

Efecto de la microestructura sobre la bioactividad de dos materiales vitrocerámicos del sistema CaSiO₃ – ZrO₂

P. N. DE AZA, Z. B. LUKLINSKA*

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, Elche (Alicante). Spain. *Materials Department, Queen Mary, University of London, Mile End Road, London.U.K.

Se estudia la influencia de la microestructura sobre la bioactividad de dos materiales vitrocerámicos con la misma composición química (87% en peso de CaSiO₃ y 13% en peso de ZrO₂). Por tratamiento térmico del vidrio se obtuvo un material vitrocerámico (WZ1), formado por wollastonita-2M y circona tetragonal como fases cristalinas. Dicho material vitrocerámico no presentó bioactividad en suero fisiológico artificial (SFA). Mediante procesado cerámico del polvo de vidrio, se obtuvo un material vitrocerámico (WZ2) con las mismas fases cristalinas pero con diferente microestructura, que resultó ser bioactivo. Los estudios in vitro en SFA del vitrocerámico WZ2, demostraron la formación de una capa de hidroxiapatito (HA) en su superficie. El producto de la reacción fue examinado por microscopia electrónica de barrido y transmisión (MEB y MET), ambas con microanálisis por energías dispersivas de rayos- X (EDS). Las medidas de pH, realizadas directamente en la interfase del SFA con los respectivos materiales vitrocerámicos, fueron determinantes para entender sus diferentes comportamientos.

Palabras clave: Bioactividad, Vitrocerámicos, Microestructura, Wollastonita, Microscopia Electrónica de Barrido y de Transmisión_

Efect of the microstructure on the bioactivity of two glass-ceramics in the system $CaSiO_3 - ZrO_2$

The work examines the influence of the microstructure on the in vitro bioactivity of two glass-ceramics with the same chemical composition. Two routes were used to obtain two glass-ceramics composed of 87 wt% CaSiO₃ -13 wt% ZrO₂. Heat treatment of a monolith glass produces a glass-ceramic (WZ1) containing wollastonite-2M and tetragonal zirconia as crystalline phases. The WZ1 did not display bioactivity in vitro. Ceramising the glass, via powder technology route, formed a bioactive glass-ceramic (WZ2), with the same crystalline phases but different microstructure. The in vitro studies carried out on WZ2 showed the formation of an apatite-like layer on its surface during exposure to the simulated body fluid (SBF). The interfacial reaction product was examined by Scanning and Transmission Electron Microscopy, both instruments fitted with Energy-Dispersive X-ray Analysers. pH measurements, directly made at the interface of the two glass-ceramics with the simulated body fluid, were important in understanding their different behaviour during exposure to the same physiological environment.

Keywords: Bioactivity, Glass-ceramics, Microstructure, Wollastonite, Scanning and Transmission Electron Microscopy,

1. INTRODUCCION

En las últimas dos décadas ha habido un interés generalizado por los materiales cerámicos, vidrios y vitrocerámicos bioactivos, debido principalmente a su capacidad para desarrollar una fuerte unión con el tejido óseo después de su implantación (1-4). Varios autores (5-7) han descrito el mecanismo de unión como una secuencia de reacciones entre el material y el medio fisiológico. En la mayoría de los casos, se observó la formación de una capa intermedia, rica en sílice, seguida por otra capa exterior de fosfato cálcico (1-7). Estudios previos in vitro e in vivo han puesto de manifiesto que la wollastonita (CaSiO₃), material cerámico policritalino bioactivo, forma una capa de hidroxiapatito (HA) en su superficie al entrar en contacto con suero fisiológico artificial (SFA), saliva humana parotidea o al ser implantada, uniéndose a través de dicha capa directamente al tejido óseo (3,4,8-12).

El comportamiento de todos los materiales bioactivos se ha relacionado generalmente con su composición química. Sin embargo, es bien conocido que la microestructura condiciona las propiedades de los materiales y en consecuencia sus comportamientos y aplicaciones. Se deduce así la importancia de estudiar la influencia de la microestructura de los materiales bioactivos para entender sus comportamientos en ambientes fisiológicos. En el presente trabajo se estudia la influencia de la microestructura sobre el comportamiento bioactivo in vitro de dos materiales vitrocerámicos del sistema $CaSiO_3$ - ZrO_2 (13) con la misma composición química.

