w 21 dniu zanurzenia elektrody wynosiła $3,51 \Omega\text{cm}^2$ (fig. 17).

Cztery próbki wykonane z tytanu po procesie piaskowania z powłoką fosforanu wapnia osadzoną z kąpeli octanowej (II) przy potencjale -10 V przez 30 minut poddano akredytowanym badaniom odporności korozyjnej na działanie obojętnej mgły solnej według normy PN-EN ISO 9227:2012 - metoda NSS. Czas badania powłok wynosił 24 h. Parametry pracy komory solnej przedstawione zostały w tabeli 6. Przed i po teście wykonano badanie morfologii powierzchni i mikrostruktury badanych powłok fosforanu wapnia za pomocą SEM (fig. 18 a-d). Analizę lokalnego składu chemicznego powłoki fosforanu wapnia po badaniu w komorze solnej określono metodą EDS. Mikroanalizę wykonano w pięciu mikroobszarach (fig. 19). Uśredniony skład chemiczny badanej próbki przedstawiono w tabeli 7. Analiza widm EDS potwierdziła obecność składników osadzonej powłoki w postaci wapnia i fosforu, jednak natężenie pików pochodzących od składników powłoki jest mniejsze w porównaniu do widm EDS uzyskanych dla powłoki fosforanu wapnia przed niszcącym testem NSS (fig. 15). Uzyskane widma EDS wykazały również

obecność pików pochodzących od tytanu. Uzyskane wyniki potwierdzają, że rozpuszczanie oraz pękanie otrzymanych powłok następuje po 24 h przebywania w sztucznej atmosferze obojętnej mgły solnej.

Powłoki otrzymane sposobem według wynalazku zapewniają większą biokompatybilność tytanu. Porowata powłoka ma na celu poprawę osteointegracji poprzez działanie tkankotwórcze, cementotwórcze oraz wpływają na sterowaną regenerację tkanek. Powłoki fosforanu wapnia umożliwiają również zastosowanie dodatkowej modyfikacji powierzchni w formie współosadzania bioaktywnych nanocząstek metali szlachetnych lub naniesienie dodatkowych substancji antybakteryjnych/bakteriostatycznych oraz/i przeciwzapalnych.

Metoda osadzania powłok na drodze elektroredukcji nie wymaga zaawansowanego technologicznie sprzętu ani dużych nakładów finansowych związanych na przykład ze stosowaniem atmosfery ochronnej. Pozwala w prosty sposób kontrolować grubość oraz porowatość otrzymywanych powłok poprzez zmianę warunków osadzania, takich jak czas, potencjał oraz pH kąpeli.

Tak otrzymany element tytanowy z wysuszoną powłoką fosforanu wapnia z kąpeli octanowej nadaje się do dalszej aplikacji w implantologii. Podstawową cechą świadcząca o innowacyjności zgłaszanego rozwiązania jest zastosowanie metody elektroredukcji do osadzania powłok w temperaturze pokojowej, która zmniejsza ryzyko niepożądanych defektów w materiale oraz ogranicza pękanie powłok. O nowość stanowi również zastosowana kąpiel, z której otrzymywane są powłoki. Innowacyjnym rozwiązaniem jest również otrzymywanie amorficznego fosforanu wapnia na drodze elektroredukcji, ponieważ w literaturze spotykane jest otrzymywanie amorficznego fosforanu wapnia na drodze elektroforezy z proszków fosforanu wapnia. Obecność fosforanu wapnia na powierzchni tytanu wspomaga proces osteointegracji implantów zębowych z tkanką kostną. Otrzymana amorficzna powłoka fosforanu wapnia znajduje szerokie zastosowanie w implantologii stomatologicznej oraz w stomatologii w zwalczaniu nadwrażliwości zębów wywołanej przez czynniki termiczne i chemiczne, uwarunkowania periodontologiczne, recesje dziąseł oraz wybielanie zębów.

Uniwersytet Śląski

w Katowicach

RZECZNIK
Katedra
mgr
Katedra

