

***Nota:*** Esta primera página se utilizará como portada del trabajo y ella deberá incluir el Tópico, el Título, los Autores y las Afiliaciones.

**Tópico: S13. Biomateriales**

## **Correlación entre las propiedades estructurales y la adhesión bacteriana de biomateriales compuesto de titanio-hidroxiapatita**

***Maria Lorena López Rodríguez<sup>a,b</sup>, Laura E. Valenti<sup>c,d</sup>, Carlos Oldani<sup>a</sup>, Carla E. Giacomelli<sup>c</sup>***

<sup>a</sup>Departamento de Materiales y Tecnología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, X5000HUA, Argentina.

<sup>b</sup>Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, X5000HUA, Argentina.

<sup>c</sup>Instituto de Investigaciones en Físico Química de Córdoba (INFIQC) CONICET-UNC, Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, X5000HUA, Argentina.

<sup>d</sup>Raomed S. A. Av. Circunvalación 3085, Córdoba, X5011CTR, Argentina.

***Preferencia de presentación (oral o póster): oral***

## Tópico: S13.Biomateriales

# Correlación entre las propiedades estructurales y la adhesión bacteriana de biomateriales compósito de titanio-hidroxiapatita

**Maria Lorena López Rodríguez<sup>a,b</sup>, Laura E. Valenti<sup>c,d</sup>, Carlos Oldani<sup>a</sup>, Carla E. Giacomelli<sup>c\*</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Materiales y Tecnología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, X5000HUA, Argentina.

<sup>b</sup>Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, X5000HUA, Argentina.

<sup>c</sup>Instituto de Investigaciones en Físico Química de Córdoba (INFIQC) CONICET-UNC, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, X5000HUA, Argentina.

<sup>d</sup>Raomed S. A. Av. Circunvalación 3085, Córdoba, X5011CTR, Argentina.

\*Autor correspondiente: giacomel@fcq.unc.edu.ar

## ABSTRACT

The success of biomaterials, particularly for implants and bone prostheses, is based on devices with biointeractive and selective surfaces to simultaneously improve bone function and minimize the risk of infections caused by bacterial adhesion. There are several strategies to complement the good mechanical and anticorrosion Ti properties with biocompatibility of hydroxyapatite (HA). These coatings improve the surface bioactivity, but often there is not adequate Ti-HA interaction causing implant failure. Furthermore, it is difficult to control the composition and structure of the HA and applying uniform coatings on pieces with complex geometries. For these reasons, it is necessary to develop and evaluate new biomaterials such as Ti-HA composite materials with highly controlled pore structure. The aim of this paper is to correlate structural properties with bacterial adhesion of porous Ti-HA composite biomaterials to be used in medical devices and implants. The development of new biomaterials was performed by powder metallurgical techniques. The physicochemical, morphological and topographical characterization of the initial powders and final samples (obtained as tablets) was performed following the recommended procedures by the ISO/TS 10993-19:2006 (E) standard guidelines. The in vitro response evaluation of the synthesized material was performed by exposing the tablets to *Staphylococcus aureus* strains commonly associated with orthopedic implants infections in similar conditions to the in vivo physiological conditions regarding pH, ionic strength and solution composition. We found that bacterial adhesion depends on the size, shape, interconnection and the spatial arrangement of the pores in the composite. These new biomaterials were coated with Ag nanoparticles to confer them biocidal capabilities. This coating inhibits bacterial adhesion and growth.

Keywords: Composite biomaterials, Titanium, Hydroxyapatite, Pulvimetallurgy, *Staphylococcus aureus*, Ag nanoparticles.