2. EXPERIMENTAL

El vidrio se partida se obtuvo a partir de la composición 87% en peso de CaSiO₃ y 13% en peso de ZrO₂, la cual presenta la temperatura de líquidus mas baja del sistema pseudobinario wollastonita-circona (1483 \pm 2°C) (13).

Las materias primas fueron: circona de gran pureza (>99,9 % en peso de $ZrO_{2'}$ de Z-Tech) y pseudowollastonita sintetizada por reacción de estado sólido a 1500°C/4 horas a partir de una mezcla estequiométrica de carbonato cálcico (>99,5 % en peso de Ca(CO)₃, reactivo Merck) y arena belga de alta pureza (>99,9 % en peso de SiO₂). Los detalles de la preparación y caracterización de la pseudowollastonita se pueden encontrar en publicaciones anteriores (9,10).

Los polvos fueron molidos por separado hasta pasar por un tamiz de 30µm. Después, las proporciones deseadas de los mismos fueron pesadas y mezcladas en un mortero manual de ágata con una pequeña adición de la acetona. La fusión de la composición se llevo a cabo a 1565 \pm 2°C durante 3 horas. El líquido fue vertido sobre una placa metálica y el vidrio así obtenido fue recocido a 700 °C para eliminar todas las tensiones.

Con el fin de estudiar, en primer lugar, la tendencia a la desvitrificación del vidrio, así como establecer las temperaturas de formación de las fases cristalinas y sus posibles transformaciones polimórficas, se procedió a su estudio mediante análisis térmico diferencial (ATD) (Netzsch STA 409) y dilatometría (Adamel-Lomargy DI-24). El estudio de la evolución de la desvitrificación del vidrio se llevo a cabo mediante un diagrama temperatura, tiempo, transformación (TTT).

A la vista de los resultados, se procedió a la desvitrificación del vidrio mediante un tratamiento térmico en dos etapas, con una velocidad de calentamiento de 5º/minuto: nucleación de las fases a la temperatura de 850°C/6 horas y crecimiento de las mismas a 950°C/2 horas. La muestra así obtenida se denominó WZ1. Todos los intentos de lograr una desvitrificación uniforme en volumen, cambiando tiempos e incluso temperaturas tanto de nucleación como de crecimiento en base al diagrama TTT, fueron infructuosos. Posteriormente, se procedió a moler el vidrio por debajo de 10 micras en un molino de atricción. El polvo obtenido, con un tamaño medio de 5 µm, se prensó isostáticamente a 200 MPa y posteriormente se trató térmicamente en dos etapas a las mismas temperaturas y tiempos que en el caso anterior. El material obtenido se denominó WZ2. Ambos materiales vitrocerámicos fueron caracterizados por difracción de X-rayos (DRX) (Siemens D5000) y por MEB-EDS (Jeol 6400).

El estudio cuantitativo de las fases presentes en ambos vitrocerámicos se llevó a cabo empleando el método de Rietveld (14,15). Los difractogramas fueron refinados con el programa GSAS (16) usando para la forma de los picos la función pseudo-Voig (17) con la corrección de asimetría de Finger et al. (18). El análisis cuantitativo de la fase amorfa se realizó, utilizando α -Al₂O₃ como estándar interno, siguiendo el protocolo establecido por De la Torre et al. (19), lo que permite su determinación con un error menor del 1%.

Por corte transversal, con disco de diamante (0,3 mm) en una microcortadora (Isomet 1000, Buehler), se obtuvieron cin-

co probetas, de 5x5x2 mm, de cada una de las muestras WZ1 y WZ2. Ninguna de las muestras presentó porosidad abierta. De cada vitrocerámico se introdujeron tres muestras en suero fisiológico artificial (SFA) a la temperatura de 36,5 °C, durante un tiempo máximo de 4 semanas con agitación intermitente (20). Cada muestra se introdujo en 100 ml de dicho suero. Diariamente se midió el pH del medio fisiológico así como el de las interfases SFA – vitrocerámico, usando un transistor de efecto campo sensible a los iones (ISFET) (21,22). Los cambios superficiales de los materiales vitrocerámicos y la morfología de las secciones transversales pulidas fueron estudiados mediante MEB-EDS. El producto superficial de la reacción, en el vitrocerámico WZ2, fue examinado por MET a 200 keV (Jeol Jem 2010).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se expone la curva de ATD, obtenida empleando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Como puede observarse, en primer lugar aparece un pequeño efecto endotérmico a ~845 °C, el cual se atribuye al reblandecimiento del vidrio (T_r = ~845 °C) según se comprobó posteriormente mediante un ensayo dilatométrico. A ~980°C se observa un fuerte efecto exotérmico con un pequeño hombro a ~960°C, que se atribuyen a las cristalizaciones de circona tetragonal y wollastonita-2M, tal como se pudo determinar, mediante DRX, en una muestra tratada 1000 °C y enfriada bruscamente a temperatura ambiente. No se ha podido, sin embargo, discernir cual de las fases cristaliza primero. A 1250 °C se observa un efecto endotérmico que se ha atribuido a la transformación de la wollastonita-2M a pseudowollastonita. Finalmente, se produce la fusión del vidrio a ~1465 °C, lo que está de acuerdo con la temperatura del punto invariante peritéctico del sistema pseudobinario wollastonita-circona (1467 \pm 2°C) (13).



Figura 1.- ATD del vidrio de partida

La curva dilatométrica (Fig.2) pone de manifiesto que la temperatura de reblandecimiento del vidrio, Tr, es de ~845°C y la temperatura de transformación vítrea, Tg, se sitúa a ~787 °C. El coeficiente de expansión lineal α_- , calculado entre 20 y 700 °C, dio un valor de 9,42 10⁻⁶ °C⁻¹.

El diagrama temperatura, tiempo, transformación (TTT) del vidrio, cuyos resultados se exponen en la figura 3, pone de manifiesto que únicamente a partir de ~850 °C, temperatura que coincide estrechamente con el Tr del vidrio (~845 °C) se logra obtener la opacificación del mismo y únicamente a partir de ~950 °C tiene lugar su desvitrificación. De ahí que se seleccionaran las mencionadas temperaturas para obtener ambos materiales con palieres de 6 horas y 30 minutos respectivamente a dichas temperaturas, empleando una velocidad de calentamiento de 5 °C/minuto.

El estudio por DRX (Fig. 4) puso de manifiesto que los vitroceramicos WZ1 y WZ2 presentan las mismas fases cristalinas: wollastonita-2M y circona tetragonal. Sin embargo, sus proporciones varían apreciablemente de una muestra a otra, tal como se puede apreciar en la Tabla I, donde se exponen los resultados obtenidos del análisis cuantitativo por DRX mediante el método de Rietveld (14-19).

La figura 5a muestra una microfotografía de una sección transversal por MEB del vitrocerámico WZ1, donde se observa que la desvitrificación ha tenido lugar mediante una segregación de las fases. La wollastonita-2M nuclea en forma de fibras radiales desde la periferia de la probeta, mientras que la circona lo hace en el interior de la misma en forma de dendritas arborescentes equidimensionales. Un detalle de la desvitrificación de la circona (Fig. 5b), muestra ésta rodeada de una zona



Figura 2.- Dilatometría del vidrio de partida

TABLA I.

	MATERIAL VITROCERÁMICO	Fases (% en peso)		
		Wollastonita-2M	Circona (tetragonal)	Fase vítrea
	WZ1	65,6 ± 1,5	$6,5 \pm 0,6$	$27,9 \pm 0,3$
	WZ2	83,5 ± 1,8	$12,4 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,1$



Figura 3.- Diagrama TTT del vidrio de partida (• vidrio; o opacificación; x cristalización)



Figura 4.- DRX del vidrio de partida y de los vitrocerámicos WZ1 y WZ2

Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. Vol. 42 Núm. 2 Marzo-Abril 2003



Figura. 5.- (a) Microfotografía de MEB de la microestructura del vitrocerámico WZ1. (b) Detalle de la desvitrificación de la circona.

de color gris correspondiente a la fase vítrea residual sin desvitrificar. Por otro lado, la figura 6 muestra que el vitrocerámico WZ2 presenta, sin embargo, una microestructura homogénea, donde la fase blanca es la circona y la fase gris la wollastonita-2M. Las pequeñas áreas de color gris más obscuras corresponden a una muy pequeña cantidad de fase vítrea residual.