## RESUMEN

El éxito de los biomateriales, particularmente para implantes y prótesis óseas, se basa en preparar dispositivos cuyas superficies sean biointeractivas y selectivas para que simultáneamente mejoren la función ósea y minimicen el riesgo de infecciones provocadas por la adhesión bacteriana. Se han publicado diversas estrategias para complementar las buenas propiedades mecánicas y anticorrosivas del Ti y la biocompatibilidad de la hidroxiapatita (HA). Estos recubrimientos mejoran la bioactividad superficial, pero frecuentemente no se logra una adecuada interacción Ti-HA lo cual causa la falla del implante. Además, es difícil controlar la composición y estructura de la HA y la aplicación de recubrimientos uniformes en piezas con geometrías complejas. Por estas razones, es necesario desarrollar y evaluar nuevos biomateriales tales como los materiales compósito de Ti-HA de estructura porosa altamente controlada. El objetivo de este trabajo es presentar los resultados de correlación de las propiedades estructurales y la adhesión bacteriana de biomateriales porosos compósito de Ti-HA para ser utilizados en dispositivos médicos como implantes. El desarrollo de los nuevos biomateriales se realizó por técnicas pulvimetalúrgicas. La caracterización fisicoquímica, morfológica y topográfica de los polvos iniciales y de las muestras finales (obtenidas como pastillas) se realizó siguiendo los lineamientos recomendados por la norma ISO/TS 10993-19:2006(E). La evaluación de la respuesta in vitro del material sintetizado se realizó exponiendo las pastillas a las cepas asociadas comúnmente a infección en implantes ortopédicos *Staphylococcus aureus* en condiciones de cultivo similares a las condiciones fisiológicas in vivo en cuanto a pH, fuerza iónica y composición de la solución. Se encontró que la adhesión bacteriana depende del tamaño, la forma, la interconexión y el arreglo espacial de los poros en el compósito. Para conferir capacidad biocida a estos nuevos biomateriales se preparó un recubrimiento de nanopartículas de Ag. Este recubrimiento permitió inhibir la adhesión y el crecimiento bacteriano.

Palabras Clave: Biomateriales compósito, Titanio, Hidroxiapatita, Pulvimetalurgia, *Staphylococcus aureus*, Nanopartículas de Ag.

## 1. Introducción

El éxito de los biomateriales, particularmente para implantes y prótesis óseas, se basa en preparar unidades cuyas superficies sean biointeractivas y selectivas para que simultáneamente mejoren la función ósea y minimicen el riesgo de infecciones provocadas por la adhesión bacteriana [1]. Se han publicado diversas estrategias para complementar las buenas propiedades mecánicas y anticorrosivas del Ti y la biocompatibilidad de la hidroxiapatita (HA) [2-6]. Los recubrimientos de HA sobre Ti mejoran la bioactividad superficial, aunque frecuentemente no se logra una adecuada interacción Ti-HA lo cual causa la falla del implante [7]. Además, es difícil controlar la composición y estructura de la HA y la formación de recubrimientos uniformes en piezas con geometrías complejas [8]. Por estas razones, una alternativa factible son los nuevos biomateriales tales como los materiales compósito de Ti-HA de morfología, topografía y estructura porosa altamente controlada [9,10].

En cirugías de reemplazo de un hueso por un implante, el primer punto crítico es el desarrollo de infecciones debido a la adhesión bacteriana a la superficie del biomaterial [11]. Si esto ocurre antes de la regeneración del tejido óseo, pueden formarse biofilms (matrices biológicamente activas de células bacterianas y sustancias extracelulares asociadas a la superficie sólida [12]), extremadamente resistentes al sistema inmune y al tratamiento sistémico de los antibióticos [13], provocando procesos infecciosos sobre los implantes, el deterioro de la función corporal e incluso la necesidad de una nueva intervención quirúrgica. Actualmente, se considera que entre el 65 y el 80% de las infecciones humanas están asociadas a la formación de biofilms. Estos biofilms presentan una sensibilidad disminuida a los agentes biocidas respecto de las células planctónicas, ya que el biofilm constituye un modo de protección de la comunidad bacteriana frente a la acción de agentes antimicrobianos y de la fagocitosis. Por lo tanto, es importante prevenir de algún modo la colonización inicial y posterior adhesión bacteriana y evitar así la formación del biofilm.

Desde la antigüedad, se recurrió al uso de la plata gracias a su acción bactericida. Actualmente, los compuestos de plata se incorporan en solución o como nanopartículas (NP-Ag) y pueden ser aplicados en el desarrollo de nuevos biomateriales debido a su alta habilidad biocida y a su falta de toxicidad hacia células humanas en las dosis adecuadas [14, 15]. Además, debido a la gran relación área-volumen de las NP, pueden ser eficientemente modificadas para conferir distintas propiedades no sólo asociadas a la acción bactericida sino también para modular la respuesta del paciente frente al implante. En consecuencia, una estrategia puede ser implementada a partir de compósitos de Ti-HA con recubrimientos NP-Ag para obtener biomateriales híbridos con buenas propiedades mecánicas y con agentes antimicrobianos cuyos efectos locales sean prolongados sin afectar la inmuno-respuesta del paciente ni la osteointegración de la prótesis.