El estudio de la bioactividad in vitro en SFA puso de manifiesto que el pH, en la interfase SFA-vitrocerámico WZ2, se incrementa, en los primeros cinco minutos, desde 7,25 hasta 8. En consecuencia, y de acuerdo con el mecanismo general propuesto para los materiales bioactivos por De Aza y col.(22), sobre la superficie del vitrocerámico WZ2 tiene lugar la formación de una capa de HA, tal como se muestra en la microfotografía obtenida por MEB (Fig. 7). Una muestra tomada de la superficie y observada por MET mostró pequeños cristales individuales de hidroxiapatito (HA) formando una fase continua (Fig.8a). Algunos cristales muestran la red de planos (002) muy bien definida con espaciado interplanar de 0,344 nm, el cual se asemeja a los valores dados por la bibliografía para el HA (23,24). Dicha red es continua sin defectos ni deformaciones (Fig.8b). El área de difracción seleccionada (ADS) (Fig.8c) muestra arcos bien definidos (002) indicando una orientación preferencial del HA, la cual coincide con la orientación de los



Figura 6.- Microfotografía de MEB de la microestructura del vitrocerámico WZ2.



Figura 7.- Microfotografía de MEB de la superficie del vitrocerámico WZ2 mostrando la capa de HA, después de un mes de inmersión en SFA.

apatitos naturales (25). Así mismo el EDS muestra la sola presencia de P y Ca en dicha capa (Fig.8d).

En la figura 9 se expone una sección transversal de la muestra WZ2, después de un mes de inmersión en SFA. Como se puede observar, existe una capa de sílice intermedia entre la capa de HA y la muestra, tal como sucede en la mayoría de los vidrios y vitrocerámicos bioactivos (1,2,8).

Sin embargo, en el caso del vitrocerámico WZ1, el pH en la interfase SFA-vitrocerámico WZ1 permaneció prácticamente constante, fluctuando alrededor de 7,25, pH del medio fisiológico. En consecuencia, no tuvo lugar la formación de la capa de HA sobre el vitrocerámico, tal como se pudo comprobar mediante MEB (Fig.10). Este hecho pone de manifiesto la influencia de la fase vítrea residual en el comportamiento del vitrocerámico WZ1 y confirma los trabajos de Gross y Strunz (26,27). Estos autores demostraron que la adición de elementos tales como Al3+, Zr4+, Te3+, Ti4+, etc., a vidrios y vitrocerámicos bioactivos elimina su bioactividad. La causa es la formación de multicapas de óxidos, hidróxidos y carbonatos de dichos metales fuertemente cargados sobre la superficie del implante, cuyos límites de solubilidad se encuentran excedidos a valores de pH más bajos que aquellos requeridos para la formación de la capa de HA.



Figura 8.- (a) Microfotografía de MET de baja resolución del HA depositado en la superficie del vitrocerámico WZ2 después de un mes de inmersión en SFA. (b) Microfotografía de MET de alta resolución de los cristales de HA. (c) ADS de dichos cristales. (d) EDS del depósito.



Figura 10.- Microfotografía MEB del vitrocerámico WZ1 después de un mes de inmersión en SFA



Figura 9.- Microfotografía de MEB de una sección transversal del vitrocerámico WZ2 después de inmersión durante un mes en SFA y mapas elementales de rayos-X de Si, Ca y P.

5. CONCLUSIONES

Se ha confirmado, una vez más, que la bioactividad en suero fisiológico artificial (FSA), está relacionada, directamente, con el pH desarrollado en la interfase material – SFA.

Por otro lado, se ha puesto claramente de manifiesto, cómo la microestructura puede condicionar el comportamiento bioactivo in vitro de dos vitrocerámicos con la misma composición química.

En consecuencia, al estudiar la bioactividad en SFA de los materiales vitrocerámicos, no solo se deben tener en cuenta sus análisis químicos sino también sus microestructuras.

AGRADECIDMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de la Generalitat Valenciana mediante el programa de ayudas para estancias breves en el extranjero (POST01-31) que ha permitido la visita al Departamento de Materiales del Queen Mary, Universidad de Londres.

BIBLIOGRAFIA

- L.L. Hench y J.W Wilson.<<Surface-active biomaterials>>. Science. 226 630-636 (1984).
- 2. W. Cao y L.L. Hench.<<Bioactive materials>>. Ceram Int. 22 493-507 (1996).
- P.N. De Aza, Z.B. Luklinska, A. Martinez, M.R. Anseau, F. Guitian, y S. De Aza. <<Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone>>. J. Microsc-Oxforf. 197 (1) 60-67(2000).
- P.N. De Aza, Z.B. Luklinska, M.R. Anseau, F. Guitian y S. De Aza.<<Transmission electron microscopy of the interface between bone and pseudowollastonite implant>>. J. Microsc- Oxford 201 (1) 33-43 (2001).
- M. Walker. <<An Investigation into the Bonding Mechanism of Bioglass>> Tesis Doctoral, Universidad de Florida, 1977.
- K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo Y. Ebisaswa y M. Oka.
 <80ne-bonding ability of P₂O₅ free CaOSiO₂ glasses>>. J. Biomed. Mater. Res. 25 357-365 (1991).
- C. Ohtsuki, T. Kokubo y T. Yamamuro.<
 Mechanism of Apatite Formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ Glasses in Simulated Body Fluid>>. J. Non-Crystal. Solids. 143 84-92 (1992).

- P.N. De Aza, F. Guitian y S. De Aza <<Bioactivity of wollastonite ceramics: in vitro evaluation>>. Scripta Metall Mater 31 1001-1005 (1994).
- P.N. De Aza, Z.B. Luklinska, M.R. Anseau, F. Guitian. y S. De Aza <<Morphological studies of pseudowollastonite for biomedical application>>. J Microsc-Oxford 182 24-31 (1996).
- P.N. De Aza, F Guitian, S. De Aza y F.Valle.<<Analytical control of wollastonite for biomedical applications by use of AAS and ICP-AES>>. The Analyst 123 81-685 (1998).
- P.N. De Aza, Z.B. Luklinska, M.R. Anseau, F. Guitian. y S. De Aza <<Bioactivity of Pseudowollastonita in Human Saliva>>. J. of Dentistry 27 107-113 (1999).
- P.N. De Aza, F. Guitian y S. De Aza <<Bioeutectic:a new ceramic material for human bone replacement. Biomaterials>>. 18 1285-1291 (1997).
- P.N. De Aza, C. M.Lopez, F. Guitian y S. De Aza. <<Phase diagram of wollastonite-zirconia>>. J. Am. Ceram. Soc. 76(4) 1052-1054 (1993).
- H. M. Rietveld. <<A profile refinement method for nuclear and magnetics structures>>. J. Appl. Cryst. 2, 65-71 (1969).
- 15. R. A. Young. << The Rietveld method>>. Oxford University Press (1993).
- A. C. Larson and R.B. Von Dreele. << Report No. LAUR-86-748>>. Los Alamos National Laboratory USA (1994).
- P. Thompson, D. E. Cox and J. B. Hasting. <<Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron X-ray data from Al₂O₃>>. J. Appl. Cryst. 20, 79-83 (1987).
- L. W. Finger, D.E. Cox and A. P. Jepfocoat. <<A correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence>>. J. Appl. Cryst., 27, 892-900, (1994).
- 19. A. De la Torre, S. Bruque and M. A. G. Aranda. <<Rietveld quantitative amorphous content>>. J. Appl. Cryst., 34, 196-202, (2001).
- J. Gamble.<
 Chemical Anatomy, Physiology and Pathology of Extracellular Fluid>>. Harvard University Press. Cambridge. 1967.
- A. Merlos, I. Gracia, C. Cané, J. Esteve, J. Bartroli y C. Jimenez. <<CMOS Flow-through pH-ISFET>>. en Proc. 5th Conf. on Sensors and their Applications. Edinburgh, UK, Sept. 127-132 (1991)
- 22. P.N. De Aza, F Guitian. M. Merlos, E. Lora-Tamayo y S. De Aza.<< Bioceramic-Simulated body fluid interfaces: pH and its influence on HA formation>>. J. Mater. Sci: Materials in Medicine. 7(7) 399-402 (1996).
- M. Spector.<< High resolution electron microscopy study of lattice image in biological apatites>>. J. of Micros-Oxford. 103 55-62 (1975).
- B. Kerebel, G. Daculsi y A. Verbaere.<<High resolution electron microscopy and crystallographic study of some biological apatites>>. J. Ultrastruc. Res. 57 266-275 (1976).
- S. Jackson, A.G. Cartwright y D. Lewis.<< The morphology of bone minerals crystals>>. Calcif. Tissue Res. 25 217-222 (1978).
- U.Gross y V. Strunz. <<The Anchoring of Glass Ceramics of Different Solubility in the femur of the rat>>. J. Biomed. Mater. Res., 14 607 (1980).
- U. Gross y V. Strunz. <<Clinical Application of Biomaterials>>. Ed. A.J.C. Lee, T. Albrektsson, P. Branemark. John Wiley & Son, New York, 237 (1982).

Recibido: 13.10.02 Aceptado: 24.01.03