El objetivo de este trabajo es presentar los resultados de correlación de las propiedades estructurales y la adhesión bacteriana de biomateriales porosos compósito de Ti-HA modificados con NP-Ag para ser utilizados en dispositivos médicos como implantes.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Obtención de los compósitos

Los compósitos de Ti-HA se obtuvieron por pulvimetalurgia. El procedimiento consistió en mezclar los polvos de TiH<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) y de HA (Sigma-Aldrich) en las proporciones adecuadas hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla obtenida se colocó en una matriz de acero de compresión prismática con un vástago de 8 mm de diámetro y se prensó uniaxialmente en frío en una prensa hidráulica a una presión de 2000 kg. Las muestras en verde se sinterizaron a 1000 °C durante una hora bajo atmósfera de Ar (7 L min<sup>-1</sup>). Se prepararon compósitos de Ti y compósitos con 5 y 10% de HA (Ti-HA5 y TiHA10 respectivamente).

### 2.2. Modificación de Ti-HA con NP-Ag

La modificación de Ti-HA se realizó en 2 etapas que dieron lugar a la obtención de un nuevo biomaterial híbrido. La primera de ellas, incluyó la síntesis de las NP-Ag funcionalizadas con grupos carboxilato para, en una segunda etapa, realizar la correspondiente unión de estas NP-Ag a los grupos superficiales de los compósitos de Ti-HA. Las NP-Ag se obtuvieron siguiendo un procedimiento similar al descrito por Lok et al. [16] mediante la reducción de AgNO<sub>3</sub> mediante la acción del agente reductor NaBH<sub>4</sub> en citrato de sodio. Las NP-Ag fueron estabilizadas previamente mediante el agregado de albúmina sérica bovina. En la segunda etapa, se pusieron en contacto los compósito de Ti-HA10 con las suspensiones de las NP-Ag estabilizadas durante 2 horas para realizar el cubrimiento por inmersión.

### 2.3. Cultivo bacteriano

Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) incubadas en medio de agar triptico de soja a 37°C bajo condiciones de cultivo estáticas durante 24 h. Posteriormente las cepas se cultivaron aeróbicamente en medio de cultivo líquido triptico de soja (TSB) con agitación rotatoria (130 rpm) a 37°C durante 12 h. Los cultivos se diluyeron con TSB fresco hasta una concentración de 1 x 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

### 2.4. Caracterización de los polvos iniciales y compósitos

Los polvos iniciales y las muestras finales (obtenidas como pastillas) se caracterizaron siguiendo los lineamientos recomendados por la norma ISO/T S 10993-19:2006(E). La distribución del tamaño de partícula de los polvos iniciales se obtuvo por dispersión dinámica de luz con equipo DelsaNano C (Beckman Coulter) y la estructura y morfología de los polvos y las pastillas con difracción de rayos X y técnicas microscópicas. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron con un difractómetro Phillips X'pert PRO usando una lámpara CuK $\alpha$  lamp ( $\lambda = 1.5408 \text{ \AA}$ ) a 40 kV, 40 mA entre 5 y 90° (2 $\theta$ ) en pasos de 0,02° y un escalón de tiempo de 1,5 s. Para la obtención de las imágenes se empleó un microscopio electrónico de barrido (FE-SEM Sigma, Carl Zeiss) integrado con un espectrómetro dispersivo en energías (AZtec EDS, Oxford Instruments) para saber la composición química superficial y un microscopio de laser confocal 3D (LEXT OLS4000, Olympus).

2.5. Experimental

La evaluación de la respuesta *in vitro* del material sintetizado se realizó exponiendo las pastillas a las cepas asociadas comúnmente a infección en implantes ortopédicos *S. aureus*. Sobre cada pastilla se colocaron 40 µL de cultivo bacteriano y se incubaron en estufa a 37°C durante una hora. Las bacterias adheridas se recuperaron enjuagando las pastillas con TSB estéril y se hicieron 3 ciclos alternantes de 3 min de sonicación a una frecuencia de 42 kHz, seguido por 30 s de agitación. El biofilm removido fue cuantificado por recuento heterotrófico en placa.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de los compósitos

La distribución de tamaño de partícula de los polvos iniciales se obtuvo por dispersión dinámica de luz. La Fig. 1 muestra las distribuciones de tamaño obtenidas para los polvos iniciales. En color negro se muestra la distribución de tamaño para el TiH<sub>2</sub> mientras que en azul se muestra la distribución de tamaño para la HA. Se observa que la distribución de número más representativa para el TiH<sub>2</sub> se encuentra entre 280 ± 50 nm mientras que para la HA es de 2000 ± 1000 nm.

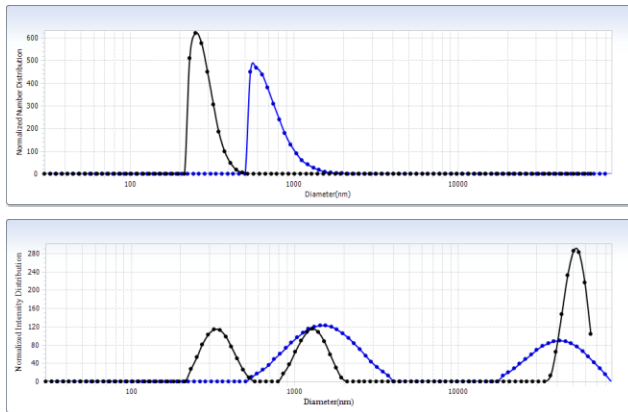


Figura1-Distribución de números para Ti (negro) y HA (azul).

Los patrones de difracción de rayos X de los polvos iniciales se muestran en la Fig. 2. En la Fig. 2 (a) se observa el precursor del Ti y en la Fig.2 (b) el patrón de difracción de la HA. Los patrones fueron comparados con los de la base de datos ICSD 03-065-4798 para Ti y 01-076-0694 para HA. En el primer caso el patrón obtenido confirma la pureza del TiH<sub>2</sub> con picos encontrados en 34,8; 40,4; 58,6; 69,9 y 73,6. El patrón de HA muestra los picos esperables en los ángulos precisos de la HA de alta pureza en los ángulos 2 θ = 25,8; 32,9; 39,8; 46,7 y 49,5. La composición química superficial de las pastillas finales se confirmó con un espectrómetro dispersivo de energías (AZtec EDS, Oxford Instruments). Para las pastillas de Ti, el área estudiada confirmó la presencia de este elemento químico mientras que las pastillas de TiHA5 y TiHA10 se encontraron los elementos Ti, Ca, P, y O.

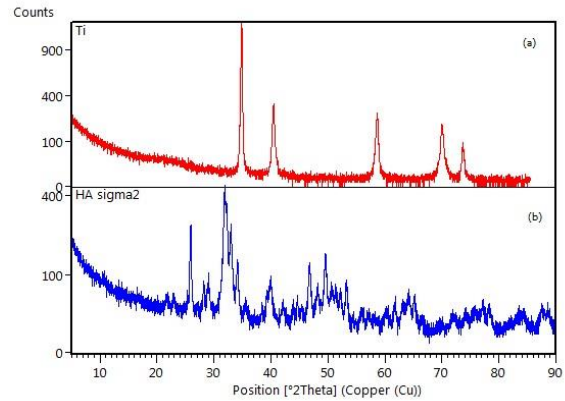


Figura2-Patrones de DRX de (a) Ti; (b) HA.

En la Fig. 3 se presentan las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (FE-SEM Sigma, Carl Zeiss) para las pastillas verdes (antes de sinterizar), es decir, los polvos compactados y la Fig. 4 las micrografías después del sinterizado. La Fig. 3 y 4 (a) corresponden a las micrografías de las pastillas de Ti mientras que las Fig. 3 y 4, (b) y (c) corresponden a las pastillas de TiHA5 y TiHA10, respectivamente.

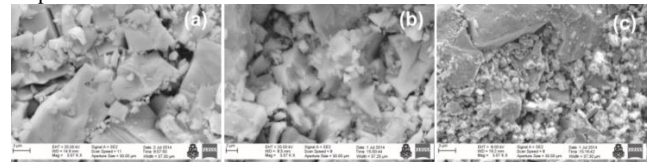


Figura3-Micrografías de las muestras verdes. (a) Ti, (b) TiHA5 y (c) TiHA10.

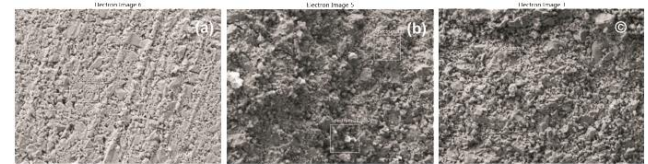
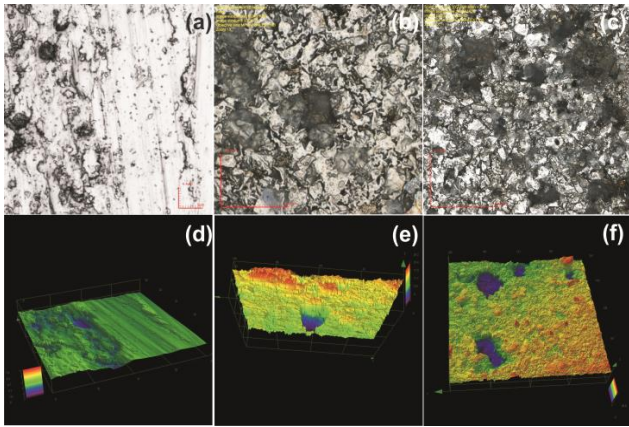


Figura4-Micrografías de los compósitos obtenidos. (a) Ti, (b) TiHA5 y (c) TiHA10.

La porosidad de la superficie de las pastillas se evaluó a través de microscopía confocal. La Fig. 5 presenta las imágenes obtenidas de las superficies de (a) Ti, (b) TiHA5 y (c) TiHA10 mientras que las Fig. 5 (d), (e) y (f) son las imágenes en color respectivamente. Los tamaños de poros encontrados para las pastillas de Ti son menores a 4 µm mientras que para las pastillas de TiHA5 y TiHA10 están en el orden de 20 ± 5 µm y 50 ± 10 µm.

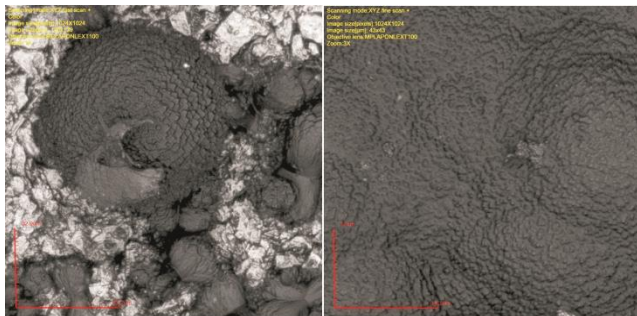


**Figura 5**–Micrografías de los compósitos obtenidos. (a) Ti, (b) TiHA5 y (c) TiHA10.

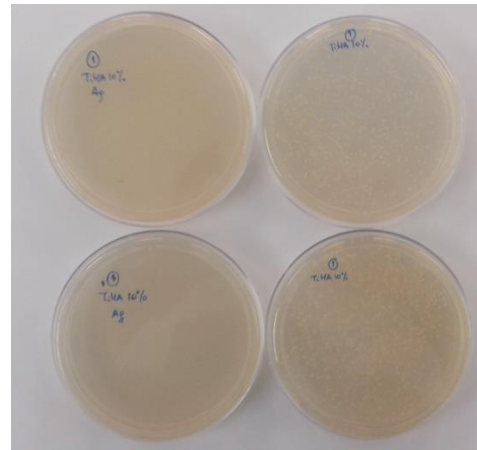
### 3.2. Adhesión bacteriana

La evaluación de la respuesta *in vitro* del material sintetizado se realizó exponiendo las pastillas a las cepas asociadas comúnmente a infecciones en implantes ortopédicos *S. aureus*. Los biofilms formados sobre las pastillas se removieron y se incubaron para obtener la concentración bacteriana. En las pastillas de Ti se encontraron cultivos de  $(170 \pm 10) \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>, mientras que en los compósitos de TiHA5 y TiHA10 fue de  $(120 \pm 30) \times 10^3$  y  $(63 \pm 10) \times 10^3$ . Es decir, que en las pastillas con tamaño de poro menor como las de Ti tuvieron menor colonización bacteriana comparada frente a los compósitos de TiHA. Si se comparan los compósitos entre sí no se encontró una correlación con el tamaño de poro. Sin embargo, en aquellos con mayor concentración de HA donde existe interconexión entre los poros (como se observa en la Fig. 5 (c)) la concentración bacteriana resultó ser mayor.

Para conferir capacidad biocida a estos nuevos biomateriales se preparó un recubrimiento de NP-Ag en los compósitos de TiHA10. En la Fig. 6 se observa una micrografía electrónica de las pastillas con el recubrimiento. Este recubrimiento permitió inhibir la adhesión y el crecimiento bacteriano como se observa en la Fig. 7. La Fig. 7 superior e inferior izquierda muestra un cultivo procedente de un compósito de TiHA10 con recubrimiento de NP-Ag mientras que la Fig. 7 superior e inferior derecha presenta la placa correspondiente a un compósito de TiHA10 sin el recubrimiento.



**Figura 6**–Micrografías de los compósitos de TiHA10 con recubrimiento de NP-Ag.



**Figura 7**–Cultivos de *S. aureus* removidos de las pastillas de TiHA10 (placas superior e inferior de recha) con recubrimiento de NP-Ag (placas superior e inferior izquierda).

## 4. Conclusión

Se prepararon y caracterizaron biomateriales compósito de Ti e HA con estructura porosa para ser utilizados en dispositivos médicos como implantes. El desarrollo de los nuevos biomateriales se realizó por técnicas pulvimetalúrgicas. La evaluación de la respuesta *in vitro* del material sintetizado se realizó exponiendo las pastillas a las cepas asociadas comúnmente a infección en implantes ortopédicos *S. aureus*. Se encontró que la adhesión bacteriana depende del tamaño, la forma, la interconexión y el arreglo espacial de los poros en el compósito. Para conferir capacidad biocida a estos nuevos biomateriales se preparó un recubrimiento de NP-Ag. Este recubrimiento permitió inhibir la adhesión y el crecimiento bacteriano.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a CONICET, SeCyT-UNC, ANPCyTy, MinCyT-Cba por el apoyo económico. M.L. López Rodríguez agradece a SeCyT-UNC por la beca otorgada.

## REFERENCIAS

- [1] Li X, Cui R, Liu W, Sun L, Yu B, Fan Y, Feng Q, Cui F, Watari F. The use of nanoscaled fibers or tubes to improve biocompatibility and bioactivity of biomedical materials. *J Nanomater.* (2013), Article ID 728130.
- [2] Mohseni E, Zalnezhad E, Bushroa AR. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper. *Int J Adhes Adhes* 48 (2014) 238–257.
- [3] Carradó A, Viart N. Nanocrystalline spin coated sol-gel hydroxyapatite thin films on Ti substrate: Towards potential applications for implants. *Solid State Sci.* 12 (2010) 1047-1050.
- [4] Sumenev RA. A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication. *Surf Coat Tech.* 206 (2012) 2035-2056.
- [5] Zhao H, Dong W, Zheng Y, Liu A, Yao J, Li C, Tang W, Chen B, Wang G, Shi Z. The structural and biological properties of hydroxyapatite-modified titanate nanowire scaffolds. *Biomaterials* 32 (2011) 5837-5846.

- 
- [6] Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review. *Acta Biomater* 10 (2014) 557–579.
- [7] Goodman SB, Yao Z. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials* 34 (2013) 3174–3183.
- [8] Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J. Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces. *Prog Mater Sci* 58 (2013) 261–326.
- [9] Arifin A, Sulong AB, Muhamad N, Syarif J, Ramli MI. Material processing of hydroxyapatite and titanium alloy (HA/Ti) composite as implant materials using powder metallurgy: A review. *Mater Design* 55 (2014) 165–175.
- [10] Balbinotti P, Gemelli E, Buerger G, de Lima SA, de Jesus J, Almeida Camargo NH et al., Microstructure development on sintered Ti/HA biocomposites produced by powder metallurgy. *Mater Res*, 14 (2013) 384–393.
- [11] Katsikogianni M and Missirlis YF. Interactions of bacteria with specific biomaterial surface chemistries under flow conditions *Acta Biomater*, 6 (2010) 1107–1118.
- [12] T.R. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang. Understanding adhesion of bacteria and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.* 18 (2008) 1049.
- [13] Chen L. and Wen Y.M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Inter J Oral Sci.* 3 (2011) 66–73.
- [14] Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez D, et al., Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol*, 30 (2012) 499–512.
- [15] Rai M, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol* 112 (2012) 841–852.
- [16] Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*, 12 (2007), 527–534.